

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE

Année 2012

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Système nerveux entérique et maladie de Parkinson

THESE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie – Santé - Médecine

Spécialité : Neurosciences

Présentée

et soutenue publiquement par

Thibaud LEBOUVIER

Le 20 janvier 2012, devant le jury ci-dessous

Président

Rapporteurs Dr Thomas BORAUD, CNRS UMR 5293, Université de Bordeaux 2

Pr Laurent MAGY, Service de Neurologie, CHU de Limoges

Examineurs Pr Marie VIDAILHET, Fédération de Neurologie, Hôpital Salpêtrière, AP-HP

Pr Philippe DAMIER, Service de Neurologie, CHU de Nantes

Dr Michel NEUNLIST, Inserm U913, CHU de Nantes

Directeur de thèse : Pr Pascal DERKINDEREN, Inserm U913, CHU de Nantes

Systeme nerveux entérique et maladie de Parkinson

Remerciements

Si tout travail résulte d'1% d'inspiration et de 99% de transpiration, je me dois de rendre ce précieux pourcent à Michel Neunlist, à Philippe Damier et à Pascal Derkinderen.

Philippe Damier et Michel Neunlist ont eu un jour l'idée incongrue de rechercher les stigmates de la maladie de Parkinson dans des biopsies coliques. Ils assument la paternité de ce travail.

Pascal Derkinderen et Michel Neunlist sont intervenus à tous les moments clefs de sa réalisation, dans le choix des méthodes et l'interprétation des résultats.

Je ne saurais en outre attribuer à mes seuls efforts les 99% restant.

Je reste stupéfait par l'enthousiasme et la curiosité dont ont fait preuve nos amis gastroentérologistes, dirigés par Stanislas Bruley des Varannes et Jean-Paul Galmiche, pour une thématique si éloignée de leur pratique quotidienne. Emmanuel Coron a assumé la majorité des endoscopies du protocole et participé activement au travail de caractérisation des biopsies.

Je n'aurais rien fait sans l'expérience et l'amitié de mes collègues de l'Inserm 913 que je remercie chaleureusement. Je fais une mention particulière à Julien Chevalier qui a su avant quiconque trouver des neurones sous-muqueux dans une biopsie colique ; à Tanguy Chaumette qui m'a enseigné les immunomarquages et avec lequel j'ai fait mes premières armes ; à Michel Neunlist avec lequel j'ai passé des heures déterminantes au microscope.

Je remercie l'équipe du CIC-04 sans laquelle rien n'aurait pu être mené à bien. J'exprime ma reconnaissance à tous les patients ayant accepté le principe de l'étude.

J'ai une pensée affectueuse pour Hélène Pouclet, David Devos et Tiphaine Rouaud qui ont repris le flambeau et l'emporteront bien au-delà de mes espérances.

A la fin de cette page je pense évidemment à mon ami Sébastien Paillusson avec lequel j'ai partagé bien plus qu'une paillasse pendant trois années ; à Mademoiselle Hind Abdo, du Comité des Amis du Glutathion, qui m'a sauvé du stress oxydant ; et une nouvelle fois à mon ami Pascal Derkinderen, que la force de travail et l'intelligence imposent comme le véritable auteur de ces travaux. Je m'étonne chaque fois que j'y pense qu'il m'ait fait l'amitié de s'accommoder de cette imposture.

Abréviations

5-HT	Sérotonine
AADC	L-aromatic aminoacid decarboxylase
ACh	Acétylcholine
AMS	Atrophie multi-systématisée
ANAES	Agence nationale d'accréditation et d'évaluation des soins
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine tri-phosphate
CGE	Cellules gliales entériques
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
ChAT	Choline acetyl-transferase
CL	Corps de Lewy
CoA	Co-enzyme A
COMT	Catéchol-O-méthyltransférase
CPPRB	Comité de protection des personnes dans la recherche biomédicale
Cy - 3	carboxyméthylindocyanine - 3
DBH	Dopamine- β -hydroxylase
DCL	Démence à corps de Lewy
DNF	Dégénérescence neurofibrillaire
EGG	Électrogastrographie
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
fEPSP	Fast excitatory post-synaptic potential ou PPSE rapide
FITC	Fluorescein isothiocyanate
fml	fibres musculaires lisses
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
LRRK2	Leucine-rich repeat kinase 2
MAO	Monoamine oxydase
MIBG	Méta-iodo-benzyl-guanidine
MP	Maladie de Parkinson
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
NA	Noradrénaline ou norépinéphrine
NET	Noepinephrine transporter
NF	Neurofilament
NO	Protoxyde d'azote
NSE	Neuron specific enolase
PBS	Phosphate buffer saline
PGP 9.5	Protein gene product 9.5
PINK - 1	PTEN-induced kinase 1
PM	Plexus myentérique (d'Auerbach)
PPSE	Potentiel post-synaptique exciteur
PPSI	Potentiel post-synaptique inhibiteur
PSM	Plexus sous-muqueux
QSART	Quantitative sudomotor axon reflex test
sEPSP	Slow excitatory post-synaptic potential ou PPSE lent
SNA	Système nerveux autonome
SNC	Système nerveux central
SNE	Système nerveux entérique
SNpc	Substantia nigra pars compacta
som	Somatostatine

TDP - 43	Trans-activating response element (TAR)-DNA binding protein of 43 kDa
UCHL1	Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1
UKPDSBB	United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank
UPDRS	Unified Parkinson's Disease Rating Scale
VIP	Vasointestinal peptide
VMAT	Vesicular monoamine transporter ou transporteur vésiculaire des monoamines

Sommaire

ABRÉVIATIONS.....	5
-------------------	---

SOMMAIRE	7
----------------	---

INTRODUCTION

INTRODUCTION	11
--------------------	----

1 DYSAUTONOMIE ET ATTEINTE DIGESTIVE DANS LA MALADIE DE PARKINSON	13
---	----

1.1 UNE LONGUE PHASE PRÉMOTRICE	13
1.2 PHYSIOLOGIE DU SYSTÈME NERVEUX AUTONOME	14
1.2.1 Afférences du système nerveux autonome	14
1.2.2 Centres nerveux autonomes	17
1.2.3 Efférences	17
1.2.4 Biochimie des neurotransmetteurs.....	18
1.2.5 Le nerf vague	20
1.3 PRÉVALENCE DE LA DYSAUTONOMIE PARKINSONIENNE.....	20
1.3.1 La constance de la dysautonomie.....	20
1.3.2 Prévalence de l'atteinte digestive.....	21
1.4 MANIFESTATIONS CLINIQUES ET PARACLINIQUES DE LA DYSAUTONOMIE EXTRA-DIGESTIVE	21
1.4.1 Atteinte cardio-vasculaire	21
1.4.2 Atteinte sudoromotrice	23
1.4.3 Atteinte génito-urinaire	24
1.5 MANIFESTATIONS CLINIQUES ET PARACLINIQUES DE LA DYSAUTONOMIE D'EXPRESSION DIGESTIVE.....	24
1.5.1 Les fonctions d'interface : déglutition et défécation.....	24
1.5.2 Atteinte œsophagienne	25
1.5.3 Gastroparésie.....	25
1.5.4 Dysmotilité colique	26

2 LA RÉVOLUTION NEUROPATHOLOGIQUE.....	29
--	----

2.1 NEUROPATHOLOGIE ÉLÉMENTAIRE DE LA MALADIE DE PARKINSON	29
2.1.1 α -synucléine	29
2.1.2 Inclusions d' α -synucléine	31
2.1.3 Autres lésions.....	33
2.1.4 Diagnostic neuropathologique.....	34
2.2 PROGRESSION DES LÉSIONS CENTRALES ET CORRÉLATIONS ANATOMO-CLINIQUES	34
2.2.1 Lésions encéphaliques.....	34
2.2.2 Lésions médullaires.....	38

2.3	ATTEINTE DU SYSTÈME NERVEUX PÉRIPHÉRIQUE	39
2.3.1	<i>Atteinte du système nerveux autonome</i>	39
2.3.2	<i>Atteinte du système nerveux entérique</i>	40
2.3.3	<i>Chronologie de l'atteinte des systèmes nerveux autonome et entérique</i>	41
2.4	L'HYPOTHÈSE DE BRAAK	44
3	LE SYSTÈME NERVEUX ENTÉRIQUE	47
3.1	ORGANISATION DU SYSTÈME NERVEUX ENTÉRIQUE	47
3.1.1	<i>Morphologie</i>	48
3.1.2	<i>Neuromédiateurs du système nerveux entérique</i>	48
3.1.3	<i>Neurones entériques</i>	50
3.1.4	<i>Compte neuronal et phénotypage neurochimique chez l'homme</i>	53
3.1.5	<i>Autres populations cellulaires</i>	55
3.2	PHYSIOLOGIE DU SYSTÈME NERVEUX ENTÉRIQUE ET INTERACTIONS AVEC LE SYSTÈME NERVEUX AUTONOME	56
3.2.1	<i>Activité motrice intrinsèque</i>	56
3.2.2	<i>Rôle des systèmes sympathiques et parasympathiques</i>	58
3.3	PATHOLOGIE DU SYSTÈME NERVEUX ENTÉRIQUE	59
3.3.1	<i>Le concept de neuropathie digestive</i>	59
3.3.2	<i>Maladies neurodégénératives du système nerveux entérique</i>	60

METHODES

4	LE SYSTÈME NERVEUX ENTÉRIQUE COMME BIOMARQUEUR DE LA MALADIE DE PARKINSON	63
4.1	EXPLORATION MORPHOLOGIQUE DU SYSTÈME NERVEUX ENTÉRIQUE CHEZ L'HOMME	63
4.1.1	<i>Méthodes standards d'analyse des biopsies coliques</i>	63
4.1.2	<i>Microdissection et immunomarquage de surface (whole-mount)</i>	64
4.1.3	<i>Analyse en biologie moléculaire (Western blot)</i>	68
4.1.4	<i>Limitations et perspectives</i>	68
	ARTICLE N°1	71
	<i>Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients</i>	

RÉSULTATS

4.2	UTILISATION DES BIOPSIES COLIQUES POUR L'ANALYSE DU SYSTÈME NERVEUX ENTÉRIQUE DANS LA MALADIE DE PARKINSON	75
4.2.1	<i>Une perte neuronale subtile dans le plexus sous-muqueux</i>	75
4.2.2	<i>Altérations de l'innervation sympathique et intégrité des neurones dopaminergiques dans le plexus sous-muqueux colique</i>	76
4.2.3	<i>Des inclusions de Lewy sous-muqueuses chez 72% des patients</i>	80
4.2.4	<i>Analyse biochimique de l'α-synucléine dans les biopsies coliques</i>	83

4.2.5	Corrélations clinico-pathologiques	86
4.2.6	Synthèse des résultats	89
ARTICLE N°2		91
<i>Pathological lesions in colonic biopsies during Parkinson's disease</i>		
ARTICLE N°3		95
<i>Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms</i>		
ARTICLE N°4		105
<i>Olfactory dysfunction is independent of enteric pathology in Parkinson's disease</i>		
4.3	PERSPECTIVES D'AMÉLIORATION DU BIOMARQUEUR	111
4.3.1	Valeur des biopsies rectales	111
ARTICLE N°5		113
<i>A comparison between rectal and colonic biopsies to detect Lewy pathology in Parkinson's disease</i>		
4.3.2	Comparaison systématique entre l'analyse de la muqueuse et l'analyse de la sous-muqueuse pour la mise en évidence des inclusions de Lewy.....	119
ARTICLE N°6		121
<i>A comparison between colonic submucosa and mucosa to detect Lewy pathology in Parkinson's disease</i>		

DISCUSSION

5 LE SYSTÈME NERVEUX ENTÉRIQUE, UNE FENÊTRE SUR LE SYSTÈME NERVEUX

CENTRAL ?		135
5.1	LES BIOPSIES DIGESTIVES COMME BIOMARQUEUR DE LA MALADIE DE PARKINSON	136
5.1.1	Pourquoi un biomarqueur de la maladie de Parkinson ?	136
5.1.2	Biomarqueurs histologiques de la maladie de Parkinson.....	138
5.1.3	Les biopsies coliques constituent-elles un biomarqueur de la maladie ?	138
5.1.4	Perspectives.....	140
5.2	LES BIOPSIES DIGESTIVES COMME OUTIL POUR LA RECHERCHE.....	143
5.2.1	Répercussions de la pathologie de Lewy sur la barrière épithéliale intestinale	143
5.2.2	Expression constitutionnelle de l' α -synucléine par le système nerveux entérique et vulnérabilité à la pathologie de Lewy	143
5.2.3	Accès à des neurones viables.....	144
5.2.4	Modélisation de la maladie de Parkinson in vitro	144
5.3	LE SYSTÈME NERVEUX ENTÉRIQUE COMME FENÊTRE SUR LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL.....	146
5.3.1	SNE-SNC : similitudes, différences et relations	146
5.3.2	SNE-SNC en pathologie : ce qui les rassemble.....	147
5.3.3	SNE-SNC : le concept confronté à la réalité	149
CONCLUSION.....		153

ARTICLES DE REVUE	155
ARTICLE N°7	155
<i>The second brain and Parkinson's disease</i>	
ARTICLE N°8	165
<i>Biopsable neural tissues: toward new biomarkers for Parkinson's disease?</i>	
ARTICLE N°9	173
<i>Parkinson's disease: the enteric nervous system spills its guts</i>	
ARTICLE N°10	183
<i>Braak a-t-il tort ?</i>	
APPENDICES : PARTICIPATION À DES TRAVAUX TIERS	195
ARTICLE N°11	195
<i>Neurochemical plasticity in the enteric nervous system of a primate animal model of experimental parkinsonism</i>	
ARTICLE N°12	205
<i>Alpha-synuclein expression is induced by depolarization and cyclic AMP in enteric neurons</i>	
RÉFÉRENCES	221

Introduction

La maladie de Parkinson (MP) est d'abord caractérisée par des signes moteurs, l'akinésie et l'hypertonie, qui résultent de la dénervation dopaminergique du striatum. La sévérité de la MP a été longtemps corrélée à l'émergence des signes moteurs non dopaminergiques (signes axiaux) que sont l'instabilité posturale, les troubles de la marche et la dysarthrie. Mais une attention croissante est portée **aux manifestations non-motrices** de la maladie, qui comportent des symptômes variés (troubles de l'olfaction, troubles du sommeil paradoxal, atteinte digestive, dysautonomie ou fléchissement cognitif). Précédant souvent la survenue des signes moteurs, ces manifestations laissent entrevoir la possibilité d'un diagnostic précoce ; à la période d'état, leur résistance au traitement dopaminergique en fait une cause importante d'altération de la qualité de vie ; en fin d'évolution elles se partagent avec les signes axiaux l'essentiel du tableau clinique, le syndrome parkinsonien étant alors relégué au second plan.

Les symptômes digestifs de la MP sont l'archétype de ces manifestations non-motrices. Constipation et gastroparésie, à des degrés divers, concernent la majorité des patients. Elles provoquent une gêne fonctionnelle importante et dans un grand nombre de cas appartiennent aux signes précurseurs de la maladie. Au cours de la dernière décennie, les avancées majeures de la neuropathologie de la MP en ont fourni les bases anatomiques présumées, en révélant l'atteinte précoce, préalable à celle de la substance noire, du système nerveux autonome (SNA). Cette atteinte concerne à la fois les noyaux végétatifs du système nerveux central (SNC) mais également, particularité de la MP, les nerfs et les ganglions végétatifs du système nerveux périphérique. Des arguments récents suggèrent en outre que les lésions suivent une progression centripète et que le SNA constitue en quelque sorte **la porte d'entrée dans le SNC d'une pathologie initialement périphérique**.

Connecté aux centres végétatifs de la moelle et du tronc cérébral par son innervation sympathique et parasympathique, **le système nerveux entérique** (SNE), qui appartient au SNA, est un abondant réseau nerveux situé tout au long du tractus digestif. Son fonctionnement pour l'essentiel autonome n'est que modulé par les afférences centrales. Restant largement méconnu malgré l'essor des neurosciences, il possède de nombreux points communs avec le SNC et constitue le paradigme d'un centre nerveux intégré en dehors du SNC. L'hypothèse qu'il pourrait représenter le premier maillon de l'atteinte neurodégénérative dans la MP n'est finalement que le prétexte au développement d'outils performants pour étudier ce réseau neuronal fascinant.

L'une des caractéristiques intéressantes de ce système à la fois archaïque et moderne est son accessibilité aux prélèvements. La possibilité de pouvoir facilement appréhender le SNE *in vivo* ouvre des perspectives insoupçonnées pour la médecine et pour la recherche. Cet ouvrage est consacré à l'intérêt des biopsies digestives de routine pour l'étude du SNE. Ces prélèvements superficiels et bénins atteignent le plexus de Meissner et permettent son analyse fine. Appliquée à la MP, cette technique a permis d'en identifier les lésions spécifiques au sein du SNE, augurant de futures applications pour le diagnostic ou la recherche.

1 Dysautonomie et atteinte digestive dans la maladie de Parkinson

Ils ne mouraient pas tous mais tous étaient frappés

Jean de la Fontaine

La MP est la deuxième pathologie neurodégénérative en fréquence après la maladie d'Alzheimer [1]. Sa prévalence en Europe a été récemment estimée à 1,8% de la population âgée de plus de 65 ans. Le lien avec l'âge est évident puisque la prévalence passe de 0,6% entre 65 et 69 ans à 2,6% entre 85 et 89 ans [2, 3]. Le diagnostic et le traitement de la MP représentent donc un enjeu de santé publique dans les pays concernés par le vieillissement de la population.

1.1 Une longue phase prémotrice

La MP à la phase d'état est caractérisée par une tétrade symptomatique motrice résumée par l'acronyme *TRAP* : *Tremblement*, *Rigidité*, *Akinésie* et *instabilité Posturale*. Parmi ceux-ci les signes cardinaux de la maladie, l'akinésie et la rigidité, sont la conséquence de la dénervation dopaminergique du putamen par une destruction relativement sélective de la substantia nigra pars compacta (SNpc) [4, 5]. Les prolongements des neurones dopaminergiques de la substance noire constituent en effet le tractus nigro-striatal qui projette dans les deux structures du striatum, putamen et noyau caudé. La perte neuronale dans la SNpc est associée à la formation d'inclusions cytoplasmiques hyalines dans les neurones restants nommées **corps de Lewy** (CL). Quand la gêne motrice apparaît, on estime que 60% des neurones dopaminergiques ont dégénéré, et que le putamen a perdu 80% de la dopamine des terminaisons axonales nigro-striatales [5]. A ce stade de MP débutante, où l'atteinte de la SNpc n'est pas massive, certains noyaux non dopaminergiques du tronc cérébral sont déjà touchés par une perte neuronale sévère [6].

Ces données anatomo-pathologiques suggèrent que le processus dégénératif est bien antérieur à l'apparition des signes moteurs. Malgré de larges variations interindividuelles, la durée de cette phase présymptomatique a pu être calculée en corrélant durée des symptômes et perte dopaminergique, mais les estimations s'étalent de 5 [7] à 50 ans [8] selon les études ! Les modélisations les plus récentes, basées sur un suivi longitudinal en neuroimagerie métabolique (tomographie par émission de positons à la ¹⁸F-fluorodopa), montrent que le processus dégénératif suit une exponentielle inverse, en contradiction avec les modèles linéaires précédemment retenus, **et estiment la phase présymptomatique à 6 ans en moyenne** [9]. Ces travaux centrés sur l'atteinte dopaminergique confirment l'hypothèse d'un processus lent et insidieux, qui pourrait être encore allongé si l'atteinte initiale est extra-nigrique.

Au terme de « phase présymptomatique » doit être préféré celui de « **phase prémotrice** ». Un certain nombre de signes précurseurs de la MP ont en effet été décrit, souvent non spécifiques (syndrome dépressif) ou communs à d'autres pathologies dégénératives (déficit olfactif). Ils comprennent des troubles

neuropsychiatriques, des troubles du sommeil et des symptômes dysautonomiques et gastro-intestinaux [10]. **Les signes précurseurs appartiennent aux manifestations non-motrices de la maladie.** Mieux pris en compte par les neurologues [11] mais résistant souvent au traitement dopaminergique [10], ces symptômes non-moteurs retentissent de façon majeure sur la qualité de vie ressentie des patients [10], et dominent le tableau clinique en fin d'évolution de la maladie [12].

La dysautonomie répond parfaitement à la définition précédente des manifestations non-motrices. Précoces, souvent antérieures aux signes moteurs, les manifestations dysautonomiques sont quasi-constantes, souvent invalidantes et peuvent être au premier plan dans les maladies évoluées. Les troubles digestifs s'y intègrent pleinement. Si la sémiologie clinique de la dysautonomie ne permet pas de distinguer le siège de l'atteinte du SNA, certaines explorations fonctionnelles prétendent différencier son atteinte centrale (ou préganglionnaire) de son atteinte périphérique (ou postganglionnaire).

Au-delà de notre intérêt scientifique pour les atteintes du contingent périphérique du SNA, distinguer l'atteinte préganglionnaire de l'atteinte postganglionnaire a une pertinence clinique pour l'exploration des syndromes parkinsoniens dysautonomiques : l'atteinte postganglionnaire est propre à la MP, alors que l'atteinte préganglionnaire plaide en faveur d'une atrophie multi-systématisée (AMS), qui est un modèle de dysautonomie centrale [13]. L'AMS est une maladie neurodégénérative qui, dans sa forme parkinsonienne, est un diagnostic différentiel critique de la MP [14].

1.2 Physiologie du système nerveux autonome

Avant d'aborder les manifestations cliniques et paracliniques de la dysautonomie parkinsonienne, il n'est pas inutile de rappeler les grandes lignes de la physiologie du SNA.

Le SNA contrôle ou régule les fonctions involontaires assurées par l'activité des fibres musculaires lisses (fml), des cardiomyocytes et des glandes endo- et exocrines à travers l'organisme. Les travaux fondateurs de John Langley [15] et de Walter Cannon [16] au début du siècle dernier ont permis de subdiviser le SNA en deux entités fonctionnelles d'action opposée : **le système sympathique**, dont la vocation est de mobiliser les ressources de l'organisme pour répondre à une épreuve ou à une menace, quelle qu'elle soit (c'est le système du « *fight or flight* », combattre ou fuir, selon Cannon) ; et **le système parasympathique**, dont l'activité prédomine dans les états de quiescence, et vise à reconstituer les stocks énergétiques dépensés (« *rest and digest* », se reposer et digérer).

L'étude précise de l'anatomie, de la physiologie et de la pharmacologie de ces deux systèmes concurrents dépasse largement le cadre de ce travail et peut être résumé dans un schéma classique (figure 1 et tableau 1). L'organisation générale du SNA, invariable pour le sympathique et le parasympathique, est comparable aux circuits réflexes du système nerveux somatique et comprend des afférences, des centres nerveux et des efférences. Elle s'en distingue néanmoins par certains aspects [17].

1.2.1 Afférences du système nerveux autonome

Les afférences viscérosensibles sont surtout développées dans le système parasympathique, où elles constituent le contingent majeur du **nerf vague** (X). Dans le tractus digestif, les fibres afférentes du X innervent la muqueuse, les plexi entériques et la musculature, particulièrement au niveau de l'œsophage et

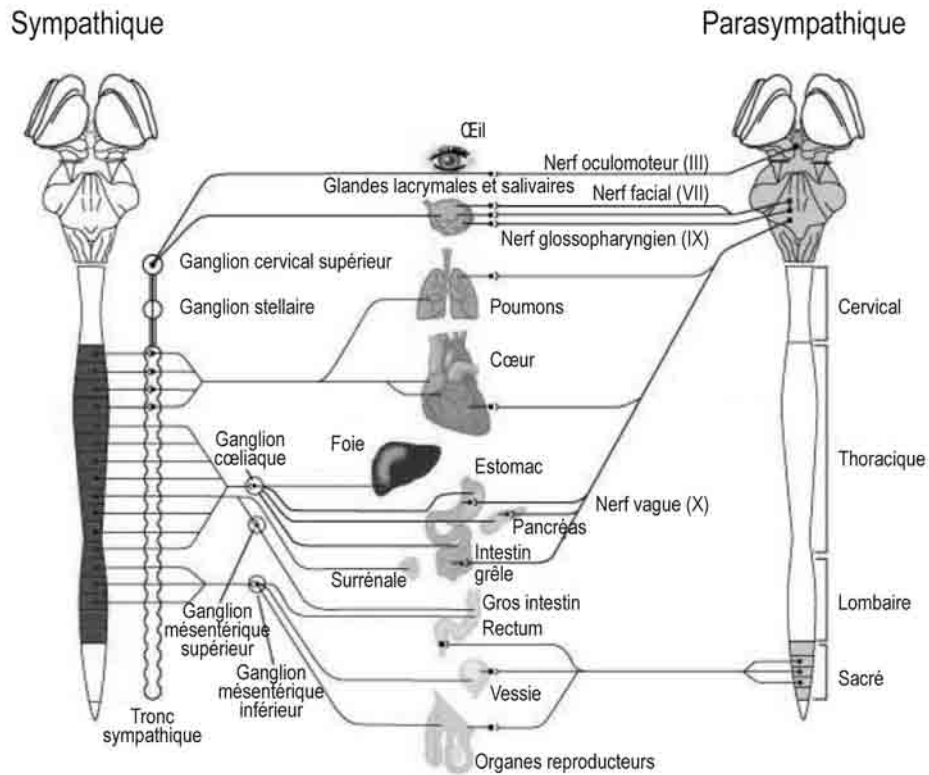


Figure 1. Organisation classique des systèmes sympathique et parasympathique

	Sympathique	Parasympathique
Œil - Iris (muscle radial) - Iris (muscle circulaire) - Muscle ciliaire	Contracte (α_1) Relâche (β)	Contracte (M3) Contracte (M3)
Cœur - Nœud sinusal - Contractilité	Accélère (β_1, β_2) Augmente (β_1, β_2)	Ralentit (M2) Diminue (M2)
Vaisseaux sanguins - Peau, vaisseaux splanchniques - Muscles squelettiques - Endothélium	Contracte (α) Relâche (β_2)/contracte (α) Relâche (M3)	Libère de l'EDRF (M3)
Muscle lisse bronchiolaire	Relâche (β_2)	Contracte (M3)
Tractus gastrointestinal - Muscle lisse (parois) - Muscle lisse (sphincters) - Sécrétion - Plexus myentérique	Relâche (α_2, β_2) Contracte (α_1)	Contracte (M3) Relâche (M3) Augmente (M3) Active (M1)
Muscle lisse génito-urinaire - Paroi vésicale - Sphincter	Relâche (β_2) Contracte (α_1)	Contracte (M3) Relâche (M3)
Peau - Muscle lisse pilomoteur - Glandes sudoripares	Contracte (α) Augmente (M, α)	
Fonctions métaboliques Foie Adipocytes Rein	Néoglucogénèse, glycogénolyse (β_2, α) Lipolyse (β_3) Libération de rénine (β_1)	
Terminaisons autonomes - Sympathiques - Parasympathiques	Diminue la libération d'acétylcholine (α)	Diminue la libération de noradrénaline (M)

Tableau 1. Effets de la stimulation des récepteurs sympathiques et parasympathiques (d'après Katzung)

de l'estomac. Ce sont des fibres de petit calibre non (type C) ou faiblement (type A δ) myélinisées. Les neurones sensitifs viscéraux dont elles dépendent répondent aux stimuli mécaniques et chimiques physiologiques. Leur corps cellulaire se situe dans le cou au niveau du ganglion plexiforme et leur court axone fait synapse dans le noyau du tractus solitaire de la moelle allongée.

Dans le système sympathique, les neurones sensitifs viscéraux possèdent des fibres de type C et véhiculent avant tout les stimuli nociceptifs déclenchés par une variété de médiateurs inflammatoires. Leur corps cellulaire se situe dans le ganglion rachidien de la racine dorsale de la moelle et leur court axone fait synapse dans la couche V de la corne dorsale, où une convergence avec les afférences somatiques explique le phénomène des douleurs projetées d'origine viscérale. Les neuromédiateurs sont des neuropeptides (CGRP, VIP, somatostatine, dynorphine) incluant la famille des tachykinines (substance P, neurokinine A) [17-19].

1.2.2 Centres nerveux autonomes

Les centres végétatifs diffèrent selon le système : les centres parasympathiques viscéromoteurs destinés au tractus digestif sont situés à la fois dans le tronc cérébral et dans la moelle sacrée (**colonne intermédiolatérale de S2 à S4**). Les centres sympathiques viscéromoteurs sont localisés dans la **colonne intermédiolatérale de la moelle de T1 à L3**.

Les centres végétatifs contiennent le corps cellulaire du premier motoneurone viscéral, analogue du premier motoneurone de la motricité somatique, également appelé **neurone préganglionnaire** [17-19].

1.2.3 Efférences

Les fibres préganglionnaires cholinergiques font synapse avec le deuxième motoneurone viscéral (**neurone ganglionnaire ou postganglionnaire**), qui possède la propriété remarquable de se situer en dehors du SNC. Le récepteur post-synaptique à l'acétylcholine est en règle générale un récepteur nicotinique dans les deux systèmes (rarement le récepteur est muscarinique dans le parasympathique). Dans le parasympathique, le neurone ganglionnaire se situe à *proximité* de l'organe cible, au sein des plexus nerveux de la paroi des organes creux. Dans le sympathique à l'inverse, le corps du neurone ganglionnaire est situé à *distance*, dans les chaînes ganglionnaires paravertébrales et prévertébrales. Trois ganglions prévertébraux, reliés aux chaînes paravertébrales par l'intermédiaire des nerfs splanchniques, assurent l'innervation sympathique des organes sous-diaphragmatiques : le ganglion coélique, le ganglion mésentérique supérieur et le ganglion mésentérique inférieur.

Selon le schéma classique, le deuxième motoneurone viscéral contacte directement l'effecteur (fibre musculaire lisse ou glande excrétrice) avec lequel il fait synapse. Dans le parasympathique, le neurotransmetteur impliqué est l'acétylcholine, excitatrice, et le récepteur post-synaptique est de type muscarinique. Dans le sympathique, le neurotransmetteur est la noradrénaline. En réalité, les informations afférentes sont intégrées au sein des plexus nerveux d'organe avant la mise en jeu de l'effecteur [19]. L'exemple le plus simple est la synapse axo-axonale que fait l'axone sympathique post-ganglionnaire à la jonction nerf-effecteur, qui réalise une inhibition présynaptique.

Si cette conception dichotomique de deux systèmes d'action opposée reste valable pour appréhender la physiologie générale du système nerveux autonome, elle est souvent battue en brèche en pratique. Au plan

anatomique le ganglion parasympathique, sensé héberger le neurone postganglionnaire, n'est jamais réellement individualisé et est fondu dans un plexus nerveux entourant les organes viscéraux. Au plan biochimique, l'existence de neurones postganglionnaires catécholaminergiques dans les plexus intrinsèques du cœur et cholinergiques au niveau de l'innervation sympathique des glandes sudoripares, remet un peu plus en cause une ségrégation trop simpliste entre les deux systèmes [20].

1.2.4 Biochimie des neurotransmetteurs

Les deux neurotransmetteurs principaux du SNA sont l'acétylcholine (ACh) et la noradrénaline (NA).

1.2.4.1 Acétylcholine

L'ACh est le fruit d'une réaction réversible au cours de laquelle la choline acétyltransférase (ChAT) transfère un groupe acétyle de l'acétyl-coenzyme A (CoA) à la choline. Sa synthèse est régulée par la disponibilité de la choline, qui est transportée jusqu'aux terminaisons axonales. La majorité de l'ACh est synthétisée dans les boutons terminaux riches en mitochondries, qui fournissent l'acétyl-CoA. L'action synaptique de l'ACh est interrompue par l'acétylcholinestérase qui hydrolyse l'ACh en choline et acétate. La choline est ensuite recyclée par la terminaison axonale. Le transporteur responsable de sa recapture a été récemment identifié [21, 22].

L'ACh se fixe à deux types de récepteurs. Les récepteurs muscariniques sont des récepteurs métabotropiques à 7 segments transmembranaires, et sont les récepteurs post-ganglionnaires du système parasympathique. Les récepteurs nicotiniques appartiennent à la famille des récepteurs-canaux ioniques et servent de récepteurs ganglionnaires dans le sympathique et le parasympathique [18].

1.2.4.2 Noradrénaline

La NA ou norépinephrine appartient avec l'adrénaline et la dopamine au groupe des catécholamines, caractérisé par un noyau catéchol et un groupe éthylamine en position 1. Tous ces neurotransmetteurs dérivent d'une voie de synthèse unique, qui débute par l'acide aminé tyrosine. La première réaction implique la tyrosine hydroxylase (TH), enzyme limitante de l'ensemble de la voie des catécholamines. Utilisant la tétrahydrobioptérine, Fe^{2+} et O_2 comme cofacteurs, la TH hydroxyle la tyrosine en position 3 pour former la dihydroxyphénylalanine. La décarboxylase des acides aminés aromatiques L (*L-aromatic aminoacid decarboxylase* [AADC]), décarboxylase ubiquitaire et aspécifique, transforme la dihydroxyphénylalanine en dopamine (figure 2). Dans les neurones noradrénergiques, la voie de synthèse continue par la conversion de la dopamine en NA par la dopamine- β -hydroxylase (DBH).

La synthèse des catécholamines a lieu en majorité dans les terminaisons axonales. Les enzymes nécessaires sont transportées *in situ* depuis le corps cellulaire. La dopamine est synthétisée dans le cytoplasme de la terminaison et est amenée dans des vésicules de stockage par le transporteur vésiculaire des monoamines VMAT2. Ainsi la dopamine est placée à l'abri des enzymes de dégradation comme la monoamine oxydase (MAO). La transformation de la dopamine en NA est intra-vésiculaire, car la DBH est située au sein même des vésicules de stockage et est parfois libérée avec la NA.

Les catécholamines libérées dans le milieu extracellulaire sont soit dégradées par la MAO ou la catéchol-O-méthyltransférase (COMT), soit recapturée par un transporteur spécifique, qui est le DAT (*dopamine transporter*) pour la dopamine et le NET (*norepinephrin transporter*) pour la NA.

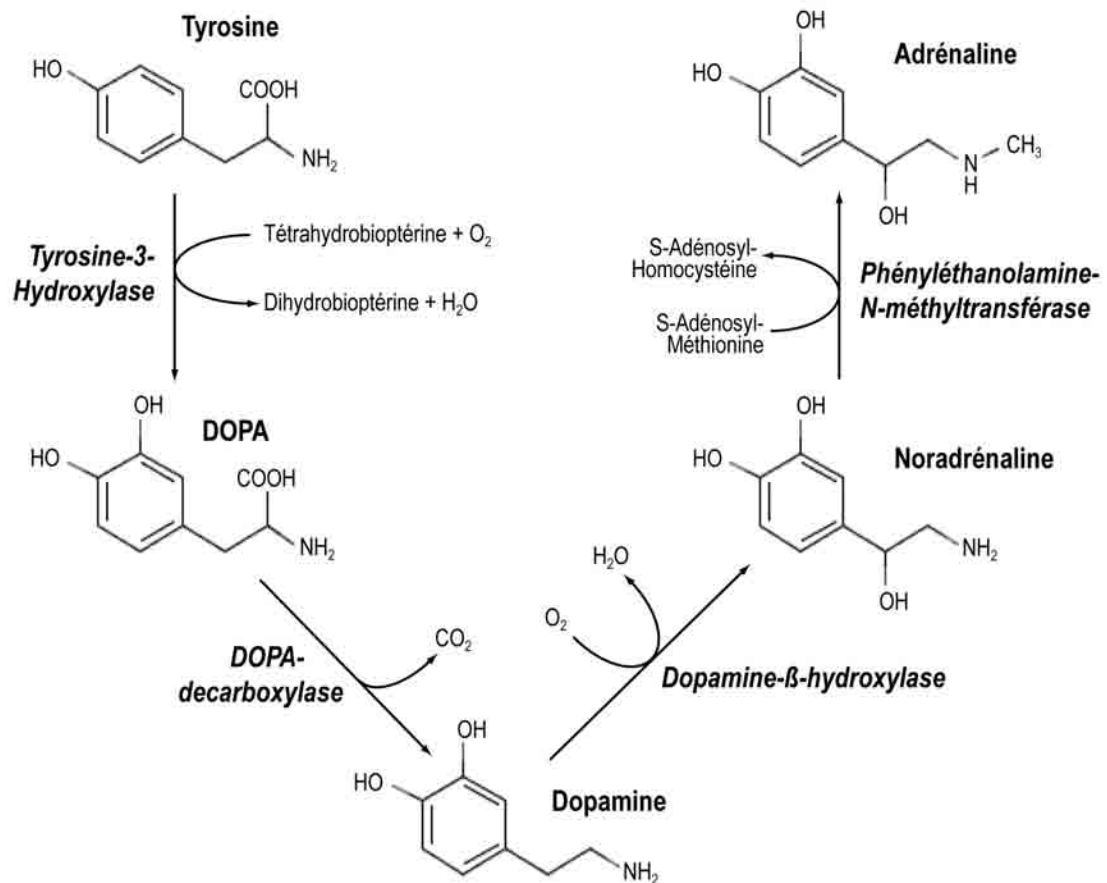


Figure 2. Synthèse des catécholamines

Ainsi un neurone noradrénergique ne peut pas être différencié d'un neurone dopaminergique par le marquage de la tyrosine hydroxylase, de la dopamine ou du transporteur vésiculaire VMAT qu'ils contiennent tout deux. Le phénotype noradrénergique peut être établi par la positivité pour DBH ou pour le transporteur spécifique NET. A l'inverse, le neurone dopaminergique est positif pour TH, négatif pour DBH et positif pour DAT.

Les récepteurs à la NA sont tous des récepteurs métabotropiques. On en distingue de nombreux types (récepteurs β_1 , β_2 , α_1 et α_2 qui sont des autorécepteurs inhibiteurs) classés selon leurs effets et leur pharmacologie. Ce sont les récepteurs sympathiques post-ganglionnaires [18].

1.2.5 Le nerf vague

Le nerf vague (X^{ème} paire crânienne) est un nerf mixte puisqu'il contient des fibres sensibles et sensorielles, des fibres somatomotrices et des fibres viscéromotrices et viscérosensibles ; il couvre un territoire exceptionnellement large, innervant la totalité des organes thoraciques, du foie et du pancréas et la majorité du tractus digestif, de son extrémité orale jusqu'aux deux tiers proximaux du côlon [23].

Son noyau viscérosensible, où projettent les neurones viscérosensibles dont le corps est situé dans le ganglion plexiforme, est **le noyau du tractus solitaire**. Son noyau viscéromoteur est **le noyau dorsal du vague**, situé dans la moelle allongée dorso-médiale. Centre parasympathique majeur, ce noyau reçoit de multiples afférences du noyau du tractus solitaire, sous le contrôle de voies descendantes issues de la substance réticulée et de l'hypothalamus.

Outre ces noyaux végétatifs, le X possède un contingent somatique sensoriel (assurant la sensibilité du pharynx et du larynx et la gustation marginalement), qui projette sur le noyau du trijumeau (V), et un contingent somatomoteur (innervant notamment la musculature striée du pharynx et de l'œsophage supérieur) issu du noyau ambigu.

Le noyau dorsal du vague fait partie des trois principaux **noyaux pigmentés du tronc cérébral**.

1.3 Prévalence de la dysautonomie parkinsonienne

L'éventail des manifestations dysautonomiques de la maladie de Parkinson est large, incluant signes cardiovasculaires, troubles urinaires et génitaux, anomalies de la thermorégulation et de l'accommodation. Les troubles digestifs seront traités à part compte tenu de la complexité du SNE et de ses relations avec le SNA.

1.3.1 La constance de la dysautonomie

La dysautonomie affecte à des degrés divers l'ensemble des parkinsoniens. Sa prévalence varie du tout au tout selon que des critères objectifs (recherche d'une hypotension orthostatique) ou d'interrogatoire (sensations vertigineuses à l'orthostatisme) sont utilisés [24]. La formulation des questions influençant beaucoup les résultats, un interrogatoire standardisé a été développé [25]. Ses résultats sur une large cohorte de 421 patients montrent que **les troubles digestifs sont les plus fréquentes des manifestations dysautonomiques**, et pointent d'autres symptômes entraînant une gêne fonctionnelle importante [26] : l'incontinence urinaire, les troubles de l'érection ou l'hyperhidrose touchent par exemple plus de la moitié

des patients, soit une prévalence deux fois supérieure aux témoins appariés en âge. Dans cette étude, les symptômes cardiovasculaires sont moins fréquents qu'habituellement rapporté, affectant un tiers des patients. C'est dans ce domaine que les différences entre paramètres mesurés et signes fonctionnels sont les plus importantes [27].

Le deuxième enseignement de cette étude est **l'aggravation de la dysautonomie avec l'âge, la durée d'évolution de la maladie et le traitement dopaminergique** (à l'exception remarquable des symptômes cardio-vasculaires qui, contrairement à l'opinion commune, semblent largement indépendants du traitement). **Des signes dysautonomiques frustes sont présents dès le diagnostic chez la plupart des patients**, confortant l'hypothèse d'une atteinte primitive du SNA, et progressent insidieusement avec la maladie. Un cas de dénervation cardiaque sympathique précédant de 4 ans les premiers signes moteurs a été rapporté [28]. De ce point de vue la MP diffère de l'AMS où l'atteinte dysautonomique est d'emblée majeure [29].

1.3.2 Prévalence de l'atteinte digestive

Les signes digestifs peuvent impliquer l'ensemble du tractus digestif [30] (figure 3). A l'étage oropharyngé, la sialorrhée et la dysphagie concernent 70 et 52% des parkinsoniens respectivement [31]. L'hypersalivation est un terme impropre, puisque les troubles sont liés à l'abolition de la déglutition réflexe et non à l'augmentation de la sécrétion. Les troubles de la vidange gastrique (**gastroparésie**), à l'origine de nausées, de ballonnement postprandial et d'une réduction des prises alimentaires, touchent de 34 à 45% des patients [32]. **La constipation** est très commune dans la MP. Sa prévalence a été récemment mesurée à 59% en utilisant les critères de définition internationaux de Rome III [33], soit presque trois fois plus que chez les sujets contrôles d'âge équivalent [34]. Elle dépasse 70% sur des critères subjectifs (plaintes des patients) [35]. Enfin la dysfonction ano-rectale (**dyschésie**), difficile à distinguer de la constipation fonctionnelle sur le seul interrogatoire, est également fréquente chez les parkinsoniens [35, 36].

Comme d'autres signes non-moteurs, **le ralentissement du transit intestinal est précoce voire précède l'apparition de la maladie** [32, 37, 38] ; signe précurseur ou facteur de vulnérabilité, un transit ralenti (<1 selle quotidienne) est associé à un risque relatif de 2,7 de développer une MP dans une population d'âge supérieur à 51 ans [39] (comparaison de l'incidence de la maladie en fonction du transit sur une étude longitudinale prospective).

1.4 Manifestations cliniques et paracliniques de la dysautonomie extra-digestive

Diverses modalités d'exploration fonctionnelle du SNA ont été décrites [40]. Les plus intéressantes d'un point de vue physiopathologique sont celles qui s'adressent aux fonctions cardiovasculaires et sudoromotrices, car elles prétendent localiser le siège pré- ou post-ganglionnaire de l'atteinte.

1.4.1 Atteinte cardio-vasculaire

L'hypotension orthostatique peut résulter de deux grandes atteintes :

- Celle du **baroréflexe artériel**, qui naît des barorécepteurs du cœur et des gros troncs artériels ; l'afférence de ce réflexe est vagale et son efférence vagale et sympathique. Le baroréflexe artériel

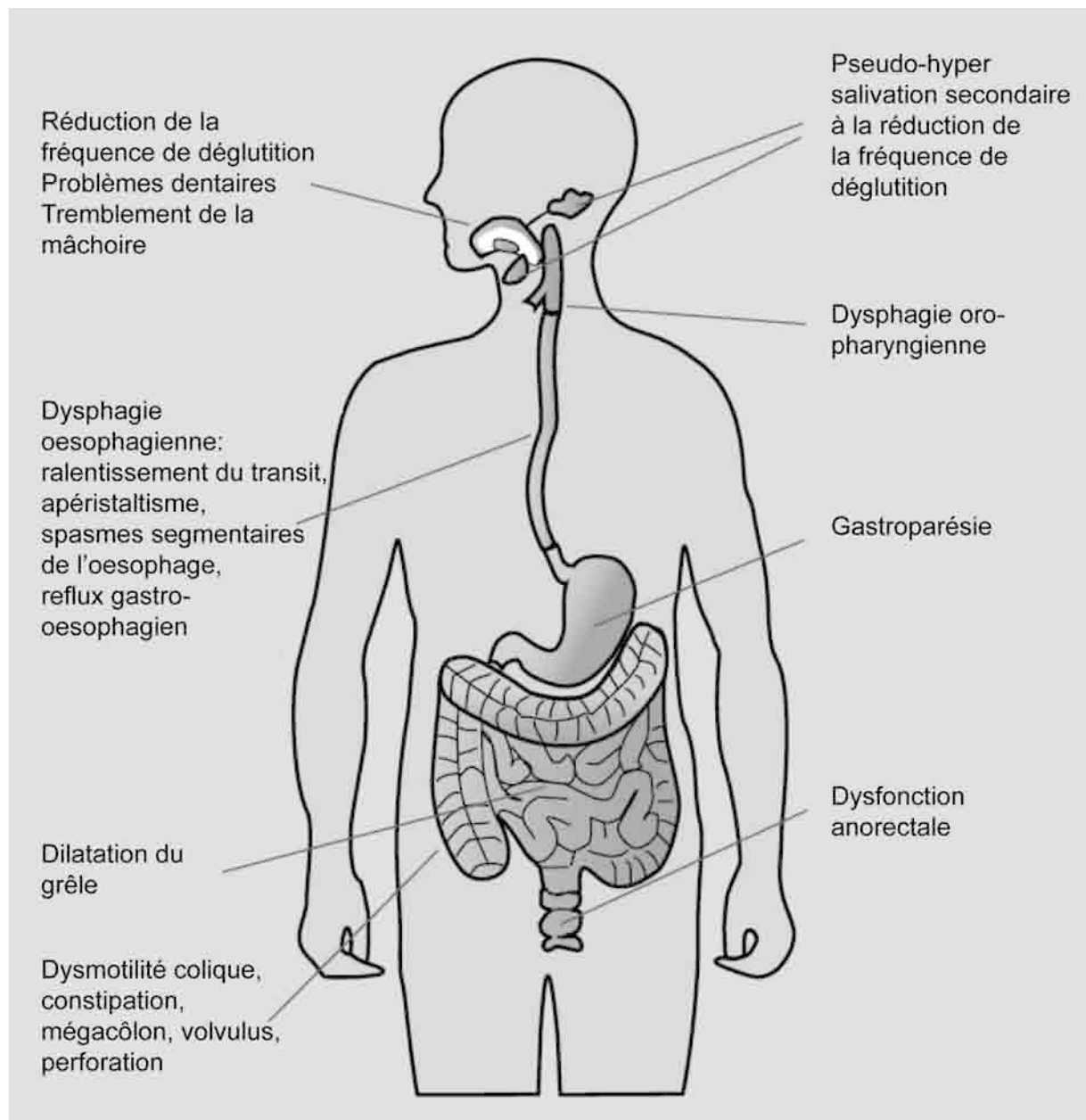


Figure 3. Spectre des manifestations digestives dans la maladie de Parkinson (d'après Pfeiffer)

est évalué par le monitoring de l'électrocardiogramme et de la pression artérielle après l'injection d'une substance vasoactive ou au décours d'une manœuvre de Valsalva. Son abolition résulterait plus d'une atteinte centrale ou préganglionnaire [41].

- Celle de l'innervation cardiaque et vasculaire sympathique ; la dénervation résulte d'une atteinte post-ganglionnaire. Elle peut être diagnostiquée par la **scintigraphie au méta-iodo-benzyl-guanidine marqué (¹²³I-MIBG)**, un analogue de la noradrénaline recapturé par les transporteurs spécifiques (NET) des axones sympathiques. Sa fixation cardiaque reflète le nombre de terminaisons sympathiques. Le dosage plasmatique de la NA basale et après épreuve de provocation (dans le sang veineux mêlé, ou prélevé *in situ* par cathétérisme cardiaque) apporte les mêmes enseignements. Les tests de provocation sont physiques (orthostatisme) ou pharmacologiques (yohimbine).

Toutes les études de la fonction cardiovasculaire dans la MP objectivent une atteinte mixte, à la fois préganglionnaire (centrale) et postganglionnaire (périphérique). **Les signes de dénervation cardiaque sympathique** sont indiscutables, **précoces** et confirmés par maintes études : diminution de la fixation cardiaque physiologique du MIBG [42] et diminution des réserves de NA plasmatique [43] (revue en [41]). En comparaison, les dosages de neurotransmetteurs et la scintigraphie au MIBG sont **normaux dans l'AMS**, dans laquelle l'atteinte du baroréflexe rend seule compte de l'hypotension orthostatique [44-46]. L'hypofixation cardiaque différencie également la MP d'autres syndromes parkinsoniens atypiques (dégénérescence cortico-basale, paralysie supranucléaire progressive, ou mutation de la parkine, ce qui constitue un argument supplémentaire contre son assimilation à la MP [47]). La fiabilité du diagnostic différentiel sur la seule évaluation du SNA reste toutefois discutée [48].

Certains points demeurent obscurs. De nombreux patients d'abord ne présentent pas d'hypotension orthostatique malgré de franches anomalies à ces épreuves fonctionnelles [49]. Les transplantés cardiaques ensuite, modèle par excellence de dénervation cardiaque, ne souffrent que transitoirement de symptômes dysautonomiques. L'atteinte associée de l'innervation vasculaire sympathique, d'une part, et les lésions des plexus intrinsèques cardiaques d'autre part [19, 50] pourraient rendre compte de la vulnérabilité des patients parkinsoniens.

1.4.2 Atteinte sudoromotrice

La dénervation sympathique cutanée peut être évaluée par deux techniques : l'enregistrement du réflexe cutané sympathique (mesure des variations de résistance cutanée liées à la transpiration, après un stimulus sonore brusque), méthode globale dont la reproductibilité est incertaine ; et l'évaluation quantitative du réflexe d'axone sudoromoteur (QSART, *quantitative sudomotor axon reflex test*), qui évalue la quantité de sueur produite par méthode hygrométrique à distance d'une administration transcutanée (par iontophorèse) d'acétylcholine.

Les résultats sont conflictuels dans la MP. Une étude rapporte des résultats normaux au QSART, ce que l'auteur interprète comme une spécificité de la dénervation sympathique post-ganglionnaire pour les fibres noradrénergiques (l'innervation sympathique des glandes sudoripares est cholinergique) [43]. Un deuxième travail montre des altérations similaires des deux tests dans la MP et l'AMS [48]. Ces données dissonantes

remettent en cause la ségrégation entre une atteinte postganglionnaire dans la MP et préganglionnaire dans l'AMS, mais demandent à être confirmées.

1.4.3 Atteinte génito-urinaire

Comme souligné en préambule, l'atteinte génito-urinaire de la MP est certainement moins intéressante pour notre étude d'un point de vue physiopathologique. Assez tardifs par rapport aux autres symptômes dysautonomiques, les troubles vésicosphinctériens font autant intervenir la motricité somatique que la motilité autonome (cf. 1.5.1.) et les explorations fonctionnelles ne permettent pas d'interpréter les troubles en termes d'atteinte pré- ou postganglionnaire.

Les troubles vésicosphinctériens (nycturie, impériosités, pollakiurie ou incontinence) concernent entre 27 et 63,9% des patients [51, 52] et surviennent après les signes moteurs dans l'immense majorité des cas [53]. La dysfonction érectile affecte 79% des hommes et semble non corrélée à l'existence de troubles vésicosphinctériens [53]. Il s'agit pareillement d'un signe tardif, sa présence au stade prémoteur étant évocatrice d'une AMS.

L'anomalie principale à l'examen uro-dynamique est une hyperactivité du détrusor et un défaut de compliance vésicale [54], dont la physiopathologie renvoie surtout à l'atteinte du SNC en amont des centres sacrés [55]. La présence de larges résidus post-mictionnels et d'une ouverture du col vésical lors du remplissage évoque une AMS. Ces anomalies sont rares dans la MP, peut-être grâce à la préservation des neurones préganglionnaires lombosacrés [54]. Enfin l'électromyographie du sphincter strié montre des signes de dénervation chronique dans l'AMS par atteinte des motoneurones somatiques du noyau d'Onuf [56].

1.5 Manifestations cliniques et paracliniques de la dysautonomie d'expression digestive

Particulièrement fréquente et diverse, l'atteinte digestive de la MP semble trop importante pour être seulement due à la désafférentation autonome. Ses manifestations principales sont la constipation, les ballonnements et la dysphagie. Le rôle respectif de l'innervation intrinsèque et extrinsèque dans la pathogénie de ces troubles doit encore être éclairci.

1.5.1 Les fonctions d'interface : déglutition et défécation

Aux deux extrémités du tube digestif, des fonctions comme la déglutition et la défécation (et par extension la miction) résultent d'une coordination étroite et extrêmement régulée entre SNC, SNE et SNA. Ces trois systèmes sont potentiellement atteints dans la MP, rendant compte de la fréquence de la dysphagie oropharyngée et de la dyschésie ano-rectale. L'atteinte de la motricité somatique est parfois au premier plan [57] : la dysphagie du parkinsonien peut résulter d'un défaut de relaxation du muscle crico-pharyngien (muscle strié somatique), expliquant l'efficacité des myotomies crico-pharyngiennes [58] ; la dyschésie peut être secondaire à une dystonie du pubo-rectal (muscle strié somatique), mais également à une contraction anarchique du sphincter anal interne (muscle lisse) ou externe (muscle strié), à l'émoussement du réflexe recto-anal inhibiteur (réflexe à la fois intrinsèque et extrinsèque), ou à la combinaison des trois [30, 59].

Dans un effort de caractérisation de l'atteinte respective du SNA et du SNE, il est plus pertinent de centrer l'étude sur les segments du tube digestif sous contrôle autonome exclusif, pour s'abstraire de l'intervention de la motricité somatique. Ces segments sont la portion inférieure de l'œsophage, l'estomac et le côlon. Peu d'études sont disponibles, et la plupart ne prennent pas en compte les traitements antiparkinsoniens comme éventuel facteur confondant, ce qui les rend difficiles à interpréter compte tenu de la fonction inhibitrice connue de la dopamine sur la motilité digestive [60].

1.5.2 Atteinte œsophagienne

La majorité des études sur la dysphagie dans la MP sont centrées sur l'étage oropharyngé. Peu se sont intéressées à l'atteinte œsophagienne basse. A notre connaissance, en dehors de quelques cas rapportés, seules deux séries substantielles de patients parkinsoniens consécutifs (non sélectionnés sur des critères digestifs) ont fait l'objet d'une caractérisation manométrique [61, 62].

Des anomalies de la manométrie œsophagienne, mal corrélées à l'existence d'une dysphagie et non corrélées à la gravité de la MP, sont retrouvées chez 61 à 73% des patients. L'effet propre du traitement dopaminergique n'a pas été étudié. Les anomalies les plus courantes sont des spasmes œsophagiens diffus et un ralentissement du péristaltisme œsophagien (allant jusqu'à l'apéristaltisme chez 14% des patients de l'étude de Castell *et al.* [62]). Des contractions répétées de l'œsophage proximal et une hypertonie du sphincter inférieur de l'œsophage sont variablement retrouvées. Dans les deux études, l'hypertonie et apéristaltisme ne coexistent jamais, une association qui est propre à l'achalasie.

Pour autant la dysmotilité œsophagienne objectivée dans la MP partage certaines caractéristiques manométriques avec l'achalasie de l'œsophage [63], modèle de neuropathie du SNE [64]. Ces points communs **arguent en faveur d'une atteinte du SNE œsophagien**, qui s'ajouterait à la désafférentation vagale liée à l'atteinte du noyau dorsal du X. L'absence d'hypertonie du sphincter inférieur de l'œsophage pourrait être liée à l'absence de spécificité du processus dégénératif de la MP pour les neurones inhibiteurs, contrairement à ce qui est observé dans l'achalasie.

1.5.3 Gastroparésie

La gastroparésie est définie comme un retard à la vidange gastrique sans cause obstructive décelable. Le diagnostic est posé par transit scintigraphique, plus rarement par un test respiratoire après ingestion d'un nutriment marqué au ^{13}C (dosage du $^{13}\text{CO}_2$ dans l'air expiré). Les études publiées sur des séries de parkinsoniens ont pu être contradictoires, avec une tendance à l'allongement de la vidange gastrique très variable selon le statut sous/hors traitement et selon le stade de la maladie [30]. Une publication récente utilisant le test respiratoire au ^{13}C sur une large cohorte de 20 parkinsoniens non traités au stade initial, 40 parkinsoniens traités au stade évolué et 20 témoins tranche définitivement la question. **La vidange gastrique est retardée de façon constante et précoce chez les parkinsoniens**, indépendamment de la durée d'évolution et des traitements reçus, le plus souvent sans provoquer de symptôme.

Mais il existe des cas de gastroparésie sévère entraînant des complications vitales, chez une minorité de patients [65]. La MP représente 7,5% des cas de gastroparésie sévère d'un centre spécialisé, en quatrième position derrière le diabète, les causes idiopathiques et les causes post-chirurgicales [66]. Un suivi

épidémiologique longitudinal des cas de gastroparésie idiopathique pourrait déterminer si une proportion significative développe une MP.

Une étude électrogastrographique sur onze patients parkinsoniens présentant des signes de gastroparésie apporte quelques éléments en faveur de l'atteinte du SNE gastrique. L'électrogastrographie (EGG) est une technique d'électromyographie de surface détournée pour l'enregistrement transpariétal de l'activité myoélectrique de l'estomac [67]. L'enregistrement a lieu en décubitus, paroi abdominale relâchée. Le signal myoélectrique global est intégré, et de son spectre de puissance sont déduits la fréquence dominante, sensée représenter la fréquence des ondes lentes gastriques (norme 3/min), et la puissance à la fréquence dominante, sensée représenter la contractilité. La normalité est définie comme un pourcentage de dysrythmie (<2 ou >4 ondes lentes/min) inférieur à 30% de la durée de l'enregistrement et une augmentation de la puissance en postprandial [68]. Chez les onze patients examinés, l'EGG objective une dysrythmie variable et l'absence d'augmentation postprandiale de la contractilité. Les anomalies sont indépendantes des prises médicamenteuses [69]. Les auteurs interprètent ces résultats comme **liés à une atteinte intrinsèque**, et non comme de simples stigmates de dénervation vagale (qui se manifesterait par une réponse exclusivement dysrythmique, voire normale [67]). Il ne s'agit cependant que de conjectures : si l'EGG est performant pour établir le diagnostic de gastroparésie, son utilité pour discriminer son étiologie reste discutée.

1.5.4 Dysmotilité colique

La constipation ne répond pas ou est aggravée par le traitement dopaminergique [31] et contribue à la dégradation de la qualité de vie [34]. Des complications vitales consécutives à une pseudo-obstruction colique (syndrome d'Ogilvie) ou à un volvulus du sigmoïde sont décrites chez les parkinsoniens, témoignant de l'atonie parfois majeure du tube digestif [70, 71].

Le corrélat physiologique de la constipation semble être l'allongement du temps de transit colique (estimé par l'ingestion de radiotraceurs), même si cet allongement reste asymptomatique dans un grand nombre de cas [72]. L'allongement du temps de transit colique au cours de la MP a été retrouvé à maintes reprises, les durées variant beaucoup selon la méthodologie utilisée (revue dans [30]). Des techniques comme la manométrie ou l'EMG colique sur 24 heures, qui permettraient de préciser la physiopathologie des troubles, n'ont jamais été évaluées dans la MP.

Cela étant le ralentissement du temps de transit colique semble multifactoriel. Si les lésions du SNE peuvent être directement responsables de la dysmotilité colique [73], le ralentissement du temps de transit colique peut être secondaire à un obstacle organique ou fonctionnel consécutif à la dysfonction anorectale. En outre la diminution de la sensation de soif jouerait également un rôle dans la constipation, par l'intermédiaire d'une déshydratation chronique [37].

Contrairement aux autres étages du tube digestif, la sémiologie fonctionnelle colique est trop pauvre pour distinguer l'atteinte du SNE des autres causes potentielles de dysmotilité. En conséquence, **le temps de transit colique et la manométrie anorectale ne différencient pas MP et AMS**. L'atteinte des noyaux d'Onuf, qui appartiennent à la motricité somatique et hébergent les motoneurones destinés aux sphincters striés, est le seul paramètre physiologique du tractus digestif bas capable de distinguer l'AMS de la MP.

Comme au niveau de l'urètre, l'EMG du sphincter anal externe met en effet en évidence des signes de dénervation chronique dans l'AMS évoluée qui sont toujours absents dans la MP [74].

Si elles peuvent être pauci- ou asymptomatiques en début d'évolution, la dysautonomie en général et les perturbations digestives en particulier sont la règle dans la maladie de Parkinson à tous les stades. L'attention portée aux manifestations non-motrices a eu la vertu de déplacer l'attention des neuropathologistes sur les lésions non-dopaminergiques de la MP, et notamment sur celles responsables des signes précurseurs. Or les lésions responsables de la dysautonomie ont la propriété remarquable de se trouver pour partie en dehors du SNC. L'intérêt de leur étude est double : fondamental d'une part, car il s'agit de mieux comprendre une pathologie complexe qui ne se résume pas, notamment aux deux extrêmes de la maladie, à l'atteinte du neurone dopaminergique [75, 76] ; diagnostique de l'autre, car ces lésions situées hors de l'enceinte de la boîte crânienne et du canal médullaire sont éventuellement accessibles à la biopsie.

2 La révolution neuropathologique

When the peripheral autonomic system becomes central

Alphonse Probst, Artur Bloch et Markus Tolnay, *European Journal of Neurology*

A de rares exceptions près, les maladies neurodégénératives sont toutes caractérisées par des agrégats protéiques intra- ou extracellulaires, composés d'un assemblage éclectique de protéases et de protéines de l'inflammation, de protéines de membrane et du cytosquelette, de kinases et de phosphatases et de protéines chaperon [77, 78]. Une protéine prédomine toujours au sein des agrégats, et y forme généralement des polymères de structure amyloïde [79]. L'immunohistochimie est la technique incontournable permettant de les mettre en évidence et d'en identifier la nature.

L'agrégation de l'une parmi les 3 protéines suivantes est impliquée dans la majorité des maladies dégénératives connues, d'expression cognitive ou motrice : la protéine tau, l' α -synucléine et TDP-43 [80-82]. Chacune de ces protéines caractérise un groupe de maladies, et une classification moléculaire a été consacrée par l'usage : la MP se place dans le groupe des **α -synucléinopathies**, avec la démence à corps de Lewy (DCL), l'atrophie multi-systématisée (AMS) et quelques entités rares comme l'hypotension orthostatique idiopathique.

2.1 Neuropathologie élémentaire de la maladie de Parkinson

2.1.1 α -synucléine

L' α -synucléine, composant prédominant des corps de Lewy [81], est une protéine essentiellement neuronale (une expression gliale modeste existe), abondante dans le système nerveux, dont la fonction n'est encore qu'imparfaitement élucidée. Le terme synucléine reflète sa double distribution dans la membrane nucléaire et les terminaisons synaptiques [83]. Comportant 140 aminoacides, l' α -synucléine comprend à son extrémité N-terminale quatre séquences répétées amphipathiques, capables de s'organiser en hélices α , et formant un domaine de fixation aux lipides (figure 4). Ainsi son rôle supposé est-il lié à sa capacité de fixation aux membranes, notamment vésiculaires : régulation de l'exocytose au niveau présynaptique, en particulier dans les neurones catécholaminergiques [84] ; régulation du transport vésiculaire du réticulum endoplasmique vers le Golgi dans le périkaryon [85] (revue en référence [86]).

L'identification de l' α -synucléine dans les CL a fait immédiatement suite à la découverte d'une mutation responsable d'une forme génétique de MP, de transmission autosomique dominante, dans 4 familles méditerranéennes. Cliniquement et histologiquement indiscernables des formes sporadiques, ces MP sont liées à la mutation A53T sur le gène *SNCA* (4q21-22), qui code pour l' α -synucléine [87].

Le rôle de l' α -synucléine en pathologie est largement aussi méconnu. La surexpression de l' α -synucléine normale par effet de dosage génique semble suffire à induire la pathologie : c'est le cas des duplications ou

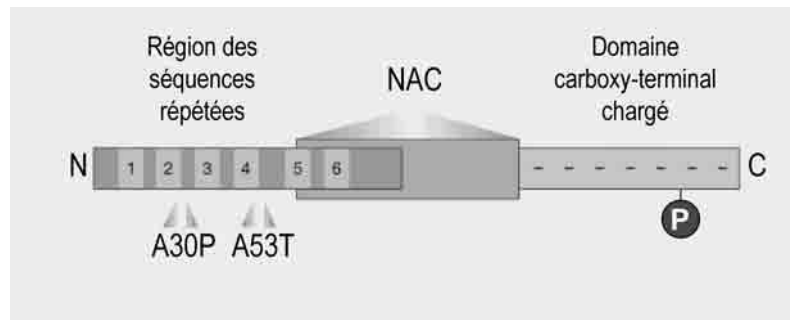


Figure 4. Structure de l'α-synucléine

Le domaine putatif de fixation aux lipides est constitué par un motif imparfaitement répété, représenté par les chiffres 1 à 6. Le domaine NAC (non-amyloid component) doit son nom au fait que cette portion tronquée de l'α-synucléine a été pour la première fois isolée dans les plaques séniles de la maladie d'Alzheimer. Les deux mutations les plus courantes associées à des maladies de Parkinson génétiques sont indiquées, de même que le site de phosphorylation sur sérine 129.

des triplications du gène SCNA normal responsables de MP génétiques [88]. La signification des agrégats fait l'objet d'une controverse entre partisans de leur rôle protecteur, par séquestration des protéines surexprimées ou anormales [89], et tenants de leur toxicité, par désorganisation du cytosquelette et perte de fonction de l' α -synucléine (figure 4).

L'agrégation de l' α -synucléine est précédée de modifications post-traductionnelles, dont la plus constante est la **phosphorylation de son résidu sérine 129** [90, 91], qui majorerait sa toxicité [89]. En immunohistochimie, les anticorps anti-phosphosynucléine 129 sont remarquablement spécifiques des inclusions et de l' α -synucléine insoluble. Une petite fraction de l' α -synucléine normale soluble est phosphorylée de façon physiologique [91].

2.1.2 Inclusions d' α -synucléine

Les inclusions cytoplasmiques d' α -synucléine sont **les corps et prolongements de Lewy**, dont la description princeps revient à Lewy en 1912, et la dénomination à Trétiakoff en 1919. Les CL peuvent être séparés, tant morphologiquement que spatialement, en deux entités : les CL classiques, du tronc cérébral, et les CL corticaux.

2.1.2.1 Corps de Lewy

Les corps de Lewy classiques (figure 5) sont des inclusions neuronales cytoplasmiques sphériques, mesurant 8 à 30 μ m de diamètre. Leur cœur éosinophile et hyalin en HE est circonscrit d'un halo pâle. Un neurone peut occasionnellement contenir plusieurs CL. Lorsqu'ils sont situés dans les neurones des noyaux pigmentés du tronc cérébral (noyau dorsal du vague [X], locus cœruleus et substance noire), l'HE suffit amplement à les identifier puisque l'inclusion refoule les pigments de neuromélanine [92] et apparaît alors nettement par contraste. **Les corps pâles**, plages éosinophiles optiquement vides situées au sein des pigments, seraient des précurseurs de CL [93]. **Les corps de Lewy corticaux** sont pareillement éosinophiles mais dépourvus de halo. Ils prédominent dans les couches profondes (V-VI) du cortex temporal, cingulaire ou insulaire. A l'inverse des précédents, ils sont difficiles à visualiser en HE et requièrent l'immunohistochimie.

Sur le plan ultrastructural, les agrégats de synucléine sont formés de filaments de 7 à 20 nm d'épaisseur organisés de façon radiaire, d'un matériel granulaire dense et de quelques structures vésiculaires. L'organisation amyloïde des filaments les rend discrètement affins pour la thioflavine S. A l'instar des autres agrégats, la composition des CL est riche : neurofilaments phosphorylés, protéines chaperon, ubiquitine et autres éléments du système ubiquitine-protéasome [78]. Cependant l'immunohistochimie de l' α -synucléine est la plus sensible et la plus spécifique.

Les CL classiques caractérisent surtout la MP, mais sont également présent en densité variable dans la DCL, et sont retrouvés dans les noyaux pigmentés du tronc cérébral, le noyau dorsal du vague et les noyaux cholinergiques du diencéphale (dont le noyau basal de Meynert). Les CL corticaux sont plutôt propres à la DCL et à la démence du Parkinson. Ils ont une prédilection pour les régions limbiques, en particulier l'amygdale (noyau basal et basal accessoire), et le cortex entorhinal, insulaire et cingulaire antérieur. Au sein du cortex, les CL prédominent dans les couches 5 et 6, les plus profondes, où tous les types de neurones peuvent être atteints.

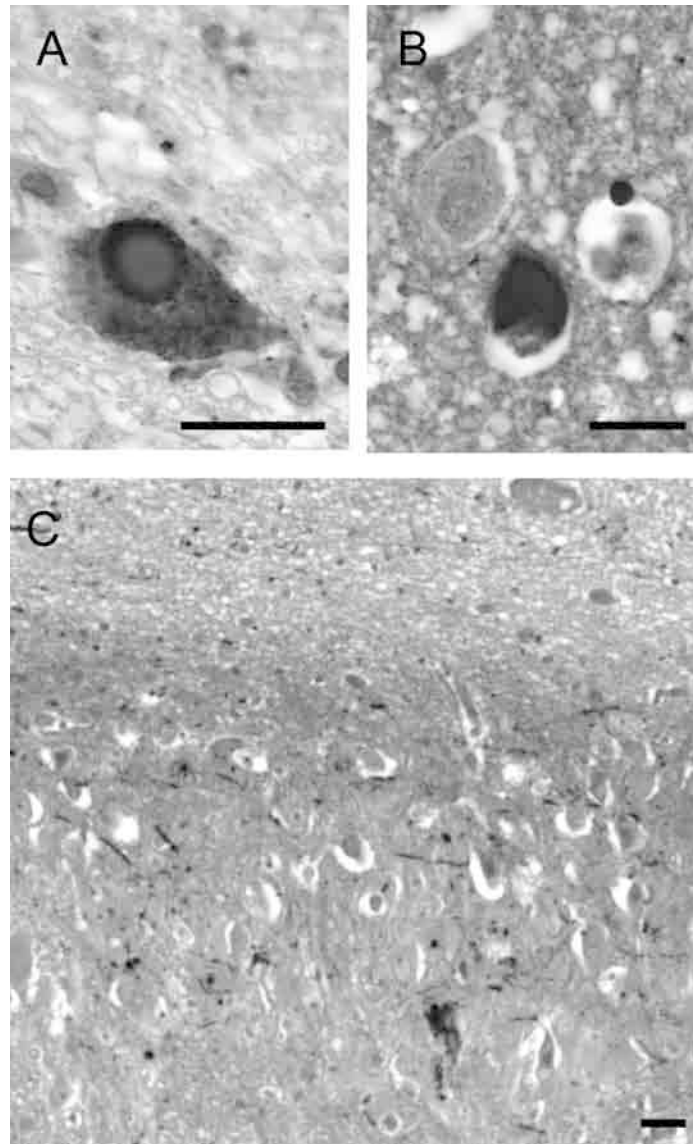


Figure 5. Lésions centrales de la maladie de Parkinson

Immunomarquage de l' α -synucléine (Syn-1) sur coupe de mésencéphale (A), d'isocortex temporal (B) et d'hippocampe (C). (détails). A. Corps de Lewy du tronc cérébral. B. Corps de Lewy cortical. C. Cortex hippocampique à la jonction CA2-CA3, montrant un marquage diffus physiologique de l' α -synucléine, et la présence d'une abondante pathologie neuritique (prolongements de Lewy). Echelle 40 μ m.

Les corps de Lewy ne sont pas spécifiques à la MP ou à la démence à corps de Lewy (DCL), et peuvent exister en tant que lésions élémentaires secondaires dans d'autres maladies dégénératives (maladie d'Alzheimer, paralysie supranucléaire progressive) ou chez des sujets cognitivement normaux [94], ce qui a été à l'origine de certaines controverses sur leur caractère véritablement pathogène. Pourtant des observations font état d'un nombre à peu près constant de CL dans les noyaux pigmentés du tronc cérébral (estimé à 4% des neurones dopaminergiques), qui diminue finalement quand disparaissent les derniers neurones : les inclusions d' α -synucléine auraient par conséquent une durée de vie limitée qui correspond à la survie du neurone porteur [95]. Il s'agit d'un argument fort en faveur de leur toxicité.

2.1.2.2 *Prolongements de Lewy*

Les neurites ou prolongements de Lewy sont des prolongements dystrophiques présentant la même immunoréactivité que les CL. Invisibles en HE, ils prédominent dans l'amygdale, les champs CA2 et CA3 de l'hippocampe et certains noyaux du tronc cérébral. L'apparition de l'immunomarquage de l' α -synucléine a révélé l'importance insoupçonnée de la pathologie neuritique dans la DCL, qui affecte même les régions normalement dénuées de CL (striatum, thalamus).

La nature axonale ou dendritique des prolongements de Lewy n'a pas fait l'objet de travaux spécifiques. Leur localisation au sein de faisceaux d'association, comme les fibres moussues du champ CA2/3 de l'hippocampe [96] ou le tronc du nerf vague [97] et la colocalisation des agrégats aux protéines présynaptiques [96] plaident en faveur **d'une pathologie d'abord axonale**. Au sein d'un même neurone, une progression des inclusions de l'axone au soma et enfin aux dendrites a été imaginée [98].

2.1.2.3 *Immunomarquage normal de l' α -synucléine*

Compte tenu de son abondance dans le système nerveux, l'immunomarquage normal de l' α -synucléine est diffus dans le cortex cérébral, prédominant dans les terminaisons présynaptiques ; il n'existe normalement aucun agrégat [95, 99].

2.1.3 Autres lésions

2.1.3.1 *Perte neuronale*

A notre connaissance, les seules études stéréologiques estimant la perte neuronale ont été effectuées dans la substance noire [100] ou dans certains noyaux du tronc cérébral (locus coeruleus), ce qui renvoie **au paradoxe des maladies neurodégénératives** : si la perte neuronale est leur essence, il s'agit du paramètre le plus difficile à mettre en évidence. Toutefois lorsqu'elle est sévère et survient dans des structures circonscrites comme dans les noyaux pigmentés du tronc cérébral, la destruction neuronale est aisément décelable. Dans la MP, la perte cellulaire dans le complexe du locus coeruleus-subcoeruleus [101] et dans le noyau dorsal du vague [6] est souvent massive.

Au sein de la SNpc, **la destruction prédomine dans sa portion ventrolatérale et caudale**, et respecte relativement au début sa portion dorsomédiale [7]. La susceptibilité à la dégénérescence des neurones dopaminergiques dépend de leur distribution au sein de compartiments de la SNpc définis par l'immunomarquage de la calbindin : la mort neuronale est plus importante dans les nigrosomes (régions pauvrement marquées par la calbindin) que dans la matrice (fortement marquée) [102, 103]. Dès lors, la perte neuronale évolue selon un gradient caudo-rostral, latéro-médial et ventro-dorsal.

2.1.3.2 Réaction gliale et microgliale

Une réaction astrogliale non spécifique accompagne la destruction des noyaux du tronc cérébral, révélée par l'immunomarquage de la protéine gliale fibrillaire (GFAP) [104]. Une activation de la microglie exprimant les marqueurs du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II est à l'origine de la libération locale de cytokines pro-inflammatoires. L'origine primaire ou réactionnelle de la microglie activée est très discutée ; ses effets semblent néanmoins plus délétères que bénéfiques [104, 105].

Des inclusions d' α -synucléine dans les astrocytes et les oligodendrocytes ont été rapportées mais paraissent indépendantes de la réaction gliale [106].

2.1.4 Diagnostic neuropathologique

D'un point de vue neuropathologique, deux critères sont nécessaires et suffisants au diagnostic de MP: il s'agit de la mise en évidence a) **d'une perte neuronale et d'une dépigmentation de la SNpc**, associée à b) **la présence de corps de Lewy (CL)** dans les neurones restants [95]. A ce jour encore, on estime que le diagnostic de certitude de maladie de Parkinson ne peut être posé qu'à l'autopsie. Ce dogme reste justifié pour corriger le diagnostic dans les formes atypiques de MP ; les critères diagnostiques actuels ont en effet une valeur prédictive positive excellente mais une sensibilité perfectible, estimée à environ 90% [107].

2.2 Progression des lésions centrales et corrélations anatomo-cliniques

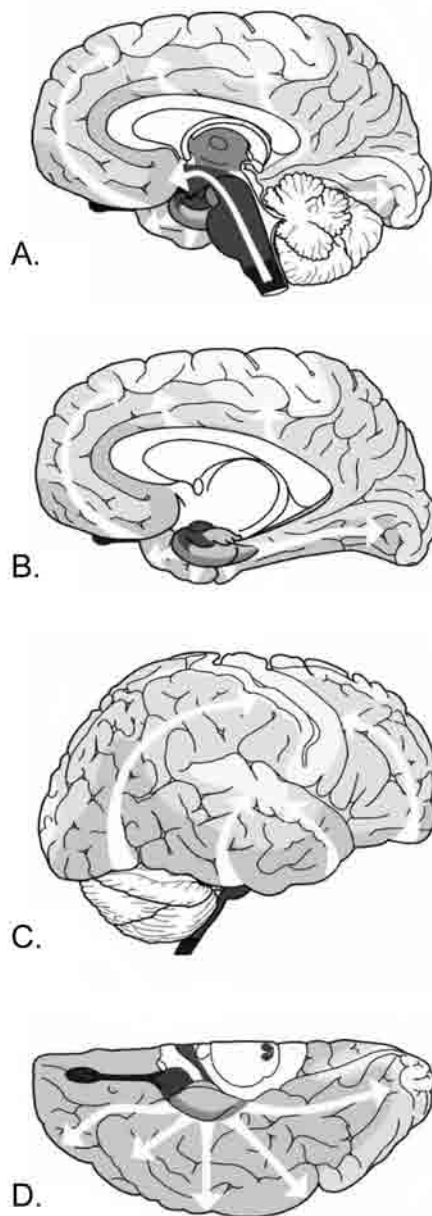
La présence d'inclusions d' α -synucléine chez de nombreux sujets sans atteinte neurologique identifiée est connue de longue date. L'hypothèse posée par Braak que ces lésions incidentes représentent les stades présymptomatiques de maladie à corps de Lewy (**maladies à corps de Lewy incidents**) a suscité une vaste étude neuropathologique qui élucide la progression temporo-spatiale grossièrement ascendante des inclusions [108]. Cette classification ne tient pas compte de la perte neuronale, ce qui lui a fréquemment été opposé [109, 110].

2.2.1 Lésions encéphaliques

2.2.1.1 Classification de Braak

Elle est le fruit d'une vaste étude transversale sur 168 patients classés en 3 groupes : MP, maladie à CL incidente et témoins [108]. L'esprit de ce travail, calqué sur la classification de la pathologie neurofibrillaire établie par le même auteur [111], est d'identifier, pour chaque région atteinte, les régions qui sont obligatoirement atteintes avec elle, et les régions qui le sont de façon facultative. Ainsi une progression temporo-spatiale peut être déduite avec une relative confiance. Le postulat de ce système est que les lésions ne régressent jamais et évoluent d'un seul tenant. Depuis, plus de 300 autopsies ont validé *a posteriori* la pertinence du classement [112].

Les premières lésions encéphaliques apparaissent dans le noyau dorsal du vague, le bulbe olfactif et les noyaux olfactifs antérieurs (stade 1), et gagnent les noyaux du raphé et le locus coeruleus (**stade 2**). Au **stade 3** le mésencéphale et notamment la substance noire sont touchés conjointement à certains noyaux de la base (noyau basal de Meynert) et à l'amygdale. Au **stade 4** l'atteinte de l'amygdale est massive, et



E.

	ndv	lco	sn	mcx	aap	aau
1						
2						
3						
4						
5						
6						

Les lésions surviennent initialement dans le noyau dorsal du vague (ndv) (**A, C**) et fréquemment (**A, D**) dans le noyau olfactif antérieur. Les lésions du tronc cérébral adoptent ensuite une course ascendante vers des régions moins vulnérables: locus coeruleus (lco) au stade 2, substantia nigra (sn) au stade 3 (**A**). Les lésions envahissent ensuite le cortex, commençant par le mésocortex temporal antéromédial (mcx) au stade 4 (**B**). Le néocortex est touché à son tour, à débiter par les aires associatives polymodales et le cortex préfrontal (aap) (**C, D**). Enfin les aires associatives unimodales, sensorielles et motrices (aau) terminent l'évolution. Le dégradé de couleurs représente l'évolution temporelle.

E: diagramme simplifié représentant l'expansion topographique. Le dégradé représente la sévérité de l'atteinte.

Figure 6. Progression temporo-spatiale des inclusions d'α-synucléine dans l'encéphale (d'après Braak)

s'accompagne de lésions du mésocortex temporal et de la corne d'Amon. Puis l'atteinte corticale gagne l'insula et le cortex cingulaire (**stade 5**) et le néocortex dans son ensemble (**stade 6**) (figure 6).

Cette classification fait actuellement l'objet d'un relatif consensus. Une simplification et une assimilation à la classification de McKeith pour le diagnostic neuropathologique de la démence à corps de Lewy a récemment été proposée [113]. Le schéma de progression spatio-temporel a néanmoins été critiqué par plusieurs équipes [109, 114-116]. Si Braak et collaborateurs admettent eux-mêmes de rares cas déviants, des séries neuropathologiques postérieures montrent que de 18,3% [117], à 47% [116] des cas ne correspondent à aucun des 6 stades de Braak. Dans ces deux séries **le noyau dorsal du vague est épargné dans 8,3 et 7% des cas**, respectivement. Plus troublant, dans une série neuropathologique récente, 51% des cas présentaient des inclusions d' α -synucléine dans une région quelconque du cerveau en l'absence d'atteinte du noyau dorsal du vague [118]. Les caractéristiques de la population de cette étude, beaucoup plus âgée que dans les autres séries (75 % ont plus de 80 ans), et dont 50 % des patients étaient déments au moment du décès, rendent probablement compte des divergences.

La progression lésionnelle dans la démence à CL reste en effet l'une des inconnues de l'équation. Elle pourrait calquer celle de la MP, l'évolution vers un phénotype cognitif ou moteur reflétant alors une sensibilité différente des structures limbiques ou du tronc cérébral au processus dégénératif [112]. Alternativement, la pathologie pourrait débuter dans l'amygdale et envahir le tronc cérébral de façon descendante [119]. Dans une étude récente sur différents types de maladies à corps de Lewy, cette prédilection amygdalienne était plutôt le fait des maladies d'Alzheimer avec corps de Lewy que des authentiques démences à CL [120]. En somme, **le modèle de Braak semble valide dans la majorité des cas, à l'exception de ceux où les corps de Lewy sont une pathologie satellite d'un autre processus dégénératif**.

2.2.1.2 Corrélations anatomo-cliniques

Même si elle connaît des exceptions, la classification de Braak permet de rendre compte de la totalité des signes précurseurs de la MP [121] (tableau 2). Faute de corrélation anatomo-clinique fiable pour la plupart, le lien entre inclusions d' α -synucléine dans le tronc cérébral et signes précurseurs reste à l'état d'hypothèse.

Au stade 1, l'atteinte du noyau dorsal du vague (cholinergique) contribuerait aux troubles digestifs et dysautonomiques, mais cet aspect sera développé plus loin. Le déficit olfactif appartient aux manifestations non motrices de la MP à la phase d'état [122]. Il est également un signe précurseur : chez les apparentés au premier degré d'un parkinsonien, le risque de développer une MP s'élève à 10% au moins s'ils sont hyposmiques, et est inférieur au risque de la population générale si l'olfaction est préservée [123]. Ainsi il est tentant de relier ces troubles de discrimination olfactive à la présence des inclusions dans le bulbe et les noyaux antérieurs. L'hyposmie est un caractère partagé par l'ensemble des synucléinopathies et d'autres pathologies dégénératives comme la maladie d'Alzheimer.

Au stade 2, l'atteinte du noyau subcœruleus (cholinergique) expliquerait la survenue de troubles du sommeil paradoxal, dont l'initiation dépend chez l'animal de structures proches dans le tegmentum méso-pontin [124]. Un suivi longitudinal sur plus de 5 ans d'une cohorte de 44 patients montre que 40% d'entre eux développent une synucléinopathie [125]. Selon une étude postérieure du même type, le risque de développer une maladie neurodégénérative est moindre à 5 ans (17,7%) mais s'élève à 52,4% à 12 ans ; il

Stade de Braak	Région anatomique	Corrélations cliniques
1	Bulbe olfactif, noyaux olfactifs antérieurs	Hyposmie, anosmie
	Noyau dorsal du vague, système nerveux entérique	Constipation, gastroparésie
	Neurones sympathiques pré et post ganglionnaires	Troubles génito-urinaires, hypotension orthostatique
	Corne dorsale de la moelle épinière	Douleurs
2	Complexe cœruleus/subcœruleus, noyaux réticulaires	Troubles du sommeil paradoxal, dépression
3	Substance noire	Akinésie, bradykinésie, rigidité
	Amygdale (noyau central), noyau pédiculopontin, aire tegmentale ventrale, noyaux cholinergiques du diencephale	Dysautonomie, syndrome dysexécutif
4	Mésocortex temporal	Syndrome dysexécutif, apathie, troubles mnésiques
	Amygdale (noyau basolatéral)	Troubles émotionnels
5	Isocortex associatif multimodal (préfrontal notamment)	Agnosie, apraxie
6	Isocortex associatif unimodal, isocortex primaire	Dysfonctions sensorimotrices

Tableau 2. Corrélations anatomocliniques putatives de la classification de Braak

s'agit dans 85% des cas d'une synucléinopathie, principalement MP et démence à CL, et dans le reste des cas d'une démence attribuée à la maladie d'Alzheimer [126]. En somme, **les troubles du comportement en sommeil paradoxal sont un signe précurseur relativement spécifique**. La classification de Braak est encore confortée par l'observation que plus d'un tiers des patients souffrant de troubles du sommeil paradoxal ont des difficultés de discrimination olfactive [127], et que deux tiers présentent des signes de dysautonomie [128].

L'atteinte du locus coeruleus noradrénergique pourrait contribuer à la dépression et aux troubles anxieux qui inaugurent quelquefois la maladie [129]. En imagerie fonctionnelle, le syndrome dépressif dans la MP est associé à un déficit de l'innervation noradrénergique et dopaminergique limbique [130]. Le locus coeruleus, atteint au stade 2, et l'aire tegmentale ventrale, atteinte au stade 3, en sont respectivement l'origine.

Des corrélations supplémentaires peuvent être établies aux stades supérieurs, notamment avec l'atteinte cognitive (tableau 2).

2.2.2 Lésions médullaires

L'atteinte de la moelle épinière dans la MP était connue [131] mais a été redécouverte peu après la publication des travaux de Braak, avec un intérêt nouveau pour sa chronologie. La progression ascendante des lésions au niveau du tronc cérébral évoque en effet la possibilité d'une atteinte médullaire primitive.

Dans la moelle épinière des parkinsoniens, les inclusions d' α -synucléine prédominent au niveau **de la corne intermédiolatérale** qui contient les neurones préganglionnaires cholinergiques, à l'étage thoracique [132] (système sympathique) comme à l'étage sacré [133] (système parasympathique). Il s'agit essentiellement de prolongements de Lewy et d'inclusions punctiformes immunoréactives pour l' α -synucléine. D'autres structures sont affectées, comme la lame I de Rexed au niveau de la corne dorsale et les bords latéraux des cornes dorsale et ventrale [134]. Des prolongements dystrophiques relient la lame I à la colonne intermédiolatérale. Occasionnellement les neurones multipolaires de la corne intermédiolatérale sont marqués dans le péri-karyon ou l'ensemble du cytoplasme. Rarement ce marquage granulaire s'organise en véritables CL.

Deux études simultanées parues en 2006 s'intéressent à la chronologie de l'atteinte médullaire [132, 133]. Deux séries de 13 et 17 cas de maladie à CL incidente sont issues de cohortes de 106 et 98 cas autopsiques sans atteinte neurologique clinique (soit une prévalence élevée de 12 et 17% de maladie à corps de Lewy incidente). L'atteinte médullaire y est fréquente dans la première série (9/13), constante dans la deuxième (17/17). Sur les deux cohortes, l'atteinte de la moelle était toujours associée à celle du noyau dorsal du vague. Ces éléments suggèrent **que la moelle est atteinte simultanément ou aussitôt après le noyau dorsal du vague**, c'est-à-dire aux stades 1 et 2 de Braak.

L'atteinte des centres végétatifs de la moelle épinière contribue sans doute à la dysautonomie et aux troubles digestifs qui seront traités ci-après (tableau 2). L'hypothèse que l'atteinte de la lame I de Rexed serait l'une des causes des douleurs de la MP est plus inédite [134]. A ce niveau convergent en effet toutes les afférences douloureuses du métamère véhiculées par les fibres C. Si les douleurs ou paresthésies mal systématisées sont fréquentes dans la MP, il ne s'agit pas d'un signe précurseur habituel, peut-être faute de le rechercher.

2.3 Atteinte du système nerveux périphérique

Au début des années 80, quelques observations de corps de Lewy dans les ganglions végétatifs et les plexus intrinsèques sont publiées sans déclencher d'intérêt majeur. A la lumière des travaux récents montrant l'atteinte des centres végétatifs du tronc cérébral et de la moelle épinière dès le stade 1 de Braak, la barrière anatomique (et psychologique) séparant le SNC du système nerveux périphérique tombe et les publications sur le sujet se multiplient.

2.3.1 Atteinte du système nerveux autonome

2.3.1.1 Des inclusions dans le contingent périphérique du SNA

Avant l'avènement de l'immunomarquage de l' α -synucléine, le premier inventaire exhaustif des corps de Lewy est celui de Wakabayashi *et al.* [131], qui montre que l'ensemble des structures périphériques du SNA peuvent être affectées dans la MP : des inclusions éosinophiles sont retrouvées dans les ganglions sympathiques, dans le plexus sacré, dans le plexus cardiaque et même dans la glande surrénale.

La sensibilité supérieure de l'immunohistochimie de l' α -synucléine pour mettre en évidence les inclusions axonales [81] révèle une atteinte beaucoup plus vaste. Chez les patients parkinsoniens les corps ou prolongements de Lewy peuvent être trouvés **dans les nerfs rachidiens et périphériques** (où l'on suppose que les prolongements porteurs d'inclusions sont des fibres végétatives), **dans les fibres préganglionnaires des nerfs splanchniques et du nerf vague, dans les ganglions sympathiques pré- et paravertébraux et dans les fibres postganglionnaires** [133-136]. Il persiste une incertitude sur l'atteinte des fibres afférentes autonomes qui semblent épargnées.

Des inclusions de Lewy peuvent être retrouvées dans des emplacements plus insolites pourvu que s'y trouve une innervation végétative. Elles sont présentes de façon diffuse dans la médullaire et le cortex de la surrénale [137], et plus rarement dans l'innervation sympathique cutanée : suite à la démonstration d'une dénervation cutanée sympathique sur des biopsies cutanées [138, 139], des inclusions ont été retrouvées dans les fibres nerveuses amyéliniques sympathiques du derme chez 70% des patients parkinsoniens autopsiés [140].

Pendant de l'étude princeps de Wakabayashi, le travail de Beach *et al.* effectue une cartographie exhaustive des inclusions de Lewy dans l'ensemble des tissus nerveux chez 26 patients atteints de maladies à CL (17 MP et 9 démences à CL) [141]. **L'immunohistochimie de l' α -synucléine phosphorylée** est utilisée pour révéler les inclusions [90, 91]. En dehors de l'encéphale, les régions les plus affectées sont la moelle épinière (25 des 26 sujets analysés), particulièrement à l'étage thoracique et sacré qui contiennent les centres végétatifs ; puis viennent les ganglions sympathiques (19/24), le nerf vague (15/21), le tractus digestif sur lequel nous reviendrons, le nerf sciatique (10/22) et le système endocrinien (5/14). D'autres organes peuvent être inconstamment atteints. Ces chiffres ont été obtenus par l'analyse d'une lame unique pour chaque tissu d'intérêt. L'augmentation du nombre des lames (5 par site) augmente encore la sensibilité [141].

Ainsi les lésions du contingent périphérique du SNA sont ubiquitaires à la phase d'état. Le SNE, troisième subdivision du SNA et vraisemblablement la plus importante en termes de nombre de neurones, mérite une attention particulière.

2.3.2 Atteinte du système nerveux entérique

2.3.2.1 Premiers travaux (historique)

Il est troublant *a posteriori* que le premier article rapportant la présence de CL dans le SNE, signé par Qualman *et al.* en 1984 [142], compare MP et achalasie, assimilant déjà la MP à une neuropathie digestive. Dans cette étude autopsique, des CL et une perte neuronale sont mis en évidence dans le plexus myentérique (PM) œsophagien de 2/8 patients atteints d'achalasie et de 2/3 patients parkinsoniens dysphagiques. Malgré des études histologiques poussées [143], la présence d'inclusions dans les neurones entériques n'a pas été confirmée depuis dans l'achalasie. En réalité, l'un des deux cas présente des CL dans le noyau dorsal du vague et serait aujourd'hui considéré comme une maladie à CL incidents (stade 1 de Braak) ; l'autre correspond probablement aussi à une phase présymptomatique. Il faut rendre hommage à Qualman d'avoir assimilé les inclusions éosinophiles sphériques des neurones entériques aux CL du SNC, ce que confirmera plus de dix ans plus tard l'immunohistochimie.

En 1987 Kupsky, de façon tout aussi visionnaire, étudie une pièce d'exérèse chirurgicale colique chez un patient parkinsonien souffrant d'un mégacôlon idiopathique [144]. Des CL sont détectés dans le plexus sous-muqueux (PSM) et dans le PM coliques, à la fois sur une biopsie rectale préliminaire et sur la pièce. Ce deuxième travail évoque déjà le caractère pathogène des inclusions, auxquelles on attribue la dysmotilité colique.

Wakabayashi dresse l'inventaire des CL dans l'ensemble du tube digestif à partir de 1989 [145-148], avant de s'adresser au SNA dans sa totalité [131]. Les 7 patients parkinsoniens qu'il autopsie présentent des inclusions dans les neurones entériques [147] ; potentiellement trouvés à chaque étage du tractus digestif, de l'œsophage haut au rectum, les CL sont très inconstants au sein d'une même région, à l'exception notable **du PM de l'œsophage bas où leur densité est majeure**. Des CL en densité moindre sont présents chez 8/24 témoins sans atteinte neurologique, un chiffre qui paraît surévalué à la lumière des travaux actuels. Le développement de l'immunohistochimie permet à Wakabayashi d'identifier des neurones entériques immunoréactifs pour la TH, qu'il pense logiquement être les neurones porteurs d'inclusion [148]. Il se dément lui-même dans un travail postérieur [149] qui semble montrer le phénotype VIPergique des neurones et des prolongements atteints.

Enfin Singaram *et al.* [150] publient en 1995 des résultats ambigus qui paraissent en contradiction avec les précédents : dans le côlon de patients atteints de MP, malgré une proportion normale de neurones TH-positif (le caractère dopaminergique obligatoire de ces neurones TH intrinsèques sera démontré par la suite [151]), une déplétion majeure en dopamine est objectivée par immunomarquage et par chromatographie liquide. La spécificité des CL pour les neurones VIPergique est remise en question par l'atteinte apparente des neurones dopaminergiques, à moins d'une co-expression VIP-TH [150]. La déplétion en dopamine pourrait cependant ne refléter que l'atteinte des fibres noradrénergiques par la dénervation sympathique : dans le SNC la dopamine est présente en abondance dans les projections noradrénergiques [152]. En outre la densité neuronale ne diffère pas significativement entre patients et témoins.

Après ces quatre séries de publications, plus de dix années s'écoulent dans une relative indifférence pour le SNE et la MP. Depuis six ans, dans la foulée des travaux de Braak, le SNE éveille à nouveau l'intérêt des neurosciences.

2.3.2.2 *Etudes actuelles*

L'avantage des travaux récents sur les études antérieures est de disposer de l'immunohistochimie de l' α -synucléine [81], qui est la plus sensible et spécifique pour les corps et prolongements de Lewy. Une pathologie neuritique est ainsi mise en évidence par Braak en 2006 dans le plexus myentérique et sous-muqueux de l'estomac [135]. **Les prolongements de Lewy étant dispersés, les auteurs ont recours à des coupes épaisses et répètent l'analyse plusieurs fois par bloc.** Les CL sont présents principalement dans le plexus myentérique. Les prolongements marqués ont une morphologie axonale, et sont fréquents dans la sous-muqueuse, immédiatement sous-jacents à la muqueuse digestive qu'ils semblent innervier. Certains ont un aspect dystrophiques avec des varicosités et des dilatations. Ces inclusions sont présentes à tous les niveaux de l'estomac, du fundus au pylore. Sur les 5 cas de maladies à CL analysés dans cette étude, tous présentent des lésions à une densité comparable, qu'il s'agisse de stades présymptomatiques (stades 1-2 de Braak) ou de maladies de Parkinson avérées. Aucune inclusion n'est visible chez 5 témoins indemnes de pathologie centrale.

Dans le travail de caractérisation exhaustive de Beach, des inclusions de Lewy sont retrouvées dans le système nerveux entérique chez 16 des 26 patients (62%) atteints de maladie à corps de Lewy. Comme dans l'étude précédente, la recherche des inclusions est potentialisée par la multiplication des coupes en paraffine (environ 5 μ m d'épaisseur) et l'utilisation de coupes épaisses (coupes congelées de 80 μ m au niveau de l'œsophage bas et des glandes sous-mandibulaires). En combinant ces deux méthodes, **des inclusions sont retrouvées chez 22 des 23 patients testés (96%)**. Les deux sites préférentiels de la pathologie de Lewy dans le SNE sont **l'œsophage bas et la glande submandibulaire**. L'œsophage supérieur est remarquablement épargné. En aval du tractus digestif, il existe un clair **gradient oro-anal** en termes de fréquence comme de densité des inclusions, le rectum étant le moins affecté (6% de positivité avec l'analyse en lame unique, contre 22% dans l'estomac et 33% dans l'œsophage sur l'ensemble des prélèvements de l'étude). A tous les étages, le PM semble plus atteint que le PSM [141].

En revanche, à l'exception de l'étude de Singaram montrant l'absence de différence de densité neuronale entre patients et témoins et des travaux de Wakabayashi mentionnant une destruction du PM de l'œsophage bas, **aucun travail récent ou ancien ne s'est attaché à rechercher une perte neuronale dans le SNE.**

En retenant les inclusions comme critère, l'atteinte du SNA en général et du SNE en particulier est donc constante dans la MP. Les travaux les plus récents reprennent la méthodologie de Braak pour établir la chronologie de l'atteinte du SNA et du SNE.

2.3.3 Chronologie de l'atteinte des systèmes nerveux autonome et entérique

2.3.3.1 *Maladies à CL incidents*

L'étude des **maladies à CL incidents**, c'est-à-dire comportant des CL dans le SNC mais sans signe de MP au moment du décès, montre que des lésions sont déjà présentes dans le nerf vague (75% des cas), dans

les ganglions paravertébraux (82% des cas) [133] et dans la glande surrénale (23% des cas) [137]. La série de Beach, qui s'impose à ce jour comme le travail de référence, comporte également 7 cas de maladie à CL incidents [141]. Les inclusions de Lewy périphériques y sont retrouvées dans un nombre de tissu plus restreint que dans les MP avérées : ils incluent les ganglions sympathiques (3/6), le nerf vague (2/7) et quelques autres tissus dont le tractus digestif. Au niveau de la moelle épinière, l'étude de 5 lames plutôt que d'une seule à chaque étage fait passer le seuil de détection des inclusions de Lewy de 1/6 à 5/6 patients. Une augmentation de la sensibilité est également obtenue lors de l'analyse des structures périphériques [141]. En somme, dès les premiers stades de maladie à corps de Lewy diffus, il existe **une implication large mais éparse du système nerveux périphérique** requérant une analyse pointilleuse.

Les travaux de Orimo appliquent la méthodologie décrite par Braak à l'innervation autonome du cœur en analysant 20 cas de maladies à CL incidentes (Braak $\leq$ III), 10 de MP (Braak $\geq$ III) et 10 témoins (cas autopsiques indemnes d'inclusions dans le SNC) [153, 154]. Les inclusions d' α -synucléine phosphorylée y sont recherchées dans les nerfs épicaux (constitués de fibres sympathiques postganglionnaires) et les ganglions sympathiques paravertébraux. Deux éléments supplémentaires distinguent ce travail remarquable : l'évaluation de la perte axonale sympathique par immunomarquage de la TH ; l'étude comparative de 20 cas d'AMS. Les résultats sont édifiants : dans les maladies à CL, les premiers agrégats d' α -synucléine sont décelés dans les fibres postganglionnaires et le myocarde. La progression des agrégats jusqu'au ganglion sympathique coïncide avec la dégénérescence des fibres postganglionnaires (diminution de l'immunoréactivité TH et aspect dystrophique). A un stade ultérieur, correspondant à l'entrée dans la MP, la densité des agrégats augmente dans le ganglion para-vertébral et diminue dans les fibres postganglionnaires à mesure que celles-ci disparaissent. Dans l'AMS, le neurone postganglionnaire est épargné dans la majorité des cas, confirmant la conception classique d'une dysautonomie principalement centrale. Une publication presque simultanée confirme sur 11 cas de maladies à CL incidents et 14 cas de MP qu'il existe **une atteinte prémotrice constante de l'innervation sympathique du cœur**, qui s'aggrave à mesure de la progression de la maladie [155].

Parmi les études consacrées au SNE dans les maladies à corps de Lewy incidents, la plus importante rassemble 17 cas. Quatorze cas sur 17 (82%) présentent des inclusions dans le PM de l'œsophage [133]. Dans le travail de Beach des inclusions ne sont identifiées que dans 1 cas sur 7 de maladies à corps de Lewy incidents, mais seule l'analyse en lame unique a été réalisée [141].

Ces données appuient l'idée d'une atteinte précoce mais éparse du SNE, simultanée à l'atteinte des centres autonomes médullaires, et évolutive à mesure de la progression encéphalique de la MP. L'atteinte centripète au sein du SNA suggère en outre que la pathologie périphérique précède les lésions centrales.

2.3.3.2 L'atteinte des systèmes nerveux autonome et entérique est-elle antérieure à la pathologie centrale ?

La classification proposée par Braak en 2003 pour décrire la progression des lésions encéphaliques a été successivement enrichie par l'identification de lésions médullaires et la redécouverte du système nerveux autonome. Faut-il pour autant concevoir un stade -2 pour désigner l'atteinte autonome périphérique et un stade -1 pour celle des centres végétatifs de la moelle ? Rien n'est moins sûr...

A ce jour, **aucune description convaincante de synucléinopathie périphérique ou médullaire survenant en l'absence de pathologie encéphalique n'a été rapportée** [141]. L'unique exception à notre connaissance est un cas unique de synucléinopathie de la glande surrénale sans atteinte parallèle du SNC au sein d'une série autopsique de 783 patients [137]. Mais l'analyse exhaustive de ce cas singulier n'a pas été effectuée, ce que l'on aurait pu souhaiter compte tenu des implications sur la physiopathologie de la MP. Mais cette exception ne doit pas occulter que 86 des 87 cas de synucléinopathie surrénalienne étaient associés à une atteinte centrale.

Les quelques données disponibles suggèrent en effet l'atteinte conjointe obligatoire du système nerveux autonome périphérique, médullaire et des noyaux pigmentés du tronc cérébral. L'étude de Bloch, rassemblant 17 maladies à CL incidents parmi 98 cas autopsiques, est particulièrement démonstrative de ce point de vue : contrairement aux autres études, le dépistage méthodique des inclusions d'alpha-synucléine n'est pas effectué uniquement dans l'encéphale, mais également dans la moelle épinière, les chaînes sympathiques, le nerf vague et l'œsophage bas [133]. Les enseignements sont multiples : la plupart des cas de maladie à CL incidents atteignent le stade 2 de Braak, avec une atteinte débutante du complexe coeruleus-subcoeruleus ; la moelle épinière et le SNA ne sont jamais atteints de façon isolée, c'est-à-dire en l'absence de pathologie encéphalique ; à tous les stades, la pathologie prédomine (en termes de densité des inclusions) au niveau du noyau dorsal du nerf vague, comme s'il s'agissait du site d'induction obligatoire de la synucléinopathie [133].

Au sein du SNA, le SNE semble constamment atteint, notamment au niveau de la glande submandibulaire et du PM de l'œsophage inférieur, dès lors qu'il existe une pathologie périphérique [141].

2.3.3.3 Prévalence et signification des maladies à corps de Lewy incidents

La prévalence des maladies à corps de Lewy incidents dans les études autopsiques systématiques réalisées chez des sujets indemnes de pathologie neurologique peut paraître impressionnante : 17,3% dans l'étude susmentionnée (98 sujets ; âge moyen au décès 81 ans) [133] ; 26,4% dans l'étude de Fumimura sur les glandes surrénales (783 sujets ; 81 ans) [137]. Lorsque le screening concerne les structures du système nerveux autonome périphérique, la variabilité est plus importante : 11,1% de pathologie surrénalienne dans les autopsies tout-venant [137] ; 9% de synucléinopathie dans une série de 100 pièces d'exérèse chirurgicale abdominopelvienne marquées pour l'alpha-synucléine (âge moyen 67 ans), dont 3,9% dans les tissus digestifs et 26,1% dans les tissus vésico-prostatiques [156] !

Ce dernier chiffre suscite des interrogations et mérite d'être confirmé par des études analogues (rôle de la pathologie sous-jacente ? spécificité de la prostate qui exprime de façon physiologique d'autres marqueurs neuronaux [157] ?). Mais ces résultats peuvent être mis en relation avec la prévalence des lésions de type Alzheimer chez le sujet âgé : dans une série de 134 sujets âgés cognitivement indemnes au moment du décès [158], seuls 3% étaient dépourvus de lésions de type Alzheimer et la pathologie neurofibrillaire atteignait les stades limbiques de la première classification de Braak (stades 3-4) [111].

Quelle est la signification des CL incidents ? Le modèle de progression temporo-spatiale proposé par Braak pose des questions méthodologiques. Dédire une chronologie et un lien de causalité à partir d'études autopsiques nécessairement transversales et à vocation descriptive revient à étudier le vieillissement en étudiant les photographies de personnes d'âges différents. Si de grandes lois peuvent être dégagées (la

calvitie est un phénomène plus tardif que le port de lunettes), il devient aventureux de prédire que la presbytie débutante du voisin annonce la chute de ses cheveux. Les troubles du comportement en sommeil paradoxal, habituellement associés à une synucléinopathie affectant le locus subcœruleus (stade de Braak ≥ 2) [159, 160], peuvent par exemple rester isolés plus de 25 ans avant l'apparition de signes neurologiques [126, 161]. Il est donc difficile d'un point de vue clinique de considérer ces corps de Lewy incidents comme une maladie de Parkinson prémotrice.

Dennis Dickson affirme le contraire dans une étude sur 12 cas de maladies à CL incidents en montrant qu'il existe déjà à ce stade une dénervation dopaminergique striatale et une perte neuronale dans la substance noire. Néanmoins presque tous les cas de cette série atteignent le stade 3 de Braak, et ont déjà une MP au sens neuropathologique du terme (perte cellulaire et corps de Lewy de la substance noire). Il serait plus pertinent d'effectuer la même étude à des stades inférieurs, pour voir si la dénervation dopaminergique précède la formation des inclusions.

Mais la signification de ces lésions incidentes ne pourra être réellement appréhendée que par un suivi longitudinal. Minguez-Castellanos *et al.* prétendent relever le défi en suivant prospectivement des sujets chez lesquels des CL incidents ont été retrouvés dans des pièces d'exérèse chirurgicale digestives ou urogénitales [156]. Six patients avec inclusions (essentiellement prostatiques) et 10 témoins sont inclus et certains sont suivis jusqu'à 30 mois. Chez 4 des 6 sujets qui se sont soumis à une scintigraphie au MIBG, il existe à 16 mois une dénervation cardiaque sympathique significativement supérieure au groupe témoin ; un patient présente des troubles du sommeil paradoxal, un déficit olfactif et une dénervation striatale en scintigraphie. A 30 mois, le score à l'UPDRS moteur s'aggrave insidieusement chez 3 patients... Cette étude, qui n'est pas sans soulever des questions éthiques, reste unique en son genre et mérite d'être confortée par le suivi au long cours d'une plus large cohorte. C'est souligner **la nécessité de biomarqueurs histologiques de la MP**, capables de mettre en évidence ces inclusions de Lewy *in vivo*.

2.4 L'hypothèse de Braak

Les découvertes scientifiques majeures de ces dernières années doivent beaucoup à l'essor de la biologie moléculaire, et la recherche sur la MP en a largement bénéficié. Dans ce contexte, il est troublant que de « simples » études histopathologiques aient révolutionné en l'espace de cinq années la conception de la maladie.

Ainsi les travaux fondateurs de Heiko Braak dévoilent en 2003 la diffusion ascendante de la maladie dans l'encéphale. En 2006, cette progression temporo-spatiale est complétée en amont par l'étude de la moelle épinière, focalisant l'attention sur les centres végétatifs.

Le nouveau scénario s'affranchit de l'atteinte présumée centrale du neurone dopaminergique et pointe le système nerveux autonome comme porte d'entrée de la maladie dans le SNC. L'hypothèse inédite d'un processus dégénératif débutant dans le système nerveux périphérique et gagnant le SNC par l'intermédiaire des voies autonomes voit le jour [135, 136].

Dans la première publication utilisant l'immunohistochimie de l' α -synucléine dans le SNE [135], Braak va plus loin en postulant que le PSM du SNE puisse représenter le premier maillon d'une chaîne d'évènements

neurodégénératifs menant au SNC. Sa proximité avec la barrière épithéliale digestive, dont il régule les fonctions, suggère **qu'un neurotoxique ingéré** puisse être l'évènement initiateur. La pathologie progresserait par voie axonale rétrograde jusqu'aux centres autonomes, au premier plan desquels le noyau dorsal du vague. Le neurotoxique pourrait également être inhalé, rendant alors compte de l'atteinte précoce du bulbe olfactif.

Pour séduisante qu'elle soit, cette hypothèse centrée sur le SNE est battue en brèche par plusieurs observations. A ce jour, aucune inclusion entérique d' α -synucléine n'a été décrite indépendamment d'une atteinte centrale, comme si la dégénérescence survenait d'emblée simultanément dans les centres autonomes et dans le SNE. L'étude du SNA dans son ensemble démontre en outre que le SNE n'est que le cas particulier d'un processus dégénératif global, qui s'il semble effectivement centripète affecte l'ensemble du système, des fibres sympathiques cutanées au plexus prostatiques.

Dans ce contexte l'étude du SNE a-t-elle toujours un sens ? Assurément oui. De par sa densité, sa complexité comparable à celle du SNC, le SNE pourrait reproduire la pathologie centrale dans un centre nerveux directement accessible à la biopsie, ouvrant des possibilités inégalées pour l'expérimentation et le diagnostic. Quand bien même le SNE ne serait qu'un plexus intrinsèque atteint parmi d'autres, sa physiologie passionnante et les répercussions cliniques de son atteinte justifient pleinement qu'on s'y intéresse en premier lieu.

3 Le système nerveux entérique

*The enteric nervous system is a curiosity,
a remnant of our evolutionary past that has been retained.
[But it is as well] a vibrant, modern data-processing center
that enables us to accomplish some very important
and unpleasant tasks with no mental effort.*
Michael Gershon, *The Second Brain*

L'hypothèse de l'atteinte précoce du SNE dans la MP ne peut être comprise ni critiquée sans appréhender l'organisation et le fonctionnement de ce système. Le SNE appartient au SNA mais s'intègre mal, de par sa complexité et son indépendance, dans la dichotomie traditionnelle qui oppose ses composantes sympathique et parasympathique.

Les neurones des plexus nerveux digestifs ont longtemps été considérés comme des neurones parasympathiques postganglionnaires cholinergiques. Ce dogme a été ébranlé par la découverte dans les années 60 de neurones inhibiteurs non adrénérgiques et non cholinergiques (NANC) [162]. La densité du tissu nerveux et la diversité fonctionnelle, électrophysiologique et neurochimique des neurones entériques reflètent les fonctions variées et complexes exercées par le SNE. Sa large indépendance, illustrée par l'existence de **réflexes intrinsèques**, ne permet pas de l'intégrer à la subdivision classique entre sympathique et parasympathique, et depuis Langley il est décrit comme une troisième subdivision du SNA [17, 19].

Cependant, si le SNE constitue de loin le plus grand contingent périphérique du SNA, des circuits réflexes intrinsèques complexes existent au sein d'autres plexus d'organe. Une telle organisation a été démontrée au niveau des ganglions cardiaques, où la régulation autonome du cœur est partiellement indépendante des centres végétatifs [19, 50].

3.1 Organisation du système nerveux entérique

Le tissu nerveux qui constitue le SNE est composé d'un réseau dense de fibres nerveuses intrinsèques et extrinsèques distribué tout au long du tractus digestif. Les fibres intrinsèques proviennent des quelques $2 \text{ à } 6 \cdot 10^8$ neurones entériques, un chiffre restant controversé qu'il est classique de comparer au nombre de neurones de la moelle épinière [163]. Ces neurones dérivent embryologiquement de cellules du segment vagal de la crête neurale, qui migrent à l'extrémité orale du tractus digestif et le peuplent progressivement selon un gradient oro-anal. La portion la plus distale du tube digestif reçoit une contribution du segment sacré de la crête neurale [164]. Le contingent intrinsèque du SNE possède donc la même origine embryologique que les neurones ganglionnaires du parasympathique.

3.1.1 Morphologie

Le plexus ganglionnaire est l'unité structurelle du SNE ; il existe deux plexus majeurs au sein des parois digestives : **le plexus sous-muqueux** (PSM) qui contient le plexus de Meissner, et **le plexus myentérique** (PM) ou plexus d'Auerbach ([figure 7](#)). Le PSM est situé dans la sous-muqueuse, et le PM se situe dans le plan entre la couche longitudinale (externe) et circulaire (interne) de la *muscularis propria*. Le PSM comprend en réalité plusieurs plexus reliés par d'abondantes connexions nerveuses : un PSM externe (dit plexus de Schabadasch), minoritaire, immédiatement sous-jacent à la couche circulaire de la musculature ; et un PSM interne (le plexus de Meissner à proprement parler), majoritaire, immédiatement sus-jacent à la *muscularis mucosæ*. Un troisième plexus ganglionnaire est parfois décrit entre le plexus de Meissner et le plexus de Schabadasch, et des plexus aganglionnaires assurent l'innervation de chaque couche du tube digestif, de la muqueuse à la séreuse [23, 163, 165-167].

Le PSM est surtout développé dans le grêle, et est absent ou à l'état de reliquat dans le tractus digestif supérieur jusqu'à l'estomac inclus. Le PM et le PSM se présentent comme un maillage serré de fibres et de faisceaux de fibres nerveuses couvrant toute la circonférence du tube digestif, et continu sur l'ensemble du tractus. Les nœuds ou ganglions nerveux se situent aux points de jonction des fibres nerveuses, et sont formés d'un amas serré de cellules gliales entériques (CGE) et de neurones. Les ganglions du PM sont plus volumineux et possèdent plus de neurones que ceux du PSM. Les neurones entériques sont largement interconnectés au sein du ganglion, avec les ganglions adjacents et avec les ganglions des autres plexus.

Les fibres nerveuses contenues dans les plexus nerveux ont deux origines :

- **l'innervation extrinsèque** désigne les axones originaires de neurones situés en dehors du SNE : axones postganglionnaires sympathiques et préganglionnaires parasympathiques d'une part, qui projettent sur les neurones du SNE ou rarement directement sur les effecteurs ; innervation viscérosensible extrinsèque d'autre part.
- **l'innervation intrinsèque**, la plus abondante, désigne les prolongements provenant des neurones des différents plexus du SNE ; ces fibres projettent sur d'autres neurones (interneurones) ou sur les effecteurs de la paroi digestive (fml ou glandes).

Les nombreux vaisseaux sanguins de la muqueuse digestive, souvent situés à proximité des ganglions nerveux, reçoivent une abondante innervation extrinsèque d'origine sympathique, mais également intrinsèque [168].

3.1.2 Neuromédiateurs du système nerveux entérique

Si le tissu nerveux est bien individualisé au sein de la paroi digestive, il n'est séparé du milieu environnant que par une lame basale et une inconstante enveloppe de cellules interstitielles et de tissu conjonctif. Cela explique l'influence sur le tissu nerveux d'hormones ou de neuromédiateurs libérés à distance de façon paracrine. Les contacts entre le neurone moteur viscéral et l'organe cible sont moins bien différenciés que la jonction neuromusculaire du système moteur somatique : les terminaisons présynaptiques sont nombreuses, localisées sur les nombreuses varicosités de l'arborisation axonale terminale ; les structures post-synaptiques sont moins ordonnées et plus dispersées que la plaque motrice, et les neuromédiateurs peuvent diffuser sur plusieurs centaines de micromètres avant de trouver un récepteur [17, 23].

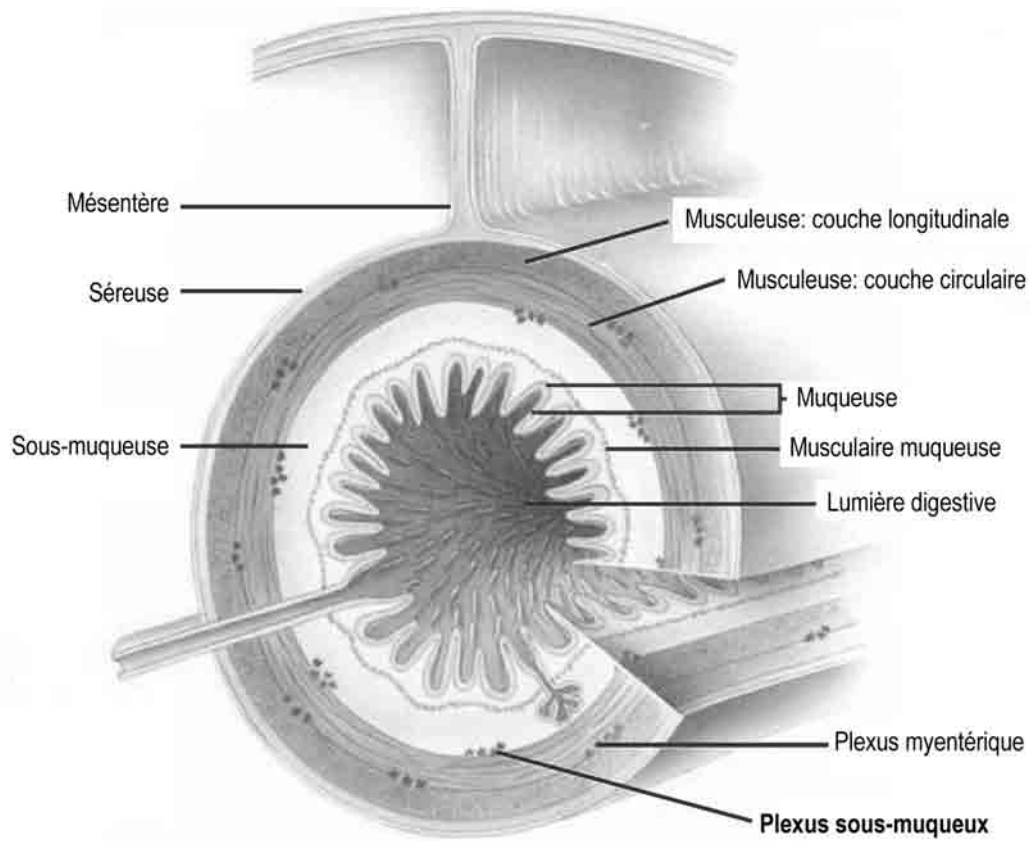


Figure 7. Situation du système nerveux entérique

Ces données illustrent les frontières floues entre sécrétion endo/paracrine humorale et neurotransmission dans ce système nerveux moins différencié que le SNC. Une trentaine d'agents neuro-humoraux ont été identifiés dans le SNE et peuvent être classés en fonction de leur action excitatrice ou inhibitrice sur la motilité digestive (tableau 3). La plupart peuvent être exprimés par les neurones, même si leur implication directe dans la transmission synaptique reste parfois à démontrer [169, 170]. Certains sont également sécrétés par d'autres types cellulaires (cellules entérochromaffines, cellules endocrines, mastocytes, etc.) Ces neuromédiateurs entériques sont des petites molécules (noradrénaline [NA], acétylcholine [ACh], sérotonine [5-HT]), des bases puriques (adénosine, adénosine tri-phosphate [ATP]), des peptides (**tachykinines** [substance P et neurokinine A], vasointestinal peptide [VIP], *calcitonin gene-related peptide* [CGRP], somatostatine [som]) ou des gaz (protoxyde d'azote [NO]). Les agents neuro-humoraux et leurs récepteurs sont autant de cibles pharmacologiques potentielles pour la recherche sur les maladies digestives. Chaque découverte suscite un certain engouement physiopathologique et thérapeutique. Cela a été récemment le cas avec les récepteurs à la sérotonine [171] et les récepteurs aux cannabinoïdes [172].

Les neurones entériques expriment en général une combinaison de plusieurs de ces neuromédiateurs, définissant **leur codage ou phénotype neurochimique**. Un neuromédiateur principal peut être associé à un ou plusieurs co-neurotransmetteurs. Leur action varie en fonction du type de récepteur.

Comme dans le SNC, les synapses du SNE sont axo-somatiques, axo-axonales ou axo-dendritiques. La transmission synaptique provoque :

- un potentiel post-synaptique excitateur (PPSE) rapide (*fEPSP* pour *fast excitatory post-synaptic potential*) si un récepteur-canal ionique est impliqué ; l'acétylcholine se liant aux récepteurs nicotiniques est le neuromédiateur principal des *fEPSP*, la 5-HT et l'ATP plus rarement.
- un PPSE lent (*slow EPSP* ou *sEPSP*) s'il s'agit d'un récepteur métabotrope ; plus d'une vingtaine de neuromédiateurs ayant cet effet ont été décrits (VIP, CGRP, etc.)
- un potentiel post-synaptique inhibiteur (PPSI) : ATP, som, NA, etc.
- une inhibition (rarement une facilitation) présynaptique, notamment au niveau des synapses axo-axonales de la jonction neuromusculaire : noradrénaline avant tout, mais aussi acétylcholine, etc. La noradrénaline est le neurotransmetteur exclusif des projections extrinsèques des neurones sympathiques postganglionnaires.

3.1.3 Neurones entériques

Les neurones entériques peuvent être classifiés en fonction de leur localisation, de leur morphologie (la classification de Dogiel, histologiste pétersbourgeois de la fin du XIX^{ème} siècle, est encore utilisée), de leurs caractéristiques électrophysiologiques ou de leur phénotype neurochimique. Les progrès réalisés dans la compréhension de la physiologie du SNE permettent désormais d'en envisager une classification fonctionnelle, qui intègre les précédentes. Qualifier le SNE de centre nerveux sous-entend que l'innervation intrinsèque du tube digestif comprend des neurones afférents, des interneurons et des neurones efférents connectés aux effecteurs. Ces trois catégories de neurones sont mises à contribution dans les **réflexes locaux** ou réflexes entéro-entériques.

A.

Inhibition présynaptique	Potentiel post-synaptique exciteur	Potentiel post-synaptique inhibiteur
ACh	ACh	Noradrénaline
5-HT	5-HT	5-HT
Histamine	VIP	Adénosine, ATP
Noradrénaline	Histamine	CCK, somatostatine, opioïdes
NPY	CCK, CGRP, PACAP	Dopamine ?
Dopamine ?	Interleukines et TNF α	

B.

Stimulation	Inhibition
ACh	NO
Adénosine	VIP
5-HT	somatostatine
Histamine	GABA
Neurokinine A, SP	CGRP
CCK, GRP, motiline, bombésine, opioïdes, TRH	NPY
PGE ₂	Galanine, glucagon, neurotensine, PACAP, PHI, PYY, sécrétine
	Dopamine

5-HT, sérotonine ; GRP, gastrin releasing polypeptide; NO, nitric oxide; PGE₂, prostaglandine E₂; TRH, thyrotropin-releasing hormone; CGRP, calcitonin gene-regulated peptide; GABA, gamma butyric acid; NPY, neuropeptide Y; PACAP, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide; PHI, peptide histidine isoleucine; PYY, peptide YY; SP, substance P ; VIP, vasoactive intestinal polypeptide.

Tableau 3. Principaux neurotransmetteurs et substances neurohumorales
(d'après Hansen)

(A) Principaux neurotransmetteurs prouvés du système nerveux entérique classés selon leur action électrophysiologique. **(B)** Principales substances neurohumorales, neurotransmetteurs établis ou non, classées selon leur action physiologique sur la motricité du tube digestif.

3.1.3.1 Neurones afférents

On distingue parmi les neurones afférents intrinsèques **les neurones afférents primaires intrinsèques (IPANs)** et **les neurones intestinofuges**. Ces deux types de neurones afférents s'ajoutent aux neurones afférents viscérosensibles sympathiques et parasympathiques.

Situés à la fois dans le PSM et le PM, les IPANs répondent à des stimuli mécaniques (déformation de la muqueuse, distension des fml) et chimiques (variation du pH intraluminal). La sensibilité à la déformation de la muqueuse et aux variations de pH est indirecte, et fait intervenir **les cellules entérochromaffines** de l'épithélium digestif qui libèrent des facteurs comme la sérotonine en réponse à ces stimuli [173]. Ces neurones possèdent un large soma rond ou ovalaire et une arborisation axonale et dendritique longue et ramifiée (Dogiel type II), et sont caractérisés sur le plan électrophysiologique par un potentiel d'action (PA) mixte, sodique et calcique, et par une hyperpolarisation prolongée (neurones AH pour *after-hyperpolarization*). Cette relation morpho-électrophysiologique est cependant moins claire chez l'homme que chez le rongeur [166]. Leurs dendrites innervent les villosités, et leur arborisation axonale projette de façon circonférentielle sur les interneurones et les motoneurones du PMS et du PM [174]. Les IPANs sont cholinergiques et tachykininergiques et expriment également le CGRP [175].

Les neurones intestinofuges sont situés dans le PM et projettent sur des neurones du ganglion sympathique de façon indépendante du système sympathique puisque les centres spinaux n'interviennent pas dans la boucle réflexe. Ils répondent essentiellement à la distension intestinale [174].

3.1.3.2 Interneurones

Les interneurones ont une morphologie Dogiel type I (courts prolongements dendritiques et long axone unique) et sont des neurones S (pour *synaptic*) sur le plan électrophysiologique (potentiels post-synaptiques excitateurs courts et de large amplitude, PA exclusivement sodique et absence d'hyperpolarisation prolongée autorisant une haute fréquence de décharge). Connectés entre eux pour former une chaîne d'excitation ascendante ou descendante, ils reçoivent également des afférences des IPANs.

Les interneurones ascendants sont des neurones exclusivement cholinergiques. Les interneurones descendants ont un codage neurochimique plus complexe : les interneurones exprimant ACh/NO/VIP/som sont impliqués dans les réflexes péristaltiques locaux, et les interneurones ACh/5-HT sont impliqués dans les réflexes sécrétomoteurs locaux [167, 175].

3.1.3.3 Neurones efférents

Ces neurones sont connectés aux effecteurs que sont les fml de la paroi digestive au premier chef (motoneurones), mais aussi les glandes, les vaisseaux et les cellules immunitaires de la sous-muqueuse (il s'agit alors de neurones sécrétomoteurs). Ils sont tous Dogiel I/S.

Les motoneurones sont **soit excitateurs soit inhibiteurs**, et s'adressent à la couche circulaire ou longitudinale de la *muscularis propria*, ou encore à la *muscularis mucosæ*. Ils sont situés dans le PM en majorité, mais également dans le PSM. Les motoneurones excitateurs sont principalement cholinergiques et tachykininergiques. Les motoneurones inhibiteurs sont principalement nitrergiques (ils libèrent un gazotransmetteur inhibiteur, le NO, grâce à l'enzyme neuronale NO synthase [nNOS]), mais peuvent exprimer également VIP, ATP, etc.

Les neurones sécrétomoteurs sont situés dans le PSM et sont cholinergiques ou VIPergiques. L'acétylcholine libérée contacte les récepteurs métabotropiques muscariniques des effecteurs [166, 167, 175].

3.1.4 Compte neuronal et phénotypage neurochimique chez l'homme

La caractérisation la plus aboutie des neurones entériques a été réalisée sur l'intestin grêle du cochon d'Inde, modèle animal privilégié qui a permis leur classification fonctionnelle exhaustive. Cependant les données issues des études animales sont difficilement transposables chez l'homme du fait d'importantes différences inter-espèces [166]. Des différences significatives de phénotype neurochimique peuvent être observées entre espèces phylogénétiquement proches, par exemple entre l'homme et le macaque rhésus [176].

3.1.4.1 Les aléas d'une science naissante

C'est assez récemment que des travaux ont été directement consacrés au décompte et au phénotypage neurochimique des populations neuronales entériques chez l'homme [151, 176]. Illustrant l'immaturité des « neurosciences entériques », leurs résultats sont désarçonnants par leur variabilité d'une étude à l'autre, pour des mesures aussi simples que la densité ganglionnaire ou le nombre de neurones par ganglion [177]. Cela souligne la nécessité (1) d'une standardisation des méthodes histologiques, (2) d'un consensus sur les définitions (par exemple, *à partir de combien de neurones peut-on parler de ganglion ?*), (3) d'une délimitation précise de la topographie des prélèvements (les populations neuronales varient par exemple selon les régions de l'estomac analysées), (4) d'une prise en compte de l'origine du prélèvement (autopsique ou chirurgical), de l'âge et des éventuelles pathologies ayant pu affecter le phénotype (obésité, diabète, mais également troubles fonctionnels intestinaux), et enfin (5) d'une évaluation de la reproductibilité inter- et intra-observateur des mesures effectuées.

L'une des premières étapes dans cet effort de standardisation est l'obtention d'un consensus sur **un marqueur pan-neuronal** indiscutable. Deux méthodes réunissent à ce jour le plus d'arguments en faveur de leur reproductibilité et de leur stabilité chez le rongeur [178] comme chez l'homme [179] : une méthode immunohistochimique dirigée contre les protéines Hu et une méthode tinctoriale utilisant un analogue du bleu alcian (phtalocyanine quinoléique ou bleu de cuproline). Les protéines Hu C et D contre lesquelles sont dirigés les anticorps monoclonaux utilisés en immunohistochimie sont des protéines spécifiques des neurones se liant aux ARN messagers. La phtalocyanine quinoléique forme un chromogène bleu très stable en présence d'ARN simple brin ; son affinité pour les corps de Nissl en fait un marqueur très spécifique des neurones entériques en immunohistochimie de surface [180]. Du fait de leur facilité d'utilisation en histologie conventionnelle, d'autres marqueurs (PGP9.5, NSE, NF) sont couramment utilisés [181] malgré la démonstration de leur moindre sensibilité [179, 182].

Le *gold standard* pour l'analyse quantitative est l'immunohistochimie de surface (*whole mount*) sur le plexus micro-disséqué, qui seule permet d'appréhender la totalité du réseau dans son organisation bidimensionnelle [177].

3.1.4.2 Compte neuronal

Les résultats disponibles doivent tenir compte des limitations susmentionnées. Les mesures de densité neuronale montrent par exemple une telle variabilité qu'une méta-analyse récente a renoncé à établir des

données normatives [177]. Le degré d'étirement des tissus avant fixation semble être l'une des explications principales de cette variabilité.

L'une des mesures les plus fiables puisqu'indépendante de l'étirement est le nombre moyen de neurones par ganglion, mais sa validité dans l'évaluation d'une perte neuronale reste sujette à caution, ce paramètre pouvant être moins sensible que la densité neuronale [183]. A titre d'exemple, en utilisant un immunomarquage pan-neuronal en immunohistochimie de surface sur du plexus micro-disséqué, le nombre moyen de neurones par ganglion a été estimé dans le côlon humain à 21 ± 3 dans le plexus myentérique [184] et à 5 ± 1 dans le plexus sous-muqueux [185].

3.1.4.3 *Phénotype neurochimique : la domination de ChAT et NOS*

Une séparation doit d'abord être effectuée entre neurones cholinergiques et neurones nitrergiques, les deux phénotypes rassemblant plus de 90% des populations neuronales. Cependant, établir le caractère nitrergique ou cholinergique ne suffit pas à définir une classe fonctionnelle de neurones. Les neurones viscérosensibles, les interneurones et les motoneurones peuvent par exemple utiliser l'acétylcholine, d'où l'intérêt d'une caractérisation plus complète du phénotype neurochimique impliquant les cotransmetteurs.

Les enzymes limitantes de la synthèse de l'acétylcholine et du NO, respectivement ChAT et NOS, sont utilisées comme marqueurs des neurones cholinergiques et nitrergiques. Leur expression est largement exclusive. Cependant une minorité de neurones coexprime ChAT et NOS : ils représentent 3 à 4% de la population totale dans le côlon [186, 187], et jusqu'à 17% dans l'estomac [188].

Les neurones cholinergiques forment la population dominante du tube digestif. Leur proportion tend à décroître selon un gradient oro-anal : au niveau du plexus myentérique ils représentent de 57 à 72% du nombre total de neurones au niveau de l'estomac [151, 188], de 52% à 66% dans le grêle, et de 38% à 65% dans le côlon [151, 186, 187]. Les rares données disponibles sur le plexus sous-muqueux montrent des proportions similaires [151].

La deuxième population en fréquence est celle **des neurones nitrergiques**, en général distincts des cholinergiques. Leur proportion augmente selon un gradient oro-anal : ils représentent de 25 [176] à 40% [188] des neurones myentériques dans l'estomac, 38% dans le grêle et la moitié dans le côlon [151, 176, 186, 187].

3.1.4.4 *La sous-population VIPergique*

La troisième population est celle des neurones VIP mis en évidence directement par l'immunomarquage du neurotransmetteur. Approximativement 50% des neurones myentériques expriment VIP dans l'estomac, contre 10% dans le côlon [151, 176, 184, 188]. En revanche, les neurones VIP sont nombreux dans le plexus sous-muqueux (de 50 à 79% des neurones à tous les étages) [151].

Si la littérature est convergente sur ce point, les études sont totalement divergentes sur le patron de co-expression des neurones VIP. A l'exception des neurones sous-muqueux coliques, ils seraient principalement cholinergiques selon Anlauf [151]. A l'inverse, dans deux autres études [176, 188], les neurones myentériques VIPergiques seraient pour moitié nitrergiques et pour moitié cholinergiques dans l'estomac, et nitrergiques au-delà. Ces derniers résultats semblent plus cohérents, le VIP comme le NO étant des neurotransmetteurs principalement inhibiteurs causant une relaxation musculaire. Ces divergences

peuvent être liées à l'utilisation non conventionnelle du transporteur vésiculaire de l'acétylcholine (VACHT) comme marqueur des neurones cholinergiques dans le travail d'Anlauf.

3.1.4.5 La sous-population dopaminergique

La présence de dopamine dans le tube digestif est connue de longue date en tant que précurseur sur la voie de synthèse de la NA dans les fibres sympathiques noradrénergiques ([figure 2](#)). Son action inhibitrice notoire sur la motilité intestinale était initialement attribuée à une sensibilité croisée des récepteurs à la NA. Une étude récente du codage neurochimique chez l'homme révèle cependant une sous-population de neurones exprimant la TH et le transporteur vésiculaire monoaminergique VMAT2, mais négative pour la DBH et 5-HT, qui est par conséquent obligatoirement dopaminergique [151]. Le SNE étant dénué de neurones intrinsèques noradrénergique, tout neurone entérique intrinsèque exprimant la TH dans son soma peut être considéré comme dopaminergique. Cette sous-population dopaminergique évolue en proportion du nombre total de neurones selon un gradient dégressif oro-anal, représentant de 4 (dans le côlon) à 20% (dans l'estomac) des neurones du PM, et de 0 (dans le côlon) à 20% (dans l'estomac) des neurones du PSM [151, 176].

Dans une étude antérieure [150], la proportion de neurones coliques exprimant la TH atteignait 12 et 15% dans le PM et PSM, respectivement. Cette différence importante s'explique vraisemblablement par la méthodologie différente (immunohistochimie sur coupes transversales incluses en paraffine, dans le premier cas, et immunofluorescence de surface sur préparations disséquées [*whole-mount*] dans le second).

La présence d'un contingent dopaminergique dans le SNE a été depuis confirmée chez l'animal [189], de même que celle de récepteurs dopaminergiques intrinsèques, majoritairement de type D2 [190]. Présents dans le PM et dans une moindre mesure le PSM, les neurones dopaminergiques exerceraient une fonction de modulation inhibitrice de la motilité digestive [60]. La proportion de neurones dopaminergiques augmente fortement dans la dénervation sympathique expérimentale, vraisemblablement pour compenser l'absence d'inhibition sympathique extrinsèque [189]. Ces neurones feraient partie de la population minoritaire non-cholinergique [151] et non-nitrergique [176].

3.1.5 Autres populations cellulaires

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

Les cellules interstitielles de Cajal, probablement liées aux fml par des jonctions communicantes (*gap junctions*), sont les cellules *pacemaker* du SNE. Leur action est de faire osciller le potentiel de membrane des fml. Les cellules interstitielles génèrent une contraction propagée coordonnée des fml sur de longues distances (ondes lentes). Cette activité propulsive purement myogène est inhibée ou modulée par le SNE, par action directe sur les fml ou par l'intermédiaire des cellules de Cajal qui reçoivent une abondante innervation [165]. En revanche, le rôle supposé de ces cellules dans la neurotransmission nerf-muscle lisse a été largement remise en cause par des travaux récents [191].

Les cellules gliales entériques (CGE) possèdent de nombreuses propriétés morphologiques et fonctionnelles communes avec l'astroglie du SNC. Quatre fois plus nombreuses que les neurones, les CGE forment un dense réseau cellulaire au sein du tissu nerveux entérique (dans les ganglions, les faisceaux interganglionnaires, le long des nerfs extrinsèques) et dans la *lamina propria*, en contact intime avec le pôle basal de l'épithélium digestif et avec les vaisseaux de la sous-muqueuse [192]. Leur fonction trophique et cytoprotectrice vis-à-vis des neurones dont elles régulent l'activité (par exemple en assurant la synthèse de précurseurs de neuromédiateurs) n'est que l'un des aspects de leur activité. Les CGE sont nécessaires au maintien de la perméabilité de la barrière muqueuse épithéliale, et jouent un rôle de premier plan (en tant que présentateur d'antigène ou par la sécrétion de cytokines) dans la réponse inflammatoire [193].

3.2 Physiologie du système nerveux entérique et interactions avec le système nerveux autonome

Les expériences fondatrices de Bayliss et Starling en 1899 (sur l'intestin grêle) et 1900 (sur le côlon) démontrent que le tube digestif isolé (c'est-à-dire dénervé) se contracte de façon polarisée, oro-anale, en réponse à un stimulus mécanique ou de façon spontanée [194]. Langley établit à leur suite, en 1905, que cette réponse persiste après dégénérescence wallérienne des afférences autonomes extrinsèques, et qu'il ne s'agit donc pas d'un réflexe d'axone survivant à l'axonotmésis [195]. Ce réflexe local ou intrinsèque est la preuve expérimentale de l'existence de centres nerveux en dehors du SNC. Leurs bases morphologiques et biochimiques ont depuis été élucidées.

Le SNE ne fait pas que coordonner la motilité digestive : il est impliqué dans le contrôle du flux sanguin, de l'absorption et de la sécrétion muqueuse, et de certaines fonctions immunitaires et endocrines, dépassant le cadre de l'exposé.

3.2.1 Activité motrice intrinsèque

3.2.1.1 Le réflexe péristaltique

Le réflexe péristaltique associe une contraction orale et une relaxation anale du muscle circulaire en réponse à une stimulation mécanique ou chimique locale de la muqueuse ou à une distension du tube digestif.

Les IPANs du PSM et du PM sont les afférences de ce réflexe, et projettent circonférentiellement pour faire synapse avec d'autres IPANs et de courts interneurons cholinergiques ascendants formant une chaîne d'excitation ([figure 8](#)). Ces interneurons contactent finalement des motoneurons excitateurs cholinergiques et tachykininergiques. La voie inhibitrice descendante implique probablement une deuxième catégorie d'IPANs faisant synapse avec de longs interneurons descendants au codage neurochimique plus complexe, liés par une synapse excitatrice à des motoneurons inhibiteurs nitroergiques. Les motoneurons de la voie ascendante projettent sur le muscle circulaire, et probablement aussi sur le muscle longitudinal [196, 197].

Le réflexe péristaltique a d'autres composantes dont les bases neurales sont moins bien définies : relaxation musculaire à l'endroit où est appliquée la distension (réflexe d'accommodation), contraction conjointe du muscle longitudinal favorisant le raccourcissement du segment digestif et la propulsion, et transmission de la

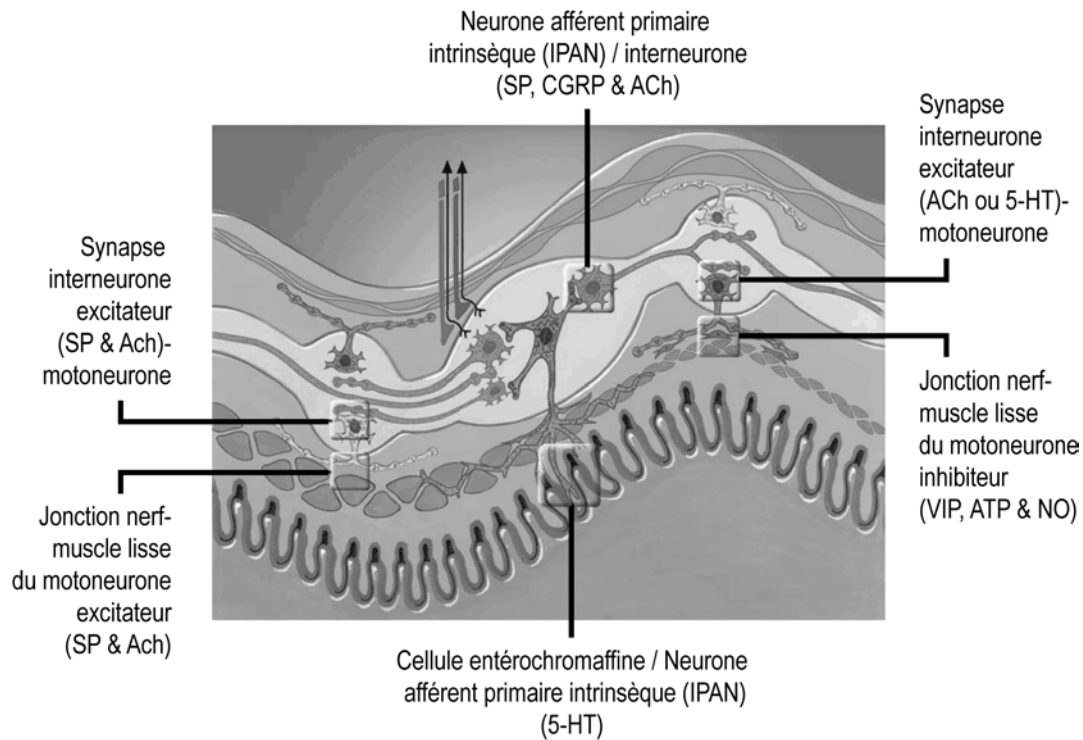


Figure 8. Le réflexe péristaltique (d'après Hansen)

Après stimulation muqueuse, la sérotonine (5-HT) est libérée par les cellules entérochromaffines et stimule les terminaisons des neurones afférents primaires intrinsèques (IPANs) (via les récepteurs $5-HT_{1P}$ et $5-HT_4$). Ces neurones sensoriels utilisent la substance P (SP), l'acétylcholine (ACh), le glutamate et le CGRP (calcitonin gene-related peptide) comme neurotransmetteurs pour stimuler les interneurones. Les interneurones excitateurs (ACh, SP) projettent en direction orale sur les motoneurones excitateurs. Les interneurones inhibiteurs ont un phénotype neurochimique différent (5-HT et ACh) ; ils projettent en direction anale sur les motoneurones inhibiteurs.

Les motoneurones excitateurs libèrent ACh et SP dans le muscle. Les motoneurones inhibiteurs libèrent NO, VIP et ATP dans le muscle. Les efférences sympathiques libèrent la noradrénaline, mais également somatostatine et neuropeptide 1. Les efférences parasympathiques libèrent de l'ACh.

contraction du muscle circulaire en direction anale sur une courte distance. La voie excitatrice descendante responsable n'a jamais été mise en évidence [165].

3.2.1.2 Les réflexes entéro-entériques

Ces réflexes mettent en jeu les neurones intestinofuges du PM, activés directement par la distension colique ou indirectement par les IPANs. La résultante est une inhibition de la motilité du segment digestif situé en aval. C'est ce type de réflexe qui inhibe par exemple la motilité gastrique en réponse à la réplétion et à l'acidité jéjunale. Ils ne sont pas à proprement parler intrinsèques puisque l'efférence principale est un neurone ganglionnaire sympathique, mais ne constituent pas un réflexe central puisqu'ils surviennent indépendamment des centres nerveux (si les nerfs splanchniques sont sectionnés) [174].

3.2.1.3 Les complexes moteurs migratoires

Un complexe moteur migratoire est une contraction radiaire du muscle circulaire qui se transmet lentement en direction anale, de proche en proche, sur une longue distance. Cette contraction apparaît spontanément, de façon rythmique, à une fréquence variable selon la région du tube digestif considérée. Ces complexes sont dépendants de l'activité nerveuse puisqu'ils sont supprimés par la tétrodontoxine, bloqueur des canaux sodiques. Ils impliquent les motoneurones excitateurs du muscle circulaire, et vraisemblablement une chaîne d'interneurones descendants [196, 198].

Le SNE a donc à disposition un certain nombre de programmes moteurs spontanés ou réflexes, qu'il coordonne entre les différents segments du tube digestif et ajuste aux stimuli. Son fonctionnement autonome n'est que modulé par les afférences extrinsèques, qui restent au second plan pour le contrôle du péristaltisme, mais jouent un rôle plus important dans des régions circonscrites du tube digestif.

3.2.2 Rôle des systèmes sympathiques et parasympathiques

L'innervation extrinsèque parasympathique et sympathique intervient surtout dans les régions d'interface entre SNA et système nerveux somatique, où les fonctions digestives résultent d'une coordination intime entre motricité volontaire, réflexe et autonome. Il s'agit du pharynx, de la portion striée de l'œsophage et de la région du plancher pelvien et du sphincter anal. Les troubles de déglutition ou de défécation sont souvent multifactoriels, résultant de l'atteinte motrice combinée somatique et viscérale.

Le rôle respectif de l'innervation extrinsèque et intrinsèque peut être plus aisément appréhendé dans des régions dépendant exclusivement du SNA, sans intervention de la motricité somatique, comme l'estomac ou le côlon. L'innervation extrinsèque y joue un rôle de coordination de la vidange gastrique et du péristaltisme intestinal. Schématiquement, le parasympathique est l'accélérateur de la motricité et de la sécrétion digestive, tandis que le sympathique en est le frein.

3.2.2.1 Vidange gastrique

L'estomac est fonctionnellement divisé en un réservoir proximal, le fundus, et une pompe distale, l'antrum. Le fundus présente une contraction tonique adaptée au contenu gastrique, et l'antrum possède une activité phasique à type de contraction circulaire propagée. La musculature fundique est innervée par des motoneurones excitateurs et inhibiteurs, eux-mêmes sous la dépendance du SNE et des afférences parasympathiques. De la balance entre excitation et inhibition dépend le volume du réservoir, qui doit

s'adapter au contenu, et la pression intragastrique, nécessaire à la propagation du bol alimentaire vers l'antrum. Cette adaptation continue met en jeu un réflexe vago-vagal.

Trois types de réponses réflexes sont décrits pour le fundus : la relaxation de réception est déclenchée par la déglutition, et prépare le fundus à recevoir le bol alimentaire. Les afférences sont les fibres viscérosensibles du vague issues de récepteurs pharyngés et les efférences sont ses fibres viscéromotrices faisant synapse avec les motoneurons inhibiteurs. La relaxation d'adaptation est également un réflexe vago-vagal déclenché par les récepteurs à l'étirement de la musculature fundique. La relaxation rétroactive est un réflexe à la fois intrinsèque (réflexe entéro-entérique) et vagal évoqué par la présence de nutriments dans le jéjunum [199].

La relaxation de réception et d'adaptation est abolie en cas de lésion vagale. Les patients rapportent une sensation de réplétion gastrique, des nausées et un ballonnement postprandial. L'abolition ou la désorganisation des contractions antrales, en revanche, serait plus spécifique de l'atteinte intrinsèque du SNE [23].

3.2.2.2 Motricité intestinale

La motricité digestive est essentiellement constituée par deux types d'activité liés à l'alimentation : en période de jeûne, l'activité digestive est limitée aux complexes moteurs migratoires qui, en assurant une motricité intestinale de fond, limiteraient la pullulation bactérienne. En période postprandiale, des mouvements de propulsion et de malaxage impliquant exclusivement les réflexes intrinsèques (notamment péristaltique) alternent avec des périodes de quiescence. Cette activité digestive est évoquée par l'arrivée du bol alimentaire et par sa composition chimique (les lipides, et notamment les triglycérides à chaîne moyenne, sont le stimulus le plus efficace pour supprimer les complexes moteurs migratoires et déclencher la transition jeûne-digestion).

Le rôle de l'innervation extrinsèque est modeste, puisqu'il persiste un péristaltisme efficace sur le tube digestif désafférenté. Cela étant, on observe dans les modèles animaux de dénervation extrinsèque une intrication des deux types d'activité, avec la persistance de complexes moteurs migratoires en période postprandiale, soulignant le rôle de coordination du SNA dans la transition jeûne-digestion [199].

3.3 Pathologie du système nerveux entérique

3.3.1 Le concept de neuropathie digestive

Le concept de **neuropathie digestive**, qui rassemble les pathologies caractérisées par une atteinte du SNE, est récent et mal délimité. Plusieurs raisons peuvent être évoquées pour expliquer que ce champ de la neurogastroentérologie ait été relativement délaissé [200] :

- Les atteintes les plus courantes du SNE s'associent à une neuropathie extrinsèque (c'est-à-dire à une dysautonomie) permettant de porter relativement aisément le diagnostic ; c'est le cas par exemple du diabète ou de l'amylose.
- Le répertoire sémiologique limité du tube digestif empêche l'identification de signes cliniques spécifiques : dysphagie, gastroparésie, constipation, pseudo-obstruction ou incontinence peuvent

résulter de causes diverses (obstructives, musculaires, centrales, dysautonomiques...) et n'appellent pas pour l'instant, causes obstructives à part, un traitement spécifique, ce qui limite l'intérêt d'explorations diagnostiques poussées.

- Les atteintes primitives isolées du SNE sont rares, mais les atteintes secondaires ou satellites d'un processus pathologique identifié sont fréquentes (atteinte du SNE dans les malacies inflammatoires chroniques de l'intestin par exemple).

Les principales neuropathies entériques sont regroupées dans le tableau 4 et ne seront pas détaillées dans le texte. Leur point commun clinique est un trouble majeur de la motilité digestive allant jusqu'à l'atonie. Elles peuvent être classées selon leur physiopathologie en maladies génétiques et développementales, maladies inflammatoires à médiation humorale ou cellulaire, mitochondriopathies, troubles du codage neurochimique, ou maladies neurodégénératives. Plus récemment une classification histologique, dite classification de Londres, a été proposée [181].

3.3.2 Maladies neurodégénératives du système nerveux entérique

3.3.2.1 Une entité controversée

Les maladies neurodégénératives du SNE forment une entité encore controversée [200]. Des maladies digestives courantes pourraient entrer dans cette catégorie, soit parce que leur caractère idiopathique est remis en cause par l'identification de lésions subtiles du SNE, soit parce que l'atteinte du SNE semble primitive, sans cause auto-immune, infectieuse (ou génétique) connue. La constipation fonctionnelle et l'achalasie de l'œsophage en constituent deux exemples.

Des travaux convergents font état d'altérations du SNE dans la constipation sévère chronique et la pseudo-obstruction intestinale chronique, avec une hypoganglionose (diminution du nombre de neurones par ganglion) et une diminution du nombre de cellules interstitielles de Cajal [73]. La question en suspens est bien entendu de déterminer si ces anomalies sont primaires ou secondaires.

L'achalasie de l'œsophage est caractérisée par une disparition du péristaltisme associée à un trouble de relaxation du sphincter inférieur de l'œsophage, dont le diagnostic est posé par la manométrie. Caractérisée par une dysphagie prédominant aux liquides, la maladie peut survenir à tout âge, mais il existe un pic d'incidence à la septième décennie [201]. D'étiologie inconnue, la maladie résulte d'une dégénérescence sélective des neurones inhibiteurs intrinsèques (VIPergiques et nitrergiques) du SNE. Les pistes auto-immunes et infectieuses fréquemment évoquées n'ont jamais été confirmées [64, 202].

3.3.2.2 Altérations du système nerveux entérique avec l'âge

Mais l'exemple le plus commun de neurodégénérescence dans le SNE est fourni par le vieillissement. Les altérations du SNE liées à l'âge n'ont pas fait l'objet d'études approfondies chez l'homme mais l'existence d'une perte neuronale est acquise, notamment dans les segments les plus distaux (une perte neuronale de 40% dans le PM du côlon a été rapportée [203]). Ces altérations pourraient en partie rendre compte de la forte prévalence des troubles fonctionnels intestinaux, au premier plan desquels la constipation, chez les sujets âgés.

Des études plus poussées ont été menées chez l'animal, et les résultats semblent concordants entre les espèces, même si des facteurs alimentaires doivent être pris en compte [204]. La perte neuronale et gliale

Catégorie	Maladie	Phénotype
Neuropathies entériques communes	Diabète Amylose	Association à des signes de dysautonomie et à une neuropathie périphérique facilitant le diagnostic Formes familiales
Neuropathies digestives familiales	Neuropathie viscérale familiale	Entité discutée, pas de gène identifié Dysphagie, POIC, pupilles aréactives, neuropathie périphérique Inclusions éosinophiles dans les ganglions myentériques
	MNGIE	Maladie mitochondriale Dysphagie, ophtalmoplégie progressive externe, POIC, neuropathie périphérique, leucoencéphalopathie Fibres rouges déchiquetées
	Syndrome triple A (ou syndrome d'Allgrove)	Alacrymie, achalasie et insuffisance surrénalienne périphérique
	Myopathie viscérale familiale	Pas à proprement parler une neuropathie Dysphagie, POIC, troubles urinaires
	Maladie à inclusions intranucléaires neuronales	Dysphagie, POIC, ataxie, ophtalmoplégie, crises oculogyres, fléchissement cognitif
	Maladie de Hirschprung	Aganglionose distale (rectum et sigmoïde en général) Contraction tonique du segment distal Sporadique ou plus souvent familial ; polygénique (RET, endothéline-3, Sox-10...)
Neuropathies entériques auto-immunes	Maladie des anticorps anti-sous unité $\alpha 3$ du récepteur nicotinique ganglionnaire	Dysmotilité gastrointestinale globale Réponse à la pyridostigmine et aux immunoglobulines polyvalentes
	Syndrome des anti-Hu	Neuropathie sensitive, syndrome cérébelleux Dysautonomie Paranéoplasique +++
	Myasthénie, neuromyotonie...	Dysmotilité gastro-intestinale au second plan
Neuropathies entériques indéterminées (dégénératives ?)	Achalasie	Perte des neurones inhibiteurs (NOS, VIP, SOM)
	Dysplasie neuronale intestinale	Hypoplasie de l'innervation extrinsèque avec diarrhée motrice (type A) ou hyperganglionnose (type B)

MNGIE : mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy ; POIC : pseudo-obstruction intestinale chronique

Tableau 4. Principales neuropathies entériques

estimée par la densité neuronale est continue à partir de l'âge adulte, importante (perte d'environ un tiers au cours de la vie) et suit un gradient oro-anal [205, 206]. Certains neurones semblent plus vulnérables à ce processus dégénératif, qui semble affecter préférentiellement les neurones cholinergiques et respecter les neurones nitrergiques [207] ; les IPANs pourraient également subir une perte rendant compte de l'émoussement des réflexes intrinsèques [204].

En outre, des altérations de l'innervation extrinsèque sympathique ont été rapportées chez le rat Fischer 344 dès l'âge de 8 mois, et leur fréquence augmente nettement avec l'âge. Chez le rat âgé, l'immunomarquage de la tyrosine hydroxylase, qui visualise le réseau des fibres extrinsèques, met en évidence des fibres gonflées, variqueuses, très dystrophiques, formant parfois des amas à proximité des neurones dans les ganglions. La proportion de fibres immunoréactives décroît en parallèle, signant la dénervation sympathique. Des altérations neuritiques du même ordre sont décrites dans une moindre mesure sur les fibres nitrergiques [207]. Fait majeur, avec l'âge, des neurites dystrophiques, certains prolongements axonaux normaux et quelques corps cellulaires sont immunoréactifs pour l' α -synucléine. Ces données ont été confirmées chez la souris âgée.

Ces résultats et les données récentes de la neuropathologie font de la MP le candidat idéal pour éprouver le concept de maladie neurodégénérative du SNE.

4 Le système nerveux entérique comme biomarqueur de la maladie de Parkinson

*Neuroscientists, whose horizon ends at the holes of the skull,
are continually amazed to find that the structure and the component cells
of the enteric nervous system are more akin to those of the brain
than to those of any other peripheral organ*
Michael Gershon, *The Second Brain*

4.1 Exploration morphologique du système nerveux entérique chez l'homme

L'analyse histologique des neuropathies entériques n'est couramment réalisée chez l'homme que sur des pièces chirurgicales, et est donc réservée aux cas les plus sévères [208, 209]. Cela rend compte du manque de données concernant la neuropathologie des pathologies digestives les plus courantes, et notamment des troubles fonctionnels digestifs (constipation, syndrome du côlon irritable) [200]. Récemment, une caractérisation exhaustive du plexus sous-muqueux (PSM) chez l'homme a été réalisée sur des biopsies profondes réalisées avec un forceps rigide [185]. Cette technique n'est pas exempte de risques (principalement hémorragie et perforation), et la nécessité d'utiliser un endoscope droit la limite à l'exploration du rectum. Le plexus myentérique, dont les altérations peuvent directement expliquer les troubles de la motilité colique, reste hors d'atteinte.

Un progrès significatif serait obtenu si le système nerveux entérique pouvait être analysé par des biopsies coliques de routine prélevées au cours d'une coloscopie. Cet examen, pratiqué couramment dans les services et les cabinets de gastroentérologie, a un risque hémorragique ou de perforation estimé à moins de 0,1 % [210].

4.1.1 Méthodes standards d'analyse des biopsies coliques

Dans les services d'anatomie pathologique les biopsies coliques, dont l'indication est dans l'immense majorité des cas de rechercher une dysplasie de la muqueuse, sont traitées selon les techniques d'histologie classiques : après prélèvement, les biopsies sont immédiatement fixées dans le formaldéhyde. L'inclusion en paraffine permet ensuite la réalisation de coupes transversales de 5 à 10 μ m d'épaisseur, qui sont étalées sur lame en vue de la coloration ou de l'immunomarquage.

Les coupes colorées par l'hématéine et éosine montrent une large prédominance de muqueuse. Occasionnellement un fragment de sous-muqueuse est visible sous l'épithélium colique. Rarement, un neurone sous-muqueux peut être distingué immédiatement sous-jacent à la musculature muqueuse.

Les biopsies de routine sont donc capables d'atteindre le plexus sous-muqueux. L'observation à la loupe binoculaire des prélèvements frais montre qu'un fragment de sous-muqueuse est toujours présent, sous la forme d'un amas cotonneux sous-jacent à l'épithélium qui, en se rétractant, enroule la muqueuse sur elle-même et expose sa face luminale ([figure 9](#)). Assez fréquemment la sous-muqueuse se détache spontanément de la muqueuse. L'utilisation de sections transversales et la dissociation spontanée de la sous-muqueuse expliquent l'absence de PSM sur la plupart des coupes.

4.1.2 Microdissection et immunomarquage de surface (*whole-mount*)

Une alternative simple est de procéder à la microdissection de la sous-muqueuse sur le tissu frais, avant fixation, ce qui facilite clivage et étirement.

Nous avons démontré la validité de la méthode dans une étude préliminaire de faisabilité concernant trois patients justifiant d'une coloscopie dans le cadre du dépistage du carcinome colorectal [211]. Ces patients avaient préalablement consenti à la pratique de biopsies pour la recherche si l'examen ne détectait pas d'anomalie ([article 1](#)).

Dans le protocole que nous proposons les biopsies réservées à l'analyse histologique sont placées à 4°C en solution vitale jusqu'à la dissection. Elles sont ensuite disséquées à la loupe binoculaire, de façon à séparer muqueuse et sous-muqueuse. Enfin la sous-muqueuse est étirée (en l'épinglant dans une boîte de Pétri recouverte d'une couche de résine solide) et fixée au paraformaldéhyde ([figure 9](#)).

Si la dissection et l'étirement sont correctement effectués, le fragment de sous-muqueuse final mesure approximativement 5 x 2 mm et a une épaisseur d'environ 50 µm. Il contient le PSM interne ou plexus de Meissner. Son épaisseur modeste permet la pénétration des anticorps utilisés en immunohistochimie, laquelle est facilitée par la présence d'un détergent (Triton X) dans le tampon. Elle permet également l'étalement du fragment de tissu entier entre lame et lamelle pour l'analyse au microscope.

En utilisant un marqueur neuronal tel que les neurofilaments à chaîne lourde (NF 200 kDa) comme anticorps primaire, l'immunomarquage de surface de la sous-muqueuse met en évidence l'ensemble des neurones qu'elle contient, sur une lame unique. L'immunomarquage des neurofilaments présente l'avantage de marquer à la fois les prolongements (surtout axonaux) et les somas des neurones sous-muqueux. Est ainsi mis à jour un dense réseau organisé en ganglions sous-muqueux et en fibres inter-ganglionnaires, formant le PSM de Meissner ([figure 10](#)).

L'utilisation de l'immunomarquage NF comme marqueur neuronal est controversée chez l'homme chez l'homme depuis une étude montrant que près de la moitié des neurones entériques n'expriment pas NF [179]. Pour autant, l'immunomarquage des neurofilaments (NF 200 kDa) a dans notre expérience une sensibilité équivalente à celui des protéines Hu C/D, considéré comme le marqueur pan-neuronal de référence ([figure 11](#) et [article 3](#)) [179]. Cette différence pourrait être liée à l'utilisation d'anticorps anti-NF différents.

Dans notre travail de mise au point sur 3 patients, nous avons ainsi dénombré $150 \pm 23,5$ neurones par biopsies, avec un nombre moyen de $4,4 \pm 0,7$ neurones par ganglion. Ce nombre de 150 neurones paraît modeste par rapport aux dizaines de milliers de cellules épithéliales présentes sur une biopsie colique, et explique aisément qu'ils soient intéressés de façon aléatoire par les coupes transversales. Cela étant ce

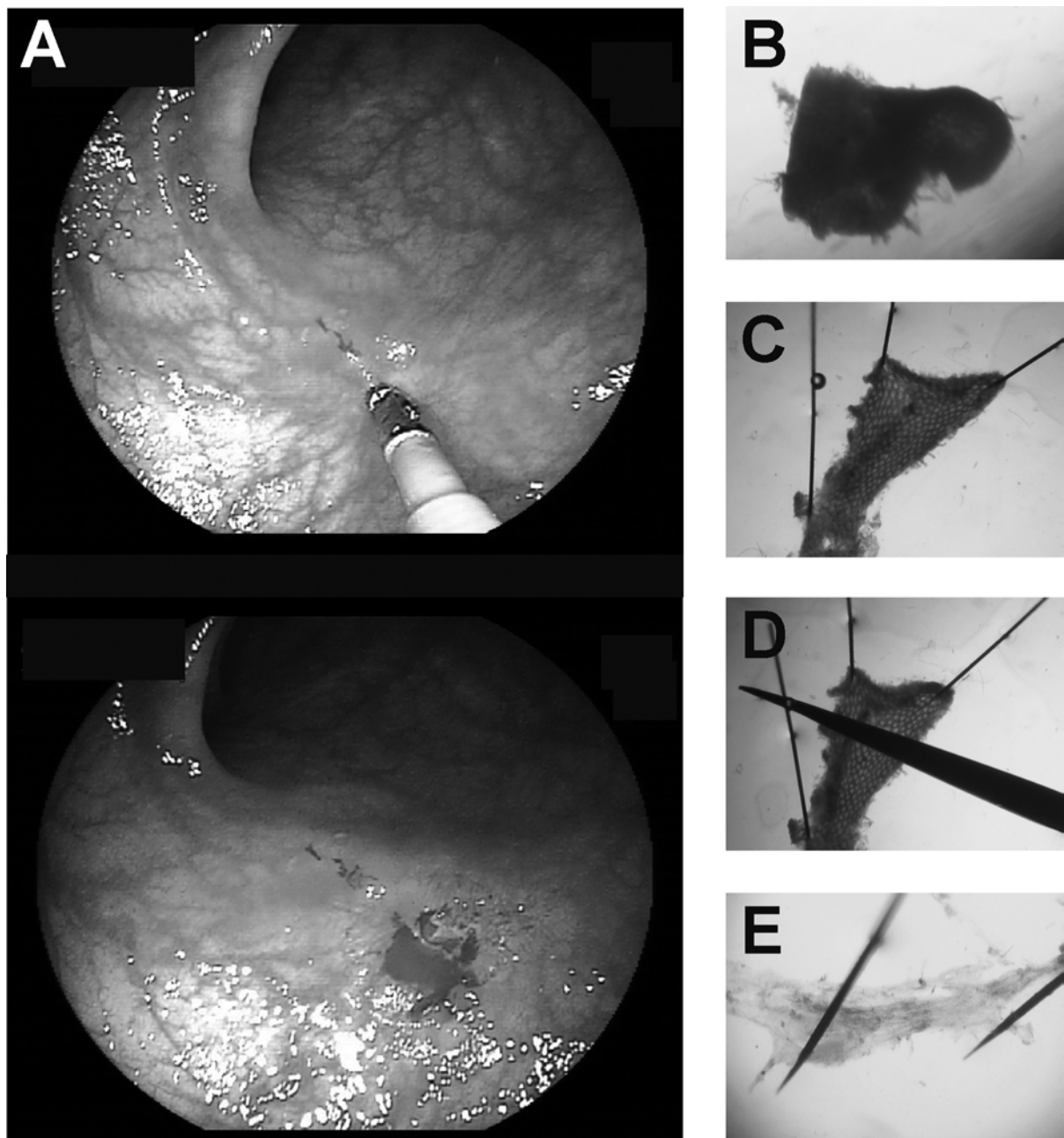


Figure 9. Micro-dissection des biopsies coliques

A. Coloscopie avec biopsie conventionnelle à la pince sans dard. **B-E.** Immédiatement après le prélèvement la muqueuse est enroulée sur elle-même et expose sa face luminale (**B**). Les biopsies sont placées dans une boîte de Pétri dont le fond est recouvert d'une résine translucide et immergées dans une solution physiologique et maintenues à 4°C. Elles sont étirées par des épingles, couchées sur leur face luminale (**C**). Un fragment de sous-muqueuse est presque constamment présent sous la forme d'un amas cotonneux sous-jacent à l'épithélium, qu'il est possible de microdisséquer (**D**) et d'étirer (**E**) en vue de la fixation au paraformaldéhyde.

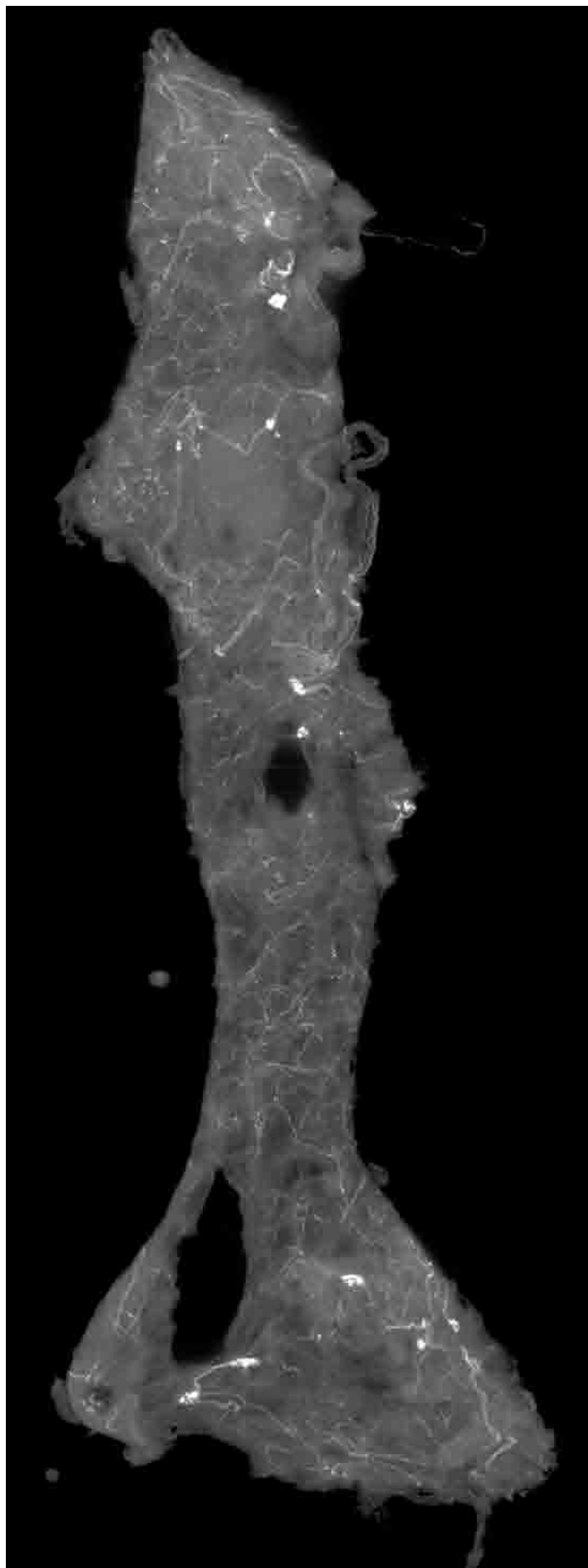


Figure 10. Immunomarquage des neurofilaments sur la sous-muqueuse colique

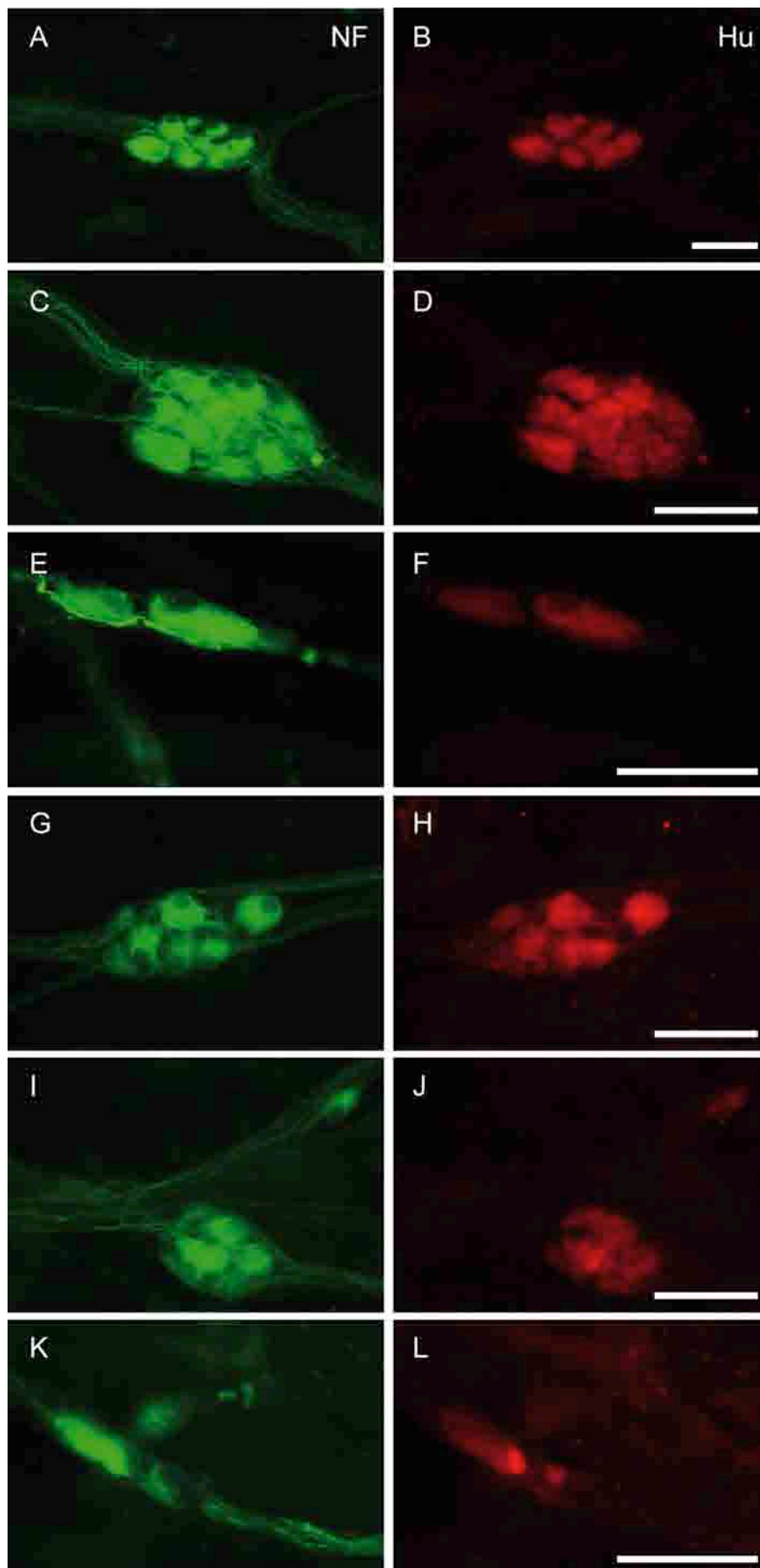


Figure 11.
Evaluation des
immunomarquages
NF et Hu C/D
en tant que
marqueurs
neuronaux

*Co-immunomarquage
de NF (anticorps anti
NF 200 kDa, colonne
de gauche, vert) et de
Hu C/D (colonne de
droite, rouge).
Tous les neurones
positifs pour Hu sont
marqués par l'anticorps
anti-NF, ce qui conforte
son utilisation comme
marqueur pan-neuronal
dans le plexus sous-
muqueux.
Images issues de
biopsies de 3 témoins
(A-F) et 3 patients
parkinsoniens (G-L).
Echelle 30 μ m.*

nombre est parfaitement compatible avec une analyse histologique exhaustive des neurones du PSM. Les marqueurs du phénotype neurochimique permettent d'appréhender de façon représentative, sur une ou plusieurs biopsies, les différentes populations neuronales du PSM, même les plus minoritaires (population dopaminergique par exemple) ([article 1](#)).

4.1.3 Analyse en biologie moléculaire (*Western blot*)

Des techniques biochimiques simples permettent également l'analyse sélective du contingent nerveux sous-muqueux minoritaire dans les biopsies coliques. L'électrophorèse et le transfert de protéines (*Western blot*) permettent l'identification et la détection d'une protéine spécifique à partir d'un homogénat tissulaire. Les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, puis transférées sur membrane de nitrocellulose. Une protéine est identifiée sur la membrane par un anticorps spécifique couplé à un système de révélation, et son emplacement permet de vérifier son poids moléculaire.

La sensibilité de cette technique permet d'analyser individuellement des protéines neuronales ou gliales minoritaires au sein d'un homogénat provenant d'une biopsie colique non disséquée. Dans notre travail de mise au point, nous avons montré qu'un homogénat de 4 biopsies coliques permet la mise en évidence de protéines neuronales (*protein gene product 9.5* - PGP 9.5) ou gliales (*glial fibrillary acidic protein* – GFAP et protéine S100 β), de façon reproductible ([figure 12](#) et [article 1](#)). Dans des manipulations complémentaires les acteurs majeurs des maladies neurodégénératives que sont les protéines Tau et α -synucléine sont aisément identifiées (travail non publié) ([figure 12](#)).

4.1.4 Limitations et perspectives

Les limitations principales de notre technique sont l'absence de transposition aisée aux autres étages du tube digestif et l'inaccessibilité du plexus myentérique.

Le tractus digestif supérieur, accessible par fibroscopie œso-gastro-duodénale, pose en effet le double problème de l'épaisseur de la couche muqueuse, particulièrement au niveau de l'œsophage et de l'estomac, et de l'absence de PSM nettement différencié. Au niveau du tractus digestif inférieur le rectum pose des problèmes similaires : si le PSM y est présent et dense, l'épaisseur de la couche muqueuse rend sa récupération plus aléatoire qu'aux étages supérieurs. En tout état de cause, une coloscopie courte suffit pour accéder de façon reproductible au SNE, puisque notre technique s'applique de façon fiable dès le sigmoïde.

L'inaccessibilité du plexus myentérique est certainement un inconvénient majeur, puisque son atteinte est la cause directe présumée des troubles de la motilité intestinale partagés par un grand nombre de pathologies digestives. Dans les rares études s'étant intéressées au sujet, l'analyse différentielle du plexus myentérique et du PSM montre néanmoins leur atteinte conjointe dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin [212], dans le syndrome du côlon irritable [213] ou la pseudo-obstruction intestinale chronique [214], soutenant l'idée que le plexus sous-muqueux puisse être en quelque sorte représentatif du plexus myentérique. Les innovations techniques futures permettront de concilier la double exigence de l'accès au plexus myentérique et de la sécurité. Des expériences de biopsies endoscopiques profondes (pan-pariétales) réalisées chez le grand animal vont dans ce sens [215, 216].

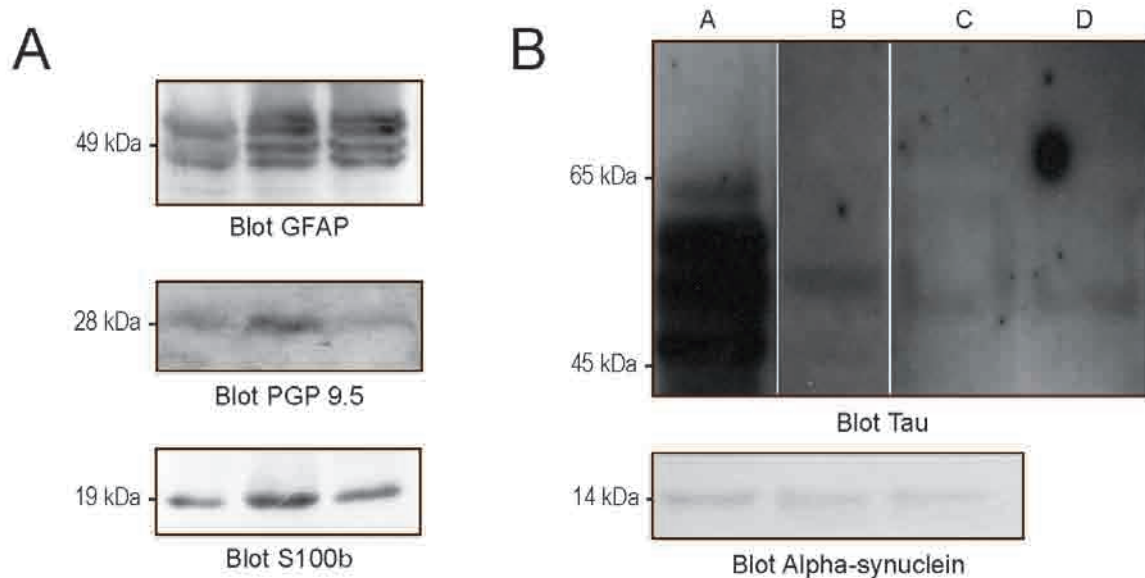


Figure 12. Analyse en biologie moléculaire (*Western blot*) des biopsies

Analyse en *Western blot* de lysats tissulaires issus de 4 biopsies par patient. **A.** Expression constitutionnelle par le système nerveux entérique des marqueurs classiques neuronaux (PGP 9.5) ou gliaux (GFAP, S100 β). **B.** Expression constitutionnelle des protéines neuronales impliquées dans la neurodégénérescence, la protéine Tau (haut) et la protéine alpha-synucléine (bas). Sur le blot tau, lysat de cerveau (bande A) puis plexus myentérique (prélèvement chirurgical, bande B) et biopsies coliques (bandes C et D). Les isoformes de tau exprimés par le SNE sont 0N4R dans le plexus sous-muqueux et 1N3R dans le plexus myentérique (52 et 54 kDa, respectivement).

Remerciements à Hélène Pouclet pour le blot tau.

Pour l'heure, les biopsies coliques de routine peuvent constituer un outil précieux pour l'analyse du contingent sous-muqueux du SNE, tant en histologie qu'en biologie moléculaire. L'accès au SNE que permet la coloscopie, en utilisant des techniques très simples, a été largement sous-estimé. Cette méconnaissance tient en partie aux raisons techniques que nous avons exposées plus haut, mais s'explique également par le développement très récent de la neurogastroentérologie et la méconnaissance de la physiologie et de la pathologie du SNE. La technique que nous proposons peut s'intégrer dans les nouveaux outils d'analyse du SNE, et participer pleinement à la meilleure caractérisation des neuropathies entériques. Confirmant la pertinence de cette approche, parallèlement à notre étude, les groupes de Metzger à Londres [217] et de Schemann à Munich [218] ont utilisé cet accès au SNE que procurent les biopsies digestives pour leurs propres travaux.

Article N°1 : Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients

Lebouvier T, Coron E, Chaumette T, Paillusson S, Bruley des Varannes S, Neunlist M and Derkinderen P. *Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients*. Neurogastroenterol Motil. 2010 Jan;22(1):e11-4.

Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients

T. LEBOUVIER,^{*,†,‡,§,1} E. CORON,^{*,†,‡,1} T. CHAUMETTE,^{*,†,‡} S. PAILLUSSON,^{*,†,‡} S. BRULEY DES VARANNES,^{*,†,‡,1} M. NEUNLIST^{*,†,‡,1} & P. DERKINDEREN^{*,†,‡,§,1}

^{*}Inserm, U913, Nantes, France

[†]University Nantes, Nantes, France

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

[§]Department of Neurology, CHU Nantes, Nantes, France

Abstract Better characterization of enteric neuropathies during the course of gastrointestinal diseases could be of great diagnostic and/or therapeutic interest. However, studies using whole mounts of the enteric nervous system (ENS) are restricted to specific diseases requiring surgery and are also limited by the small number of specimens available. Therefore, we here describe a novel method to obtain whole mounts of submucosal plexus in routine colonic biopsies. We show that a single biopsy displays a substantial number of submucosal ganglia and neurons and that it can be reliably used to perform morphometric and neurochemical analysis and Western Blots quantification of neuronal or glial markers. This method of analysis of the human ENS will enable us to gain better insight into the characterization of enteric neuropathies in living patients.

Keywords biopsy, colonoscopy, enteric nervous system, enteric neuropathy, submucosal plexus.

INTRODUCTION

Enteric neuropathies are mainly characterized by neurochemical or glial factor plasticity and/or degenerative processes of the enteric nervous system (ENS). These processes can be directly involved both in the course of

the diseases and their symptoms.¹ The study of enteric neuropathies in humans has been mainly performed on ENS obtained from surgical specimens, thereby restricting their characterization to the most severe cases [see for example, references (2,3)]. This paucity of data on ENS lesions is especially striking in the most common gastrointestinal (GI) pathologies such as irritable bowel syndrome, inflammatory bowel disease or motility disorders. Recently, access and characterization of the submucosal plexus (SMP) has been achieved using rigid forceps for gross biopsies.⁴ However, this technique, which is not commonly used, is limited to the exploration of the rectum, and presents greater risk of bleeding and perforation than routine biopsies. Therefore, a significant progress would be achieved if biopsies obtained during routine colonoscopy can be processed to analyze the ENS. In this study, we describe and validate a novel method to analyze the ENS in routine colonic biopsies using both immunohistochemistry and immunoblot. This method should pave the way to easily and efficiently characterize ENS lesions in various digestive and extra digestive diseases.

MATERIAL AND METHODS

Patients

Three patients (mean age 50.7 years, one male) requiring a total colonoscopy for colorectal cancer screening were included. They had no known neurologic disease. None suffered from functional digestive symptoms. Exclusion criteria for all study subjects were age <40 or >75 years, coagulopathies, and known pregnancy. No significant colonic lesion, whether inflammatory or neoplastic (apart from <3 benign adenomatous polyps of <10 mm great axis), was observed during the course of the colonoscopy. The study protocol was approved by the local Committee on Ethics and Human Research. Written consent was obtained according to the principles of Helsinki.

Address for correspondence

Michel Neunlist, Inserm U913, 1 place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes, France.

Tel: +33(0)240087515; fax: +33(0)240087506;

e-mail: michel.neunlist@univ-nantes.fr

¹T. L. and E. C. and P. D. and M. N. contributed equally to this work.

Received: 11 March 2009

Accepted for publication: 15 June 2009

Colonoscopy and tissue collection

A total of six biopsies from the descending colon were taken for immunohistochemical and Western Blot analysis. All biopsies were performed by an experienced endoscopist (E.C.) using standard biopsy forceps without needle (FB220U; Olympus co., Rungis, France) (Fig. 1A). Due to the rotation of the endoscopic view during the progression of the endoscope, it was not possible to differentiate between the mesenteric vs the antimesenteric side of the colon. The two biopsies intended for immunohistochemistry were immediately immersed in 4 °C saline or Hank's Buffered Salt Solution (HBSS; Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) and kept on ice for no more than an hour until dissection. The remaining four biopsies intended for Western Blot analysis were quick-frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C until further use.

Obtention of whole-mount from colonic biopsies

Biopsies were transferred in a Sylgard-coated Petri dish filled with 4 °C HBSS and during the whole dissection procedure HBSS was regularly changed with fresh cold HBSS. Unstretched biopsies adopt a 'corn-flake' appearance in the dish, wrapped or rolled up with the submucosa inside and the mucosa outside (Fig. 1B). Biopsies were therefore stretched and pinned flat under a stereomicroscope with the mucosa oriented on the bottom of the dish (Fig. 1C). The submucosa was then mechanically separated from the mucosa with watchmaker's forceps (Fig. 1D). The submucosa was then stretched and pinned flat (Fig. 1E) and fixed in phosphate buffered saline (PBS) with 4% paraformaldehyde for 3 h at room temperature or overnight at 4 °C. After fixation, the samples were rinsed thrice for 10 min with PBS and kept at 4 °C in PBS with 1% sodium azide (PBS/NaN₃) until further use.

Immunohistochemistry

Each whole mounts obtained from single biopsy was permeabilized for 1 h in PBS/NaN₃ containing 1% Triton X-100 and 4% horse serum, and then incubated with rabbit antineurofilament

200 kD (NF 200, 1:250; Millipore, Guyancourt, France) diluted in PBS/NaN₃, 4% horse serum, and 1% Triton-X for 12 h. Following incubation with primary antibodies, the tissue was washed with PBS and incubated for 3 h with donkey antirabbit IgG conjugated to FITC (1 : 500; Interchim, Montluçon, France). After a final wash, submucosa was laid flat on a microscope slide and mounted in an aqueous fluorescence mounting medium (DAKO, Trappes, France). Specimens were viewed under a Zeiss Axiovert 200 mol L⁻¹ microscope fluorescence microscope. Each fragment of submucosa was entirely scanned using the MosaiX module of Axovision software (Zeiss, Göttingen, Germany). The generated image was used as a map to analyze the whole biopsy and to perform the neuronal count. Area of each specimen was calculated from the reconstructed image using ImageJ software (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

Western Blot analysis

For Western Blot analysis, four biopsies (approximately 80 mg) were lysed in 500 µL of NETF buffer (100 mmol L⁻¹ NaCl, 2 mmol L⁻¹ ethylene glycol tetraacetic acid, 50 mmol L⁻¹ Tris-Cl, pH 7.4, and 50 mmol L⁻¹ NaF) containing 1% (v/v) NP-40 and protease inhibitors (Complete; Roche, Diagnostics, Meylan, France). Total protein content of the pooled biopsies was quantified using Pierce BCA Protein Assay (Thermo, Brebières, France). The lysates were separated using a NuPAGE® Novex 4–12% Bis-Tris Gel (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) prior to electrophoretic transfer onto nitrocellulose membrane (Hybond Pure; GE Healthcare, Orsay, France) using iBlot® Dry Blotting System (Invitrogen). Membranes were incubated for 10 min in 10% acetic acid then for 1 h at room temperature in Tris-buffered saline (100 mmol L⁻¹ NaCl, 10 mmol L⁻¹ Tris, pH 7.5) with 5% non-fat dry milk. Membranes were then incubated overnight at 4 °C with either rabbit antigial fibrillary acidic protein (GFAP) antibodies (1 : 500; Dako), anti protein gene product 9.5 (PGP 9.5) antibodies (1 : 1000; Ultracelone, Cambridge, UK) or anti beta-subunit of S100 protein (S100β) antibodies (1 : 500; Swant, Bellinzona, Switzerland). After three short washes, membranes

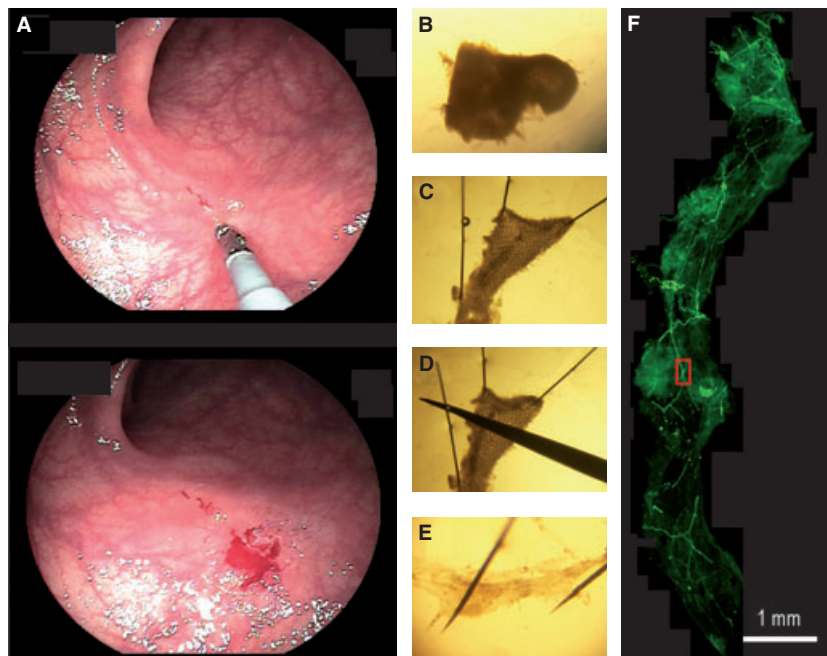


Figure 1 Obtention of whole-mount of the submucosal plexus (SMP) from colonic biopsies. (A) Biopsies are performed using standard biopsy forceps without needle. (B) Unstretched biopsies adopt a 'corn-flake' appearance in the Petri. (C) Biopsies are stretched and pinned flat under a stereomicroscope with the mucosa oriented on the bottom of the dish. (D) The submucosa is separated from the mucosa with watchmaker's forceps. (E) The submucosa is stretched and pinned flat. (F) Submucosa whole mount is stained using NF 200 antibody; the area highlighted in red will be analyzed in Fig. 2.

were incubated for 1 h at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated antirabbit or antimouse antibodies (Jackson ImmunoResearch, purchased from Immunotech, Marseille, France; diluted 1 : 10 000). Bound antibodies were visualized by enhanced chemiluminescence detection (ECL; GE Healthcare).

RESULTS

Submucosa whole mounts had an average size of $9.7 \pm 2 \text{ mm}^2$ (Table 1). NF 200 staining revealed the architecture of the submucosal plexus characterized by ganglia connected together via interganglionic fiber strands and the presence of single isolated neurons (Fig. 1F). The density of ganglia was 3.4 ± 0.95 per mm^2 and each ganglia contained an average of 4.4 ± 0.6 neurons (Figs 1F and 2A and Table 1).

Protein quantitation revealed that each biopsy contained an average of $435 \pm 153 \mu\text{g}$ proteins (Table 1). Western Blot analysis showed the ability to detect both a neuronal marker such as PGP 9.5 but also glial markers such as S100 β and GFAP (Fig. 2B).

DISCUSSION AND PERSPECTIVES

Combining routine colonic biopsies and microdissection techniques, our study demonstrates that the SMP can be readily analyzed in living patients. The risk of complications flowing the endoscopic procedure is very low as most of biopsies contain submucosa and the overall risk (bleeding and perforation) of standard biopsies is estimated to be below 0.1%.⁵ Our method, using whole mount of the SMP, presents over the conventional technique based on section of biopsies the ability to precisely phenotype the ENS. By retrieving a substantial number of ganglia, these routine biopsies can be relevant for the assessment of neuro/glia cell loss, changes in neurochemical phenotype and morphometric changes in patients with enteric neuropathy, as recently evidenced in Parkinson's disease.⁶ In a previous report, the phenotype of the ENS in Crohn's disease was assessed by evaluating an average of 50 ganglia/patients.⁴ We show here that a single colonic biopsy contains 34 ± 3 ganglia implying that an

Table 1 Quantitative characteristics of one colonic biopsy per patient. The last column represents the Mean and standard deviation of the three samples

Patient	Sex	Age	Neurons/ biopsy	Ganglions/biopsy	Neurons/ganglion	Neuronal density (neurons/ mm^2)	Ganglion density (ganglia/ mm^2)	Surface (mm^2)	μg of proteins per biopsy
1	M	44	177	35	5.1	11.8	2.3	11.8	580.7
2	F	60	139	31	4.5	16.5	3.9	8	275.9
3	F	48	134	37	3.6	14.4	4.0	9.3	448.6
		50.7 ± 8.3	150 ± 23.5	34.3 ± 3	4.4 ± 0.7	14.2 ± 2	3.4 ± 0.9	9.7 ± 2	435 ± 153

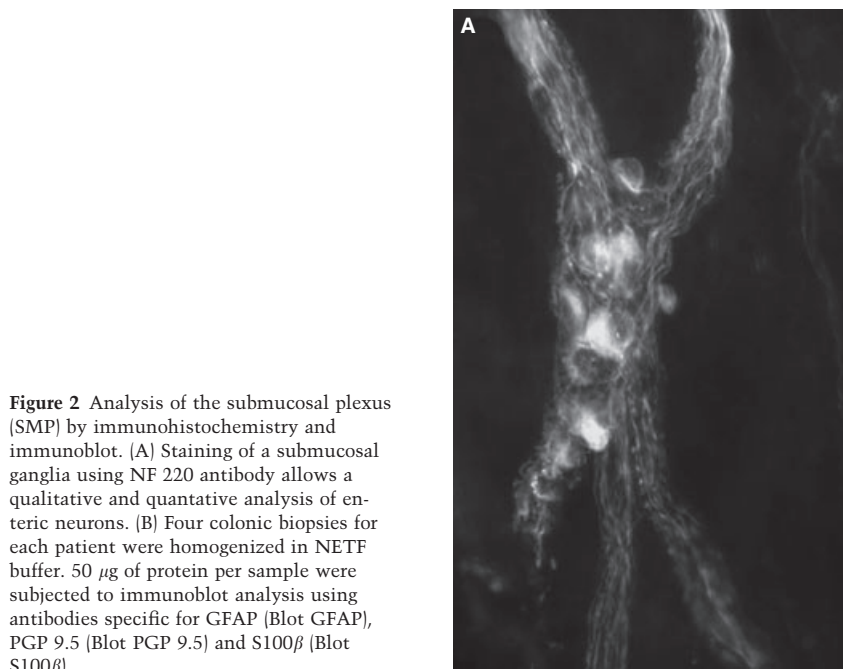
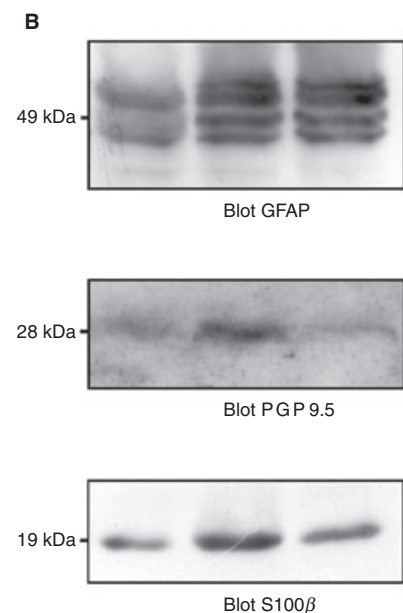


Figure 2 Analysis of the submucosal plexus (SMP) by immunohistochemistry and immunoblot. (A) Staining of a submucosal ganglia using NF 220 antibody allows a qualitative and quantitative analysis of enteric neurons. (B) Four colonic biopsies for each patient were homogenized in NETF buffer. 50 μg of protein per sample were subjected to immunoblot analysis using antibodies specific for GFAP (Blot GFAP), PGP 9.5 (Blot PGP 9.5) and S100 β (Blot S100 β).



average of two biopsies would be sufficient to perform such an analysis, a goal easy to achieve using routine colonoscopy. Interestingly, the density of submucosal ganglia evaluated in biopsies was similar to the one obtained using full thickness preparation from surgical specimens (data not shown). In addition, our study enables the assessment of the expression of both neuronal and glial markers in a single colonic biopsy by Western Blot analysis.

Although our protocol was originally designed for biopsies from the ascending colon, it can be applied to virtually all levels of the gastrointestinal tract. In our experience however, the submucosal tissue is scarce and inconstantly retrieved from gastric, oesophageal and to a lesser extent rectal biopsies, due to the thickness of the mucosa and/or physiological hypotrophy. The main limitation of our method is the inability to access to myenteric ganglia, which are altered in various gastrointestinal motility disorders. Nevertheless, several studies have reported the presence of lesions both in the myenteric plexus and the SMP in pathologies such as

inflammatory bowel disease,⁷ irritable bowel syndrome⁸ or motility disorders,⁹ suggesting that the analysis of SMP is relevant in the global context of enteric neuropathy.

In conclusion, this analysis of standard colonic biopsy allows both a qualitative and quantitative assessment of the SMP and thus provides new insights into the characterization of enteric neuropathies in living patients. This could have direct diagnostic and therapeutic impact for various diseases but also opens the door to a better understanding of the pathophysiology of enteric neuropathies, by allowing repeated analysis of the evolution of ENS lesions during the course of diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from France Parkinson, CECAP and ADPLA (association des parkinsoniens de Loire Atlantique), Groupement de Parkinsoniens de Vendée and Inserm/DHOS (to P. D. and M. N.). P. D. and M. N. are recipients of a Contrat d'Interface Inserm. T. L. is a recipient of poste d'accueil INSERM.

REFERENCES

- De Giorgio R, Camilleri M. Human enteric neuropathies: morphology and molecular pathology. *Neurogastroenterol Motil* 2004; **16**: 515–31.
- De Giorgio R, Guerrini S, Barbara G *et al.* Inflammatory neuropathies of the enteric nervous system. *Gastroenterology* 2004; **126**: 1872–83.
- Neunlist M, Aubert P, Toquet C *et al.* Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. *Gut* 2003; **52**: 84–90.
- Schneider J, Jehle EC, Starlinger MJ *et al.* Neurotransmitter coding of enteric neurones in the submucous plexus is changed in non-inflamed rectum of patients with Crohn's disease. *Neurogastroenterol Motil* 2001; **13**: 255–64.
- Dafnis G, Ekbom A, Pahlman L, Blomqvist P. Complications of diagnostic and therapeutic colonoscopy within a defined population in Sweden. *Gastrointest Endosc* 2001; **54**: 302–9.
- Lebouvier T, Chaumette T, Damier P *et al.* Pathological lesions in colonic biopsies during Parkinson's disease. *Gut* 2008; **57**: 1741–3.
- Ferrante M, de Hertogh G, Hlavaty T *et al.* The value of myenteric plexitis to predict early postoperative Crohn's disease recurrence. *Gastroenterology* 2006; **130**: 1595–606.
- Tornblom H, Lindberg G, Nyberg B, Veress B. Full-thickness biopsy of the jejunum reveals inflammation and enteric neuropathy in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2002; **123**: 1972–9.
- Iantorno G, Bassotti G, Kogan Z *et al.* The enteric nervous system in chagasic and idiopathic megacolon. *Am J Surg Pathol* 2007; **31**: 460–8.

4.2 Utilisation des biopsies coliques pour l'analyse du système nerveux entérique dans la maladie de Parkinson

Les données de la littérature montrent l'atteinte presque constante et précoce du SNE dans la MP. Des inclusions (prolongements ou corps de Lewy) sont mises en évidence dans la muqueuse, le PSM et le PM à tous les étages du tractus digestif [141]. Disposant d'un outil relativement simple pour l'étude de la composante sous-muqueuse du système nerveux entérique chez l'homme, nous avons voulu éprouver sa sensibilité pour mettre en évidence les lésions pathologiques de la MP.

Dans nos différents travaux (articles 2 à 6), près de 40 patients parkinsoniens et près de 20 témoins ont accepté de se soumettre à une coloscopie totale ou à une rectosigmoïdoscopie, au cours desquelles entre 10 et 30 biopsies ont été pratiquées à des fins de recherche. Les témoins justifiaient d'une coloscopie principalement pour le dépistage du carcinome colorectal. Ils étaient sortis de l'étude avant ou après prélèvement si l'examen macro ou microscopique révélait des anomalies substantielles. L'âge et le sexe des patients et des témoins retenus n'étaient pas significativement différents.

L'ensemble des patients recrutés l'a été dans le cadre de 2 études (ENTEROPARK et COLOBIOPARKER) approuvées par le Comité de Protection des Personnes Ouest VI et inscrits au registre *ClinicalTrials.gov* (identifiants NCT00491062 et NCT01353183).

4.2.1 Une perte neuronale subtile dans le plexus sous-muqueux

4.2.1.1 Différences qualitatives

Dans une première approche, une série d'immunomarquages généraux neuronaux ou gliaux a été réalisée (Hu C/D, NF 200 kDa, PGP9.5, NSE, GFAP, S100 β) sur des fragments de sous-muqueuse issus de biopsies des côlons ascendant et descendant. Leur analyse subjective sur 5 patients et 5 témoins ne révèle pas de différence qualitative qui résiste au « test en aveugle » (données non publiées).

4.2.1.2 Différences quantitatives

Nos expériences préliminaires confortant l'utilisation de NF comme anticorps pan-neuronal, nous avons effectué le décompte systématique des neurones et des ganglions dans le PSM, évalué l'aire des fragments de sous-muqueuse après dissection et fixation, et obtenu ainsi le nombre moyen de neurones par ganglion, la densité neuronale et la densité ganglionnaire. Les deux derniers paramètres ont été abandonnés car non discriminants et trop dépendants de facteurs impondérables, comme l'étirement des biopsies ou le repliement du plexus sur lui même, qui peuvent biaiser les mesures de densité.

L'analyse a porté sur 2 biopsies coliques par patient issu de notre série principale (29 MP et 10 témoins). **Le nombre moyen de neurones NF par ganglion s'élevait à $4,3 \pm 0,8$ chez les témoins.** Ce résultat est proche mais inférieur au nombre de $5,0 \pm 1,2$ retrouvé dans une étude comparable utilisant NSE comme marqueur [185]. Au-delà de la différence de sensibilité des marqueurs neuronaux, cette différence est possiblement liée à l'âge des patients (plus élevé dans notre étude) ou à une divergence dans la définition des ganglions (nous avons estimé qu'un neurone isolé constituait un ganglion sous muqueux). **Chez les**

patients parkinsoniens, nous avons observé une diminution subtile mais significative du nombre moyen de neurones par ganglion ($3,7 \pm 0,8$; $p=0,04$) (article 3).

Cette diminution ne constitue évidemment pas la preuve qu'un processus neurodégénératif aboutissant à une perte neuronale affecte le PSM. Une altération du phénotype des neurones entériques se traduisant par une diminution de l'expression de NF pourrait alternativement rendre compte de nos résultats. Le facteur confondant de la constipation chronique doit être également pris en compte, d'autant qu'une perte neuronale est inconstamment mise en évidence chez les patients constipés [73]. Nous avons essayé de nous départir de ce facteur confondant en incluant dans notre travail préliminaire 3 patients atteints de constipation chronique (article 2). Il n'existait pas de perte neuronale sous-muqueuse majeure chez ces trois individus constipés. Mais compte tenu des effectifs restreints, nous n'avons pas retrouvé de différence entre les 5 patients parkinsoniens et les 5 témoins dans cette première étude, ce qui remet en cause la validité de ce résultat (possible erreur de type 2) (article 2).

Des immunomarquages de la caspase 3 activée ont été réalisés en complément chez quelques patients dans l'espoir candide de mettre directement en évidence la mort neuronale programmée dans le PSM. Il n'y avait aucun marquage neuronal spécifique (données non publiées). La chronologie insidieuse du processus dégénératif dans la maladie de Parkinson est en effet difficilement compatible avec l'identification de neurones apoptotiques. L'apoptose, principal mécanisme de mort cellulaire dans les affections dégénératives [219], est un phénomène tardif et de courte durée. A titre d'exemple, l'immunomarquage de la caspase 3 activée, l'un des meilleurs marqueurs d'apoptose, n'identifie qu'un neurone sur 5000 à un neurone sur 1500 dans la maladie d'Alzheimer [220].

A supposer qu'elle existe, cette perte neuronale sous-muqueuse modeste contredit une étude précédente réalisée sur un plus petit nombre de patients [150]. Les implications de ces résultats sont remarquables à la lumière de l'hypothèse de Braak et des travaux d'Orimo [135, 154], qui pointent les neurones postganglionnaires du SNA en général et du SNE en particulier comme le premier maillon de la cascade dégénérative.

4.2.2 Altérations de l'innervation sympathique et intégrité des neurones dopaminergiques dans le plexus sous-muqueux colique

Ces données sont issues de travaux non publiés sur l'immunomarquage de la TH dans le PSM colique, réalisés dans notre série principale (29 MP et 10 témoins). L'immunomarquage de la TH révèle un dense réseau de fibres nerveuses, constitué pour l'essentiel des axones noradrénergiques des neurones postganglionnaires sympathiques. Rarement un neurone sous-muqueux intrinsèque immunoréactif pour la TH est identifié: son phénotype est alors obligatoirement dopaminergique obligatoire (cf. 3.1.4.5).

4.2.2.1 Analyse de l'innervation sympathique

Si leur densité est similaire, la morphologie des prolongements nerveux exprimant la TH semble différer légèrement entre sujets parkinsoniens et témoins. Ces prolongements sont soit des fibres nerveuses fines et continues, soit des structures moniliformes formées d'une succession de varicosités parfois nettement dystrophiques (figure 13). A l'analyse qualitative, la proportion de fibres continues semble supérieure chez le témoin, et les fibres nerveuses discontinues ou dystrophiques semblent prédominer chez les patients.

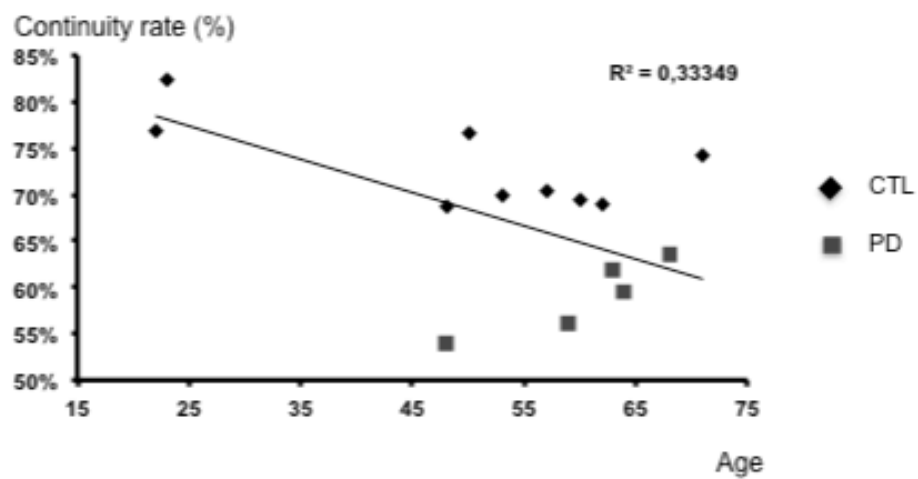
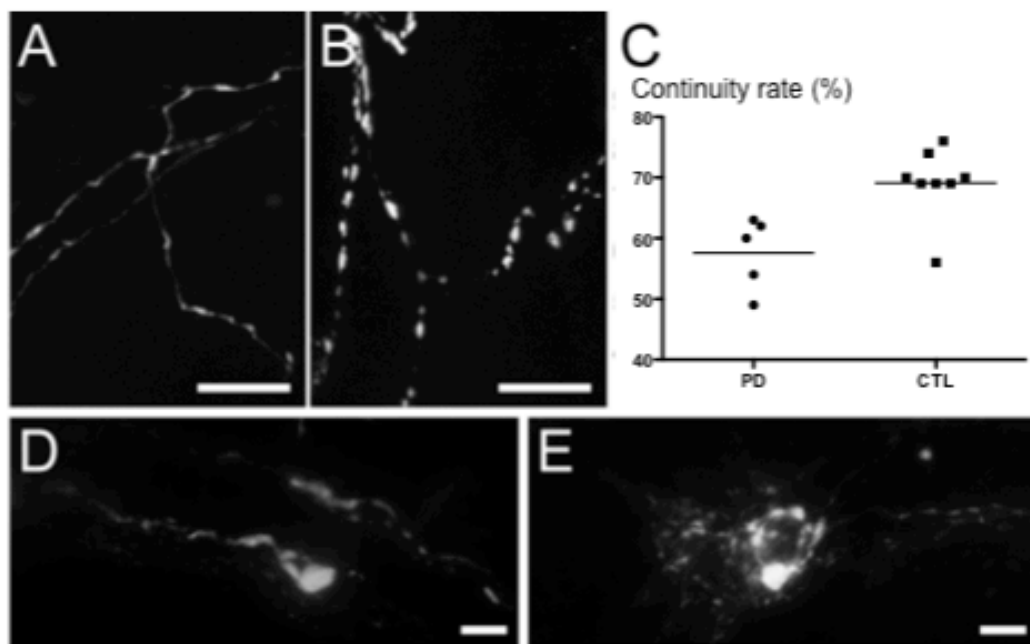


Figure 13. Analyse de la continuité des prolongements exprimant la tyrosine hydroxylase

Nous avons mesuré la discontinuité des prolongements par une analyse en microscopie à fluorescence (microscope Zeiss Axiovert 200M équipé d'un Apotome et d'un objectif à huile 63x 1.4 n.a.) chez 5 patients et 10 témoins, parmi lesquels 5 étaient plus jeunes que les patients parkinsoniens (patients recrutés par le centre d'endoscopie ayant consenti à la réalisation de biopsies supplémentaires pour la collection biologique du CIC-04). Les images de PSM de témoins et de patients ont été acquises avec les mêmes paramètres (temps d'exposition 50 ms, caméra digitale à haute résolution AxioCam MRm), selon le protocole suivant: des piles d'images (Z-stacks) de sections optiques de 1 μm ont été réalisées sur une épaisseur (Z) de 6 μm , couvrant la totalité de l'épaisseur du plexus sous-muqueux ; des projections d'intensité maximale le long de l'axe Z permettent finalement d'appréhender sur deux dimensions l'ensemble des prolongements du PSM (réalisées avec le logiciel ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Les images des projections traduites en format à 256 niveaux de gris (*8-bit gray-scale*) ont été utilisées pour l'analyse morphométrique. L'analyse de la continuité des prolongements a été réalisée avec NeuronJ, un module d'extension pour ImageJ réalisant une délimitation automatisée des prolongements [221]. L'intensité de la fluorescence et les coordonnées de chaque point de l'axe des prolongements ont été traduites sous forme de graphe représentant l'intensité de fluorescence (de 0 à 255) en fonction de la distance (μm). Pour mesurer la discontinuité des prolongements, un seuil arbitraire a été fixé à 50% de l'intensité de fluorescence moyenne de chaque prolongement; **le taux de continuité** est alors défini comme le ratio de la longueur totale des segments situés au dessus du seuil sur la longueur totale du prolongement. Pour chaque sujet a ainsi été calculée la moyenne des taux de continuité rapportée à la longueur totale des prolongements analysés. Le processus a été automatisé par l'utilisation de macros.

Confortant les données de l'analyse subjective, **les prolongements TH sont plus discontinus chez les patients parkinsoniens** ($57,6 \pm 2,7\%$) comparés aux témoins d'âge équivalent ($69,1 \pm 2,1\%$, $p=0,006$). Un effet de l'âge se dessine sur le taux de discontinuité (*figure 13*). L'immense majorité ($94 \pm 3\%$) des fibres TH analysées était également immunoréactives pour la DBH, confirmant leur origine sympathique.

Ces modifications morphologiques sont très similaires aux altérations de l'innervation sympathique observées chez le rat avec le vieillissement [206]. Au delà des altérations fonctionnelles identifiées par exemple par la scintigraphie au MIBG, il existe des altérations morphologiques de l'innervation sympathique dans la maladie de Parkinson. Les fibres nerveuses sympathiques de l'épicaarde, analysées par le marquage de la TH, ont un aspect dystrophique [154]. Au niveau du SNE cependant, la spécificité pour la maladie de Parkinson des modifications morphologiques que nous avons observées devra être confirmée sur de plus grandes séries, en tenant compte de l'âge comme facteur confondant (travaux non publiés).

4.2.2.2 Population neuronale dopaminergique intrinsèque

La caractérisation exhaustive du phénotype neurochimique des neurones sous-muqueux et myentérique (immunomarquages ChAT, NOS et VIP) reste à effectuer dans la maladie de Parkinson. Le manque de tissus disponibles et des problèmes de sensibilité et de spécificité d'anticorps nous ont conduit à négliger cet aspect pour le moment. En revanche, et compte tenu de l'implication des neurones dopaminergiques dans la physiopathologie du syndrome parkinsonien, les immunomarquages TH disponibles ont été mis à profit pour l'étude de la population dopaminergique intrinsèque.

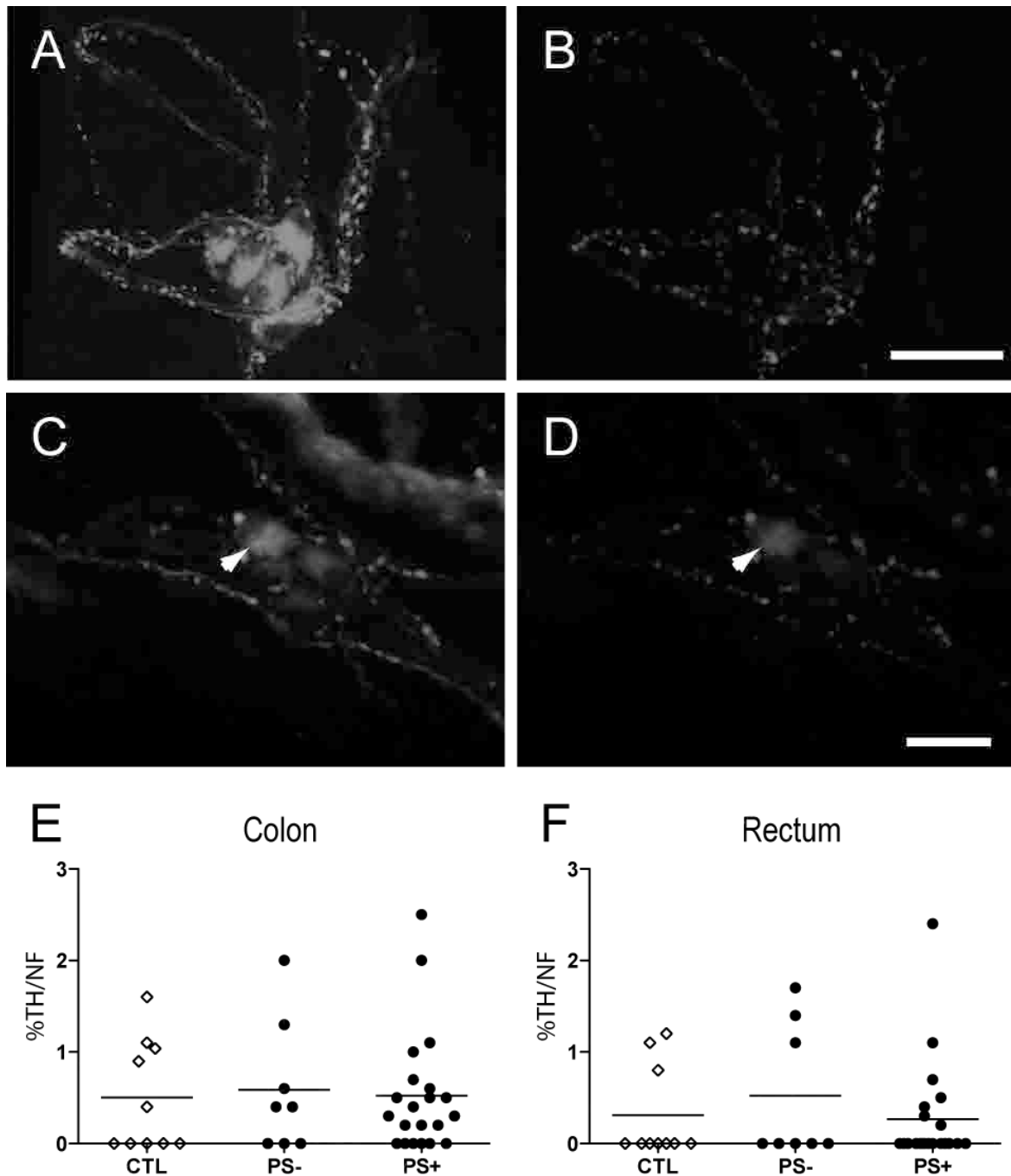


Figure 14. Absence de perte en neurones dopaminergiques dans le plexus sous-muqueux au cours de la maladie de Parkinson

Co-immunomarquage NF (AC) et TH (BD) de ganglions sous-muqueux chez un témoin (AB) et chez un patient (CD). Flèche : neurone dopaminergique. EF. Il n'existe pas de variation significative de la proportion de neurones dopaminergiques entre témoins et parkinsoniens, et entre témoins et patients avec (PS+) ou sans inclusions de Lewy (PS-).

Un double immunomarquage de la TH et des neurofilaments montre que les neurones dopaminergiques ne représentent que $0,37 \pm 0,44\%$ des neurones sous-muqueux coliques NF chez le sujet sain. **Cette proportion est similaire chez les patients parkinsoniens** ($0,47 \pm 0,49\%$; $p=0,590$) (figure 14, données non publiées).

Ces résultats concordent avec les études précédentes établissant que seule une infime fraction des neurones entériques est dopaminergique (0 à 5% de la population neuronale totale). Elle a été estimée à 0% dans le PSM et à 4% dans le PM coliques par Anlauf [151]. Si nos résultats doivent être interprétés avec prudence compte tenu du faible contingent neuronal concerné, **l'intégrité des neurones dopaminergique du SNE dans la maladie de Parkinson** est une démonstration supplémentaire de l'absence de vulnérabilité spécifique des neurones dopaminergiques au-delà de la substance noire [222].

Dans notre publication initiale (article 2), la caractérisation de la population dopaminergique tenait compte à la fois des neurones exprimant faiblement et fortement la tyrosine hydroxylase, ce qui rend compte de proportions de neurones dopaminergiques anormalement élevées (plus de 10%) et en contradiction avec la littérature. *A posteriori*, le décompte des neurones faiblement marqués est peu reproductible et la spécificité du marquage douteuse (possible immunoréactivité croisée). L'analyse que nous présentons ici, ne tenant compte que des neurones dont l'immunoréactivité est intense, semble être le reflet de la réalité. De telles problématiques renvoient évidemment à la subjectivité des analyses immunohistologiques.

4.2.3 Des inclusions de Lewy sous-muqueuses chez 72% des patients

4.2.3.1 Immunomarquage de l' α -synucléine totale

Dans des manipulations préliminaires chez 3 patients et 3 témoins, l'immunomarquage de l' α -synucléine totale révèle **un marquage diffus des prolongements tant chez les patients que chez les témoins** (figure 15-1). Si ce résultat peut paraître décevant dans une perspective de biomarqueur différentiel, il est à l'image de ce qui est observé dans le SNC où existe une expression physiologique diffuse de l' α -synucléine, dans le cytosol, en position vésiculaire ou membranaire, et dans le neuropile, en position présynaptique [95, 99]. Les techniques d'immunohistochimie traditionnelle favorisent la dissolution et la dispersion des protéines solubles ou liées aux membranes au cours de l'inclusion en paraffine et du démasquage antigénique. Cela explique le marquage apparemment préférentiel des inclusions dans le parenchyme. Notre technique d'immunohistochimie de surface, en respectant l'intégrité du tissu, va mettre en évidence l'ensemble des pools d' α -synucléine, qu'ils soient solubles, lié aux membranes ou agrégés.

Or l' α -synucléine est exprimée de façon physiologique par le SNA, où elle est un excellent marqueur des efférents parasympathiques (neurones du noyau dorsal du vague essentiellement) dans lesquels elle est intensément exprimée [223]. Au sein du SNE elle est exprimée dans 3 à 22% des neurones myentériques chez le rat sans claire affinité pour un phénotype neurochimique particulier [223]. Cette intense expression physiologique au sein du SNE est donc attendue.

Occasionnellement des structures dystrophiques sont décelables chez les patients (figure 15-1) mais difficiles à distinguer de l'intense marquage physiologique. L'utilisation de ces structures dystrophiques comme critère de discrimination des patients et des témoins ne résiste pas au test en aveugle (données non publiées).

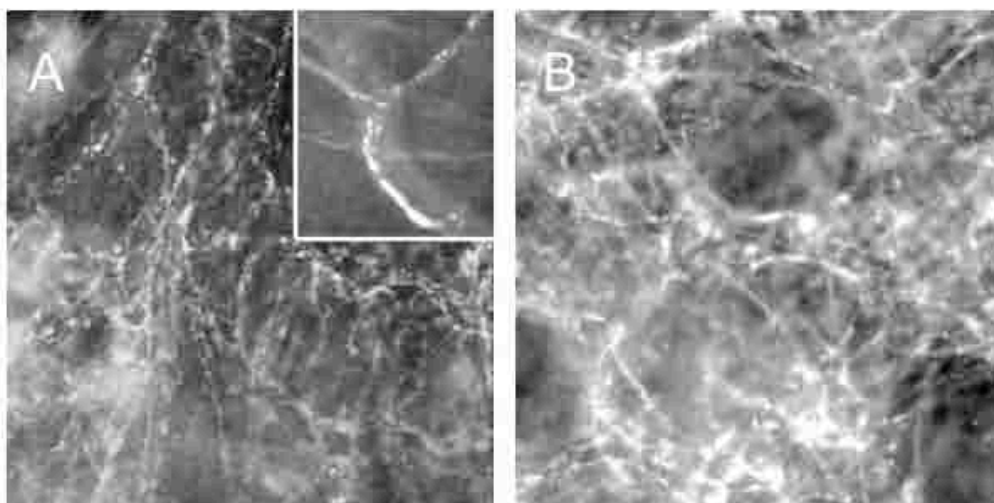


Figure 15-1. Immunomarquage de l' α -synucléine totale

Patient (A) et témoin (B). Exemple de prolongement dystrophique en vignette en A. Il n'y a pas de différence significative entre patients et témoins.

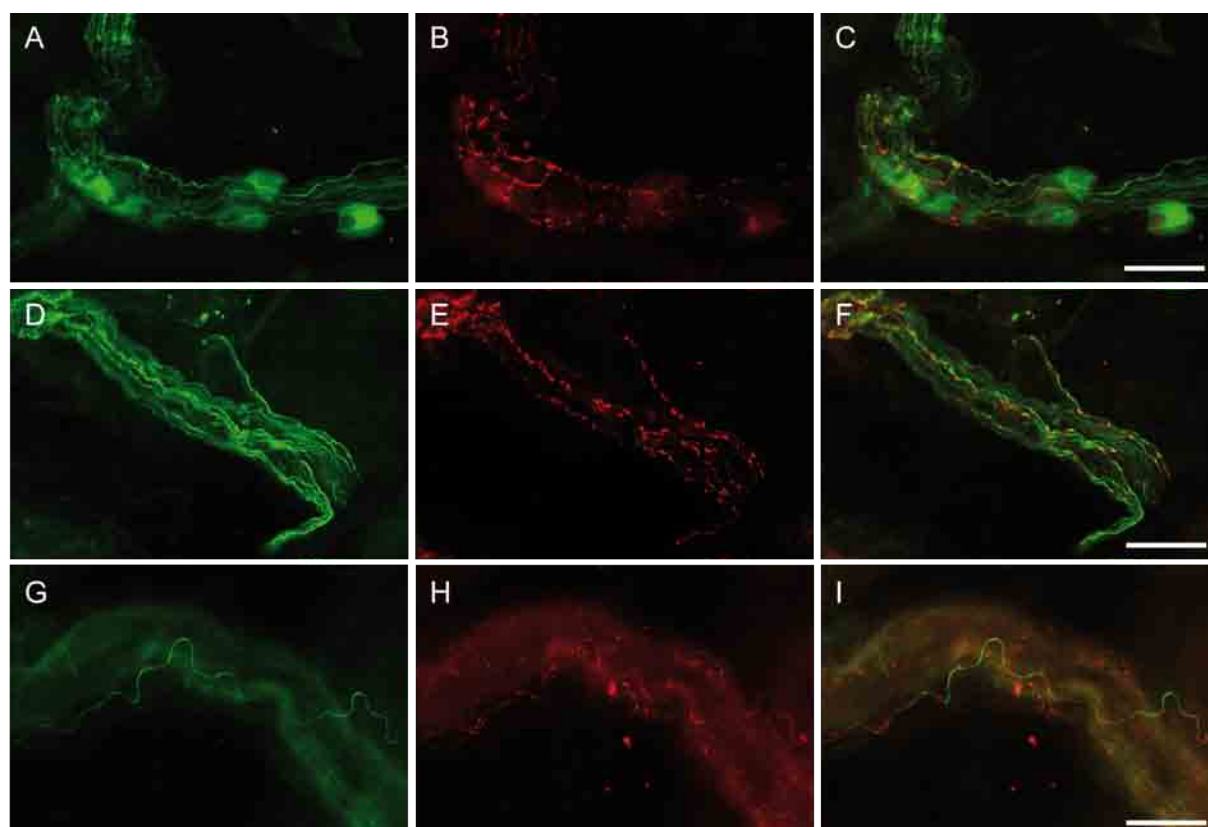


Figure 15-2. Immunomarquage de l' α -synucléine phosphorylée

Immunomarquages NF (ADG), α -synucléine phosphorylée (BEH) et leur superposition (CFI) sur des biopsies de patients. Exemples de prolongements de Lewy au sein d'un ganglion (A-C), en faisceau (D-F) et périvasculaire (G-I).

4.2.3.2 Immunomarquage de l' α -synucléine phosphorylée

Nous avons mis à profit les modifications post-traductionnelles de l' α -synucléine pour détecter les inclusions spécifiques de la maladie de Parkinson. Les anticorps dirigés contre l' α -synucléine phosphorylée sur son résidu sérine 129 sont sensible et spécifiques des inclusions (prolongements ou corps de Lewy) au niveau central [90] mais également au niveau périphérique [224]. Depuis notre travail, ils ont été utilisés avec succès dans plusieurs séries autopsiques [141, 154].

Dans notre série principale rassemblant 29 patients parkinsoniens, 4 biopsies coliques (2 dans le côlon ascendant et 2 dans le côlon descendant) et 2 biopsies rectales ont été analysées pour chaque patient selon notre protocole. **Vingt-et-un patients (72%) présentaient des inclusions de Lewy dans le plexus sous-muqueux** sur l'une au moins des biopsies. Aucun des témoins ne présentaient d'immunoréactivité significative pour l' α -synucléine phosphorylée, en dehors d'une faible immunoréactivité somatique présente chez les patients et chez les témoins ([article 3](#)).

4.2.3.3 Morphologie

Ces inclusions étaient représentées **exclusivement par des prolongements de Lewy**, définis comme la colocalisation d'un immunomarquage NF et α -synucléine phosphorylée sur un prolongement neuronal positif pour NF. Nous n'avons pas mis en évidence de corps de Lewy dans le soma des neurones sous-muqueux. Les prolongements de Lewy se présentaient sous la forme de prolongements isolés ou en faisceaux, de taille et de longueur variable ([figure 15-2](#)). La variation de la densité des lésions était frappante. D'un patient à l'autre, on pouvait observer un petit prolongement isolé sur l'une des 4 biopsies ou à l'extrême inverse de multiples prolongements de Lewy sur chacune des 4 biopsies.

Parmi ces prolongements, 37% étaient en position périvasculaire et 60% co-exprimaient la tyrosine hydroxylase. Sur un sous-groupe de 6 patients, 51% des prolongements co-exprimaient la dopamine- β -hydroxylase (DBH). Ainsi la moitié au moins des lésions dépend de neurones postganglionnaires sympathiques extrinsèques au SNE ([article 3](#)).

L'absence de corps de Lewy dans le PSM confirme les résultats autopsiques qui montrent de façon assez reproductible une atteinte moindre du PSM [133, 141], principalement neuritique [135]. En revanche, les inclusions somatiques (corps de Lewy) sont fréquentes dans le PM (nos résultats non publiés) [131, 133, 135, 141, 146-149]. Ces données empêchent d'affirmer avec certitude que le PSM est intrinsèquement affecté par le processus dégénératif. Et en effet, plus de la moitié des prolongements de Lewy du PSM lui sont extrinsèques, n'étant que le reflet de la dégénérescence globale des prolongements postganglionnaires sympathiques [154, 225]. La mise en évidence d'une perte neuronale discrète dans le PSM prend ici toute son importance. Bien que discutable, **il s'agit du seul résultat quantifié**, dans notre étude et dans la littérature en général, **en faveur d'une neurodégénérescence entérique intrinsèque**.

4.2.3.4 Distribution

Elle a été analysée sur 26 patients, 4 sur les 30 inclus ayant des biopsies rectales non exploitables. D'une façon générale, le rendement des biopsies rectales pour atteindre la sous-muqueuse est inférieur à celui des biopsies coliques du fait de l'épaisseur de la muqueuse.

Dix-sept patients sur 26 (65%) avaient au moins une biopsie positive dans le côlon ascendant, 11/26 (42%) dans le côlon descendant et seulement 6/26 (23%) dans le rectum. Tous les patients ayant une biopsie rectale positive avaient au moins une biopsie colique positive ([article 5](#)).

Des biopsies endoscopiques réalisées *in vivo*, bien que limitées à l'analyse PSM, suffisent donc à mettre en évidence le gradient rostrocaudal des inclusions de Lewy au sein du SNE identifié sur une large série autopsique [141]. Ce gradient peut être mis en relation avec la distribution de l'innervation vagale du tube digestif, qui s'interrompt progressivement au niveau du côlon transverse où le relais est pris par l'innervation parasympathique d'origine sacrée [226, 227]. Cette explication est séduisante mais est difficilement conciliable avec la large participation sympathique aux lésions du PSM que nous avons démontrée.

4.2.4 Analyse biochimique de l' α -synucléine dans les biopsies coliques

L'analyse morphologique du PSM est évidemment irremplaçable pour localiser les inclusions, établir leur nature (prolongement ou corps de Lewy) et leur densité. Mais si la plupart des prélèvements ne prêtent pas aux hésitations sur la présence ou l'absence d'inclusions neuronales, quelques uns présentent une pathologie douteuse ou fruste sur laquelle il est difficile de conclure. La subjectivité de l'analyse est un travers inhérent à toutes les techniques d'imagerie. En outre, la microdissection, l'immunomarquage de surface, le montage et l'analyse sont des étapes longues, techniquement difficiles, qu'il est difficile de standardiser.

L'utilisation de méthodes biochimiques pour identifier les formes pathologiques de l' α -synucléine (agrégées et/ou phosphorylées) permettrait une interprétation objective et quantifiable des résultats et une standardisation de la technique. Dans notre série principale de 29 patients parkinsoniens et 10 témoins, 4 biopsies par site étaient systématiquement immergées dans l'azote liquide aussitôt après le prélèvement, conservées à -80°C et réservées à l'analyse biochimique.

4.2.4.1 *Electrophorèse unidimensionnelle et transfert de protéines (Western blot)*

La technique de *Western blot* permet l'identification de l' α -synucléine dans des homogénats tissulaires issus de 4 biopsies poolées. Après extraction des protéines dans un tampon de lyse, en conditions non-dénaturantes (tampon de lyse type RIPA) ou dénaturantes (lyse effectuée dans 1% de SDS à 100°C), l' α -synucléine est mise en évidence sous la forme d'une bande à 14 kDa (anticorps BD Biosciences 610787). Cependant le signal est faible, à la limite du seuil de détection, et il n'existe pas de différence quantitative ou qualitative entre patients et témoins. En utilisant les anticorps phospho-spécifiques (dirigés contre l' α -synucléine phosphorylée sur sérine 129), un signal est inconstamment capté sans différence entre patients et témoins (Wako 01-2028) (données non publiées).

Deux stratégies ont été employées pour augmenter la sensibilité de la détection de l' α -synucléine dans les biopsies coliques : l'**immunoprécipitation** d'une part, visant à concentrer l' α -synucléine dans l'espoir d'en entrevoir des modifications quantitatives, conformationnelles (oligomérisation, tronquage) ou post-traductionnelles discriminantes ; l'**électrophorèse bidimensionnelle** de l'autre, afin de détecter des modifications conformationnelles ou post-traductionnelles subtiles sous la forme de différences de migration.

4.2.4.2 Immunoprécipitation de l' α -synucléine

Dans la première approche, l' α -synucléine est concentrée par immunoprécipitation et révélée par Western blot. En conditions non-dénaturantes, un tampon de lyse classique (type RIPA) est utilisé. En conditions dénaturantes, l'extraction protéique est réalisée avec un tampon stringent à 1% de SDS (en présence d'orthovanadate de sodium) de façon à solubiliser au moins partiellement les agrégats et les formes liées aux membranes de l'AS. Pour permettre l'interaction antigène-anticorps indispensable à l'IP, le SDS est ensuite tamponné par un excès de tampon PB et de Triton X-100, en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases [228].

L'IP est réalisée sur le surnageant, en utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre l'AS (sc-7011 de Santa-Cruz) pré-adsorbé sur la protéine A. L'immunoprécipité dénaturé est chargé directement dans le gel de polyacrylamide.

Si un signal intense a été obtenu à 14 kDa, aucune différence qualitative (formes tronquées, ubiquitinées, dimères, oligomères de l' α -synucléine) ou quantitative n'a été identifiée. De même l'utilisation d'un anticorps phospho-spécifique dirigé contre le résidu phospho-sérine 129 (Wako 01-2028) n'a pas révélé de différence (données non publiées).

4.2.4.3 Electrophorèse bidimensionnelle et transfert de protéines

La seconde approche est basée sur un travail de caractérisation exhaustive des modifications post-traductionnelles de l' α -synucléine cérébrale [91], réalisé 4 ans après la découverte de la phosphorylation sur sérine 129 de l' α -synucléine des inclusions [90]. L'utilisation d'une électrophorèse bidimensionnelle, au cours de laquelle les protéines migrent selon leur point isoélectrique dans une première étape puis selon leur poids moléculaire dans une deuxième, permet de mettre en évidence les formes d' α -synucléine spécifiques des inclusions pathologiques : forme phosphorylée sur sérine 129 en premier lieu, mais également formes ubiquitinées et formes tronquées [91].

Nous avons pu reproduire les données d'Anderton *et al.* en utilisant le matériel et le protocole du kit Zoom[®] commercialisé par Invitrogen. Sur des extraits de substance noire de patient (don du Pr Charles Duyckaerts) et de témoin (patiente décédée d'une sclérose en plaques dans le service), l'électrophorèse retrouve les formes à haut poids moléculaire et les formes acides (par phosphorylation) discriminant patient et témoin (figure 16).

En utilisant cette méthode sur les biopsies coliques issus de patients fortement positifs en immunohistochimie, nous avons à deux reprises détecté un patron de migration similaire (formes à haut poids moléculaire et formes acides). Le signal était cependant à la limite de la détection et ce résultat n'a pas été confirmé sur 6 autres patients, probablement par défaut de sensibilité de la technique (données non publiées).

L'échec de cette approche biochimique complémentaire au travail de caractérisation histologique reste la grande frustration de notre travail. Nos résultats préliminaires restent encourageants et incitent à améliorer la technique ou à explorer de nouveaux outils plus sensibles (ELISA). La quantité limitée de tissu par patient et la nécessaire lourdeur de mise en place de ce type d'étude (organisation d'un essai clinique identifié, soumis et autorisé) constituent le handicap majeur à ce développement.

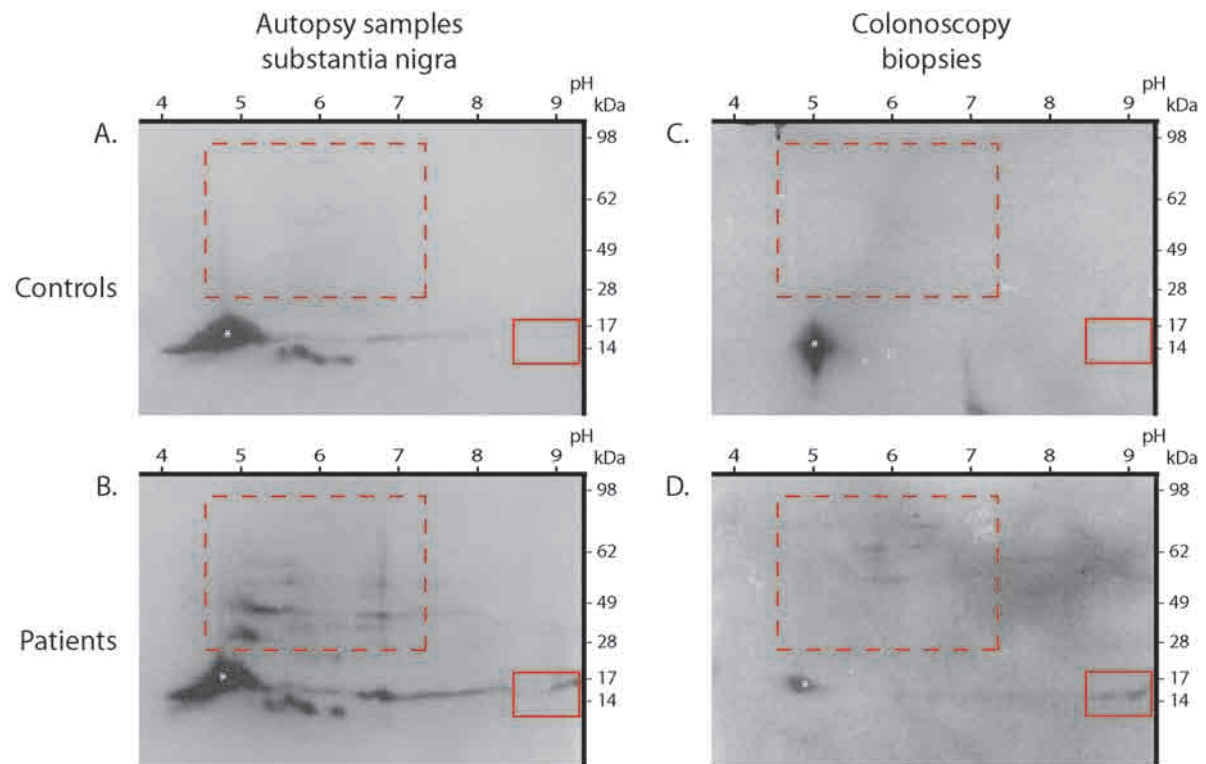


Figure 16. Blot α -synucléine totale après électrophorèse bidimensionnelle

A gauche : lysat d'un prélèvement de substance noire chez un sujet témoin (haut) et parkinsonien (bas). A droite : lysat de biopsies coliques (4 biopsies poolées) provenant d'un témoin (haut) et d'un sujet parkinsonien avec inclusions de Lewy sous-muqueuses (bas). Les formes à haut poids moléculaire (oligomères et formes ubiquitinées, cadre pointillé) ainsi que les formes acides (phosphorylées, cadre plein) de l' α -synucléine sont décelées dans la substance noire de patient mais pas dans la substance noire de témoin. Ces formes pathologiques semblent pouvoir être distinguées dans les biopsies coliques de patients. Ces résultats n'ont pas été confirmés sur une plus grande cohorte.

4.2.5 Corrélations clinico-pathologiques

La caractérisation du PSM appréhendé par biopsie digestive met donc en évidence d'une atteinte neuropathique spécifique à la MP. Nous avons cherché à établir la pertinence clinique de cette atteinte du SNE en recherchant des corrélations clinico-pathologiques (figure 17). Ce travail a été réalisé sur les 29 patients de notre cohorte principale, et est basé sur l'analyse de 4 biopsies coliques par patient.

4.2.5.1 Corrélations entre signes neurologiques et inclusions de Lewy

Nous avons d'abord établi un score semi-quantitatif basé sur l'évaluation de la densité des prolongements de Lewy, classée en aveugle en 3 catégories. En recherchant une méthode moins subjective et plus rigoureuse, nous nous sommes rendus compte que les résultats de l'évaluation subjective étaient étroitement corrélés à la proportion de biopsies positives (c'est-à-dire contenant au moins une inclusion de Lewy). Nous avons donc estimé la charge lésionnelle selon **un score quantitatif** basé sur le nombre de biopsies positives. Par définition, les biopsies du *groupe 0* étaient toutes négatives, le *groupe +* (charge lésionnelle modérée) avait 1 biopsie positive sur 4 analysées, le *groupe ++* (charge lésionnelle sévère) en avait 2 ou plus sur 4 analysées.

La charge lésionnelle était significativement corrélée à l'âge ($r_s = 0,395$; $p = 0,03$) (figure 17 B). L'âge est un facteur pronostique indépendant de sévérité de la MP et constitue un facteur confondant majeur dans ce type d'études [229]. En conséquence, toutes les corrélations entre charge lésionnelle et pathologie de Lewy ont été calculées en analyse multivariée **après ajustement sur l'âge**.

Il n'y avait pas de corrélation entre la charge lésionnelle et la durée d'évolution de la maladie (figure 17 A). En revanche, **le score axial** (somme des items 18, 19, 22 et 27 à 30 de l'UPDRS-III), qui évalue la symptomatologie de la ligne médiane (dysarthrie, instabilité posturale, rigidité axiale, amimie), **était plus élevé dans le groupe avec une charge lésionnelle sévère** ($p < 0,001$) **et positivement corrélé à la charge lésionnelle** ($p = 0,004$). **La réactivité à la lévodopa** (pourcentage d'amélioration du score UPDRS-III après dose de charge de lévodopa chez un patient sevré de traitement depuis la veille) **était négativement corrélée à la charge lésionnelle** ($p = 0,0064$). Le groupe 0 était significativement plus réactif à la lévodopa que le groupe + ($p < 0,05$) ou ++ ($p < 0,01$) (figure 17 CD).

Ces résultats se situent dans la ligne d'études récentes liant la dysautonomie au phénotype clinique de la MP [230, 231]. Les mesures cliniques ou paracliniques de dysautonomie sont faiblement corrélées à la durée d'évolution de la maladie ou à la sévérité des signes moteurs ; les signes axiaux en revanche sont franchement associés à la sévérité de la dysautonomie. Parmi les manifestations cliniques de la MP, la dysautonomie, les signes axiaux et le déclin cognitif sont statistiquement associés et caractérisent la sévérité de la maladie [232]. D'un point de vue neuropathologique, cette progression de la maladie semble liée à la diffusion et à l'aggravation de la pathologie extra-nigrale dans les noyaux du tronc cérébral, le prosencéphale basal et le cortex [233]. Mais l'aggravation des lésions survient en parallèle dans les structures du SNA, et se reflète dans la charge lésionnelle du SNE.

4.2.5.2 Corrélations avec les signes digestifs

Le diagnostic de constipation chronique a été effectué avec les critères de Rome III [234]. L'une de nos erreurs a été d'omettre d'utiliser un score semi-quantitatif validé de la sévérité de la constipation. A défaut, la

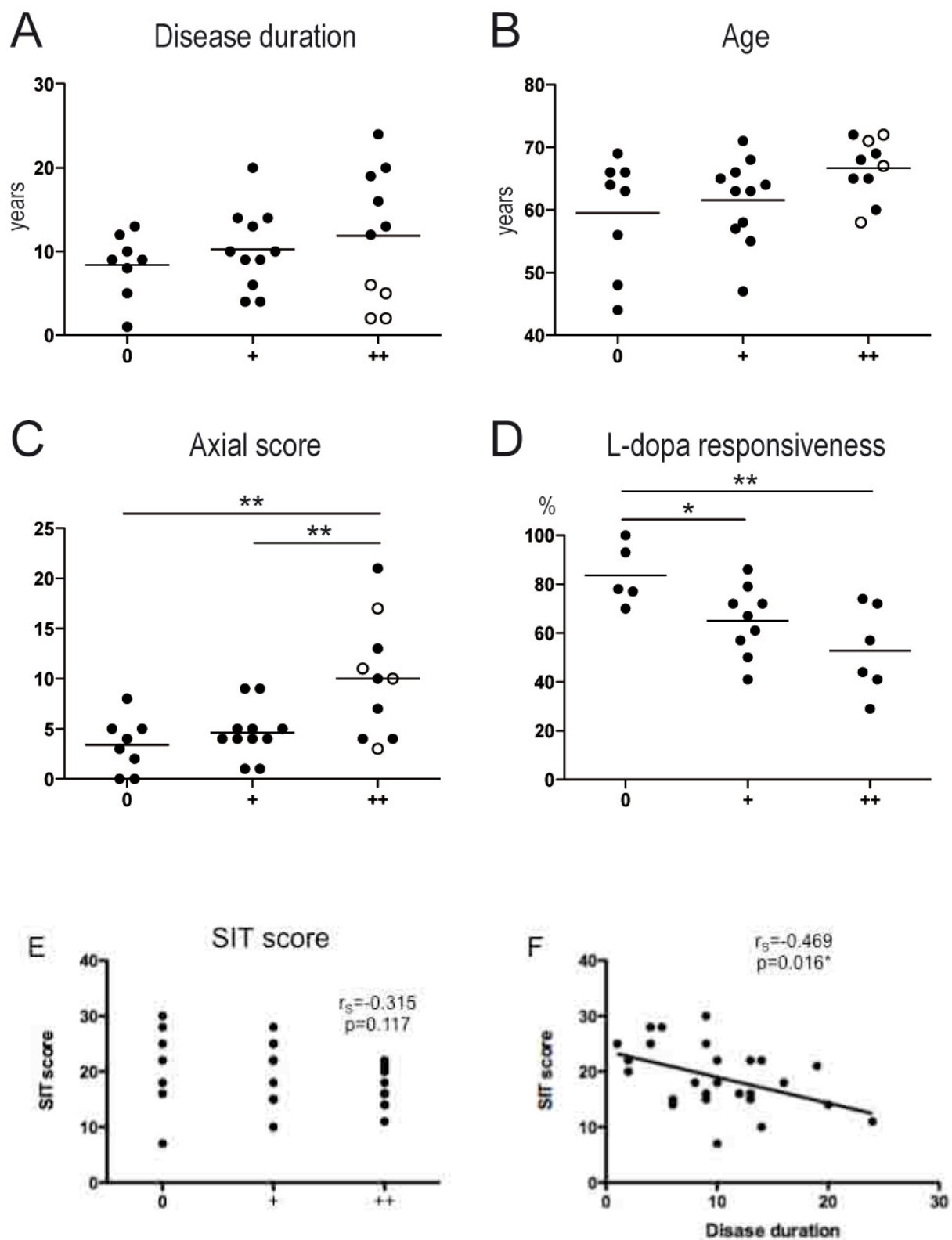


Figure 17. Correlations clinico-pathologique

somme des 6 items « constipation » du questionnaire de Rome III (questions 9 to 14) a été utilisé comme score semi-quantitatif.

Vingt-trois patients de la cohorte sur 29 (79%) remplissent les critères de Rome III de constipation chronique, un chiffre légèrement plus élevé que dans la population générale des parkinsoniens [33, 35], possiblement par biais de sélection (l'intensité des troubles digestifs pouvant accentuer l'intérêt des patients pour l'étude). **La constipation chronique était plus fréquente chez les patients porteurs d'inclusions sous-muqueuses (19/21) que chez les patients qui en étaient dénués (4/8) ($p < 0,05$, test exact de Fisher).** La sévérité de la constipation évaluée par notre score était corrélée à la charge lésionnelle ($r_s = 0,381$; $p = 0,042$), mais cette corrélation ne résistait pas à l'ajustement sur l'âge ($p = 0,17$) (article 3).

Deux éléments peuvent expliquer cette absence de corrélation. La faiblesse de notre score non validé de sévérité de la constipation en est un. Mais l'absence d'accès au PM, qui est directement responsable du contrôle de la motilité digestive, est certainement l'élément de réponse le plus pertinent. Notre étude se base implicitement sur le postulat que la charge lésionnelle du PSM, même moindre, est représentative de celle du PM. Ce postulat mérite d'être confirmé par une analyse comparative du PSM et du PM sur des prélèvements chirurgicaux ou autopsiques.

4.2.5.3 *Corrélations avec l'atteinte olfactive*

Outre les structures végétatives, le bulbe olfactif fait partie des toutes premières structures touchées par la synucléinopathie [235]. En conséquence, il nous est apparu comme pertinent de chercher des corrélations entre pathologie de Lewy, signes digestifs et hyposmie. La version française du test UPSIT (*University of the Pennsylvania Smell Identification Test*) a été utilisé pour quantifier les capacités de discrimination olfactive [236].

La charge lésionnelle n'était pas corrélée au score UPSIT ($p = 0,382$). Le score UPSIT était corrélé à la durée d'évolution de la maladie ($r_s = -0,469$, $p = 0,016$) mais cette corrélation ne résistait pas à l'ajustement sur l'âge (figure 17 EF) (article 4).

Ces résultats sont en concordance avec la littérature. Les études longitudinales consacrées à la dysfonction olfactive dans la MP montrent soit l'absence de modification [237] soit comme ici une aggravation progressive au cours de la maladie [238]. Dans les études transversales le degré d'hyposmie n'est pas lié au stade évolutif, à la durée d'évolution ou au handicap moteur [122, 237, 239-241]. Contrairement à la dysautonomie, la dysfonction olfactive est un signe non-moteur précoce qui semble évoluer pour son propre compte, et dont l'aggravation est découplée de la sévérité de la MP [242] – et par conséquent de la charge lésionnelle dans le SNE.

4.2.5.4 *Corrélations entre signes cliniques et compte neuronal*

Le paramètre le plus pertinent en pathologie neurodégénérative est la perte neuronale. Difficile à mettre en évidence, sa réalité est difficile à établir malgré l'objectivation de différences au décompte neuronal. C'est pourtant le seul paramètre qui soit directement corrélé aux symptômes au niveau du système nerveux central – les inclusions de Lewy n'en étant qu'un reflet approximatif [243].

Le nombre moyen de neurones par ganglion n'était pourtant pas corrélé avec l'âge, les signes neurologiques, les capacités de discrimination olfactive et la constipation. Ce dernier point mérite d'être

discuté, puisque les corrélations entre densité neuronale et fonctions digestives ont *a priori* plus de raisons d'être directes.

Quelques études ont lié la constipation à une perte neuronale dans le SNE [244]. Une publication controversée montre une diminution du nombre de neurones myentérique et de cellules interstitielles de Cajal sur des prélèvements chirurgicaux issus de patients constipés [73], mais la présence d'une dilatation colique fait relativiser les mesures de densité ganglionnaire par unité de surface. En ce qui concerne le PSM, le ralentissement du transit a pu être attribué à une perte en neurones sous-muqueux [204, 245] ou à des altérations de l'innervation sympathique [246] dans des modèles animaux de sénescence du SNE. Les résultats de notre travail ne vont pas dans le sens d'une participation de a perte neuronale sous-muqueuse, mais évoquent le rôle possible de la dénervation sympathique, plus de la moitié des prolongements de Lewy dépendant de l'innervation sympathique postganglionnaire. Encore une fois, la subtilité de la perte neuronale sous-muqueuse et l'absence d'accès aux neurones myentériques limitent la portée de nos résultats.

4.2.6 Synthèse des résultats

Les résultats marquants de notre travail sont:

- la présence d'inclusions de Lewy chez 72% des patients parkinsoniens et chez aucun des témoins ;
- la corrélation entre la charge lésionnelle et une perte neuronale sous-muqueuse discrète, qui renforce l'idée du caractère pathogène des inclusions ;
- la corrélation entre la charge lésionnelle et la sévérité de la maladie, exprimée par le score axial et la réponse à la lévodopa, qui conforte la pertinence clinique de nos résultats ;
- l'absence de corrélation entre la charge lésionnelle et l'hyposmie, autre signe précurseur de la MP qui semble évoluer pour son propre compte ;
- l'absence de corrélation nette entre sévérité de la constipation et charge lésionnelle sous-muqueuse, et entre sévérité de la constipation et perte neuronale sous-muqueuse, repoussant l'idée d'un lien de causalité direct entre pathologie sous-muqueuse et signes digestifs.

L'idée que nous aimerions promouvoir est celle **de la synergie apparente des manifestations non-motrices**, qu'elles soient dysautonomiques, axiales ou cognitives. Ces manifestations cliniques sont soutenues par **des lésions extra-nigrales qui semblent s'aggraver en parallèle**, dans le SNC comme dans le système nerveux périphérique. L'hyposmie, signe non-moteur évoluant pour son propre compte, est la seule exception de ce modèle. **Le SNE prend sa part dans ce processus et constitue un reflet fidèle de la diffusion et de l'aggravation de la synucléinopathie extra-nigrale.**

Article N°2 : Pathological lesions in colonic biopsies during Parkinson's disease

Lebouvier T, Chaumette T, Damier P, Coron E, Touchefeu Y, Vrignaud S, Naveilhan P, Galmiche JP, Bruley des Varannes S, Derkinderen P, Neunlist M. *Pathological lesions in colonic biopsies during Parkinson's disease*. Gut. 2008. Dec;57(12):1741-3.

Article 3 : Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms

Lebouvier T, Neunlist M, Bruley des Varannes S, Coron E, Drouard A, N'Guyen JM, Chaumette T, Tasselli M, Paillusson S, Flamand M, Galmiche JP, Damier P, Derkinderen P. *Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms*. PLoS ONE 2010 Sep 5(9): e12728.

Article 4 : Olfactory dysfunction is independent of enteric pathology in Parkinson's disease

Lebouvier T, Pouclet H, Coron E, N'Guyen JM, Roy M, Vavasseur F, Bruley des Varannes S, Damier P, Neunlist M, Derkinderen P, Rouaud T. *Olfactory dysfunction is independent of enteric pathology in Parkinson's disease*. Journal of Parkinson's Disease. In press.

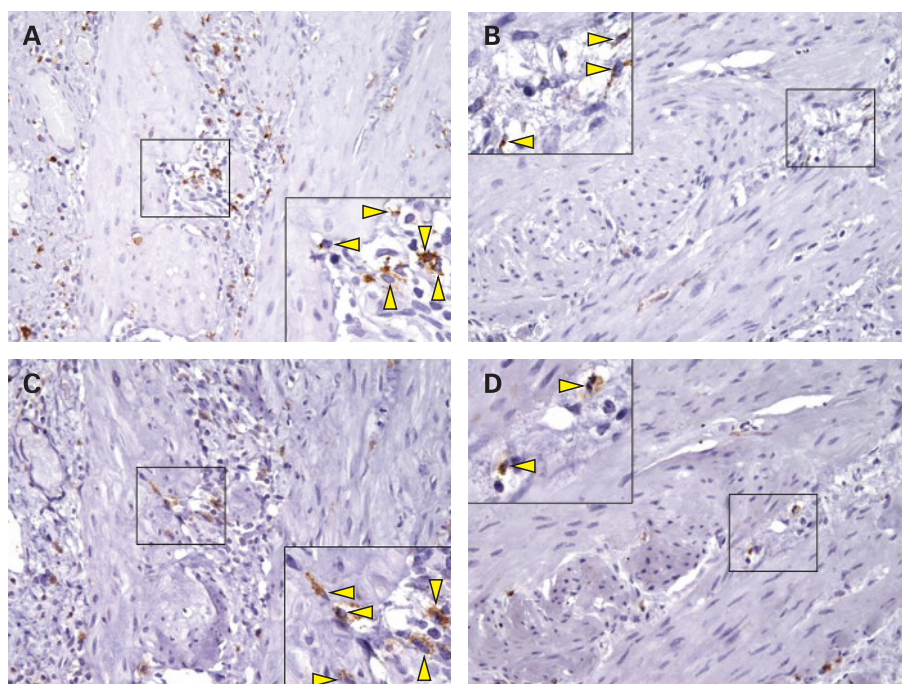


Figure 1 Immunohistochemistry for CD68 and cyclooxygenase-2 (COX-2) in muscularis macrophages. CD68 positive cells, were quite evenly distributed in muscle layer of the gallbladder in placebo-treated gallstones patients (A) and were scarcely present in gallbladder of ursodeoxycholic acid (UDCA)-treated patients (B). A similar pattern was exhibited by COX-2 positive cells, in muscle layer of gallbladder in placebo-treated patients (C) and UDCA-treated patients (D). A/C, B/D refer to the same patient. The figure shows corresponding fields for each patient. Original magnification, $\times 200$. High power field, $\times 400$.

(Sanofi-Winthrop, Riells y Viabrea, Spain) for 30 days. Criteria for eligibility, randomisation of patients and blinding were those used in our previous randomised study.¹ Following laparoscopic cholecystectomy, GB specimens were collected for routine histology and immunohistochemistry, the latter performed by the streptavidin-biotin method. Mouse monoclonal antibodies against COX-2 protein (clone CX-294; Dako, Glostrup, Denmark) and mouse monoclonal antibodies against CD68 (clone M7103; Dako) were used. Part of the GB tissue was collected for muscle cell contraction to cholecystokinin 8 (CCK-8) studies as well as for measurement of prostaglandin (PG) E2 levels as described elsewhere.¹

Following randomisation, eight patients received UDCA and 11 received placebo, for 30 days. Staining with haematoxylin & eosin revealed chronic cholecystitis, with mild inflammatory infiltrates, in all GBs with gallstones, treated with UDCA or placebo. No histopathological lesions were

observed in GBs from a control group, represented by 10 alithiasic GBs removed from patients with neoplastic diseases not involving the GB. The number of CD68 positive macrophages in the muscle layer of GBs from gallstone patients was significantly higher compared to that in control patients. In UDCA-treated patients, the number of CD68 positive macrophages, in GB muscle, was significantly lower when compared to that in placebo-treated patients. Positive COX-2 expression was almost exclusively present in macrophages within the muscle layer (fig 1). The number of COX-2 positive cells was higher in muscle from symptomatic gallstone patients compared to controls and, likewise macrophages, significantly lower following UDCA treatment (table 1, fig 1). A direct and significant correlation was observed between positivity for CD68 and COX-2 (Spearman's $\rho = 0.7$, $p < 0.01$). As in our previous study, the production of PGE2 was significantly lower, following UDCA than after placebo. Furthermore, muscle contraction, induced by increasing concentrations of CCK-8 (assessed in four patients in each group) was significantly higher in the UDCA, compared to placebo, group (maximal contraction to CCK-8 10^{-8} mol/l was 25.1 (SD 3) vs 12 (SD 4)%, respectively; $p < 0.001$). Our more recent data show that an inflammatory macrophage infiltrate is present in the GB muscle layer

of cholesterol gallstone patients. UDCA decreases the presence of macrophages in the muscle layer and confirms improvement in GB muscle cell contraction. These results suggest that activated macrophages play a role in muscle cell dysfunction and add insight into the anti-inflammatory action of UDCA, which may explain some of the therapeutic effects of this bile acid in liver diseases as well as other gastrointestinal inflammatory conditions.

M P L Guarino,¹ S Carotti,² S Morini,² G Perrone,³ J Behar,⁴ A Altomare,¹ R Alloni,¹ R Caviglia,¹ S Emerenziani,¹ C Rabitti,³ M Cicala¹

¹ Department of Digestive Diseases, Campus Bio-Medico University, Rome, Italy; ² Department of Biomedical Research, Campus Bio-Medico University, Rome, Italy; ³ Surgical Pathology, Campus Bio-Medico University, Rome, Italy; ⁴ Rhode Island Hospital and Brown University Medical School, Providence, Rhode Island, USA

Correspondence to: Dr M P L Guarino, Dipartimento di Malattie dell'Apparato Digerente, Università Campus Bio-Medico, Via Alvaro del Portillo, 21-00128 Rome, Italy; m.guarino@unicampus.it

Competing interests: None.

Ethics approval: This study was approved by the Ethics Committee of Campus Bio-Medico University on 21 June 2001.

Gut 2008;**57**:1740–1741. doi:10.1136/gut.2008.160333

REFERENCES

1. Guarino MP, Cong P, Cicala M, *et al.* Ursodeoxycholic acid improves muscle contractility and inflammation in symptomatic gallbladders with cholesterol gallstones. *Gut* 2007;**56**:815–20.
2. Ljubuncic P, Fuhrman B, Oiknine J, *et al.* Effect of deoxycholic acid and ursodeoxycholic acid on lipid peroxidation in cultured macrophages. *Gut* 1996;**39**:475–8.
3. Iwaki T, Ishizaki K, Kinoshita S, *et al.* Protective effects of ursodeoxycholic acid on chenodeoxycholic acid-induced liver injury in hamsters. *World J Gastroenterol* 2007;**13**:5003–8.
4. Wehner S, Behrendt FF, Lyutenski BN, *et al.* Inhibition of macrophage function prevents intestinal inflammation and postoperative ileus in rodents. *Gut* 2007;**56**:176–85.
5. The FO, Boeckstaens GE, Snoek SA, *et al.* Activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway ameliorates postoperative ileus in mice. *Gastroenterology* 2007;**133**:1219–28.
6. Eskandari MK, Kalf JC, Billiar TR, *et al.* LPS-induced muscularis macrophage nitric oxide suppresses rat jejunal circular muscle activity. *Am J Physiol* 1999;**277**:G478–86.

Pathological lesions in colonic biopsies during Parkinson's disease

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative condition that affects 1% of the population over 65 years of age. The two pathological hallmarks of PD are a loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra (SN) and the presence of cytoplasmic eosinophilic inclusions termed Lewy bodies (LBs), whose main component is phosphorylated α -synuclein.¹ This degeneration of SN neurons leads to a dopamine deficiency

Table 1 Mean number (with SD in parentheses) of positively stained cells in 10 consecutive microscopic fields

	Controls	Placebo	UDCA
CD68	11.9 (8.1)	36.2 (11)*	19.6 (6)**
COX-2	10.5 (6.8)	30.6 (12)*	15.2 (5.5)**

* $p < 0.001$ vs controls; ** $p < 0.01$ vs placebo.

COX-2, cyclooxygenase-2; UDCA, ursodeoxycholic acid.

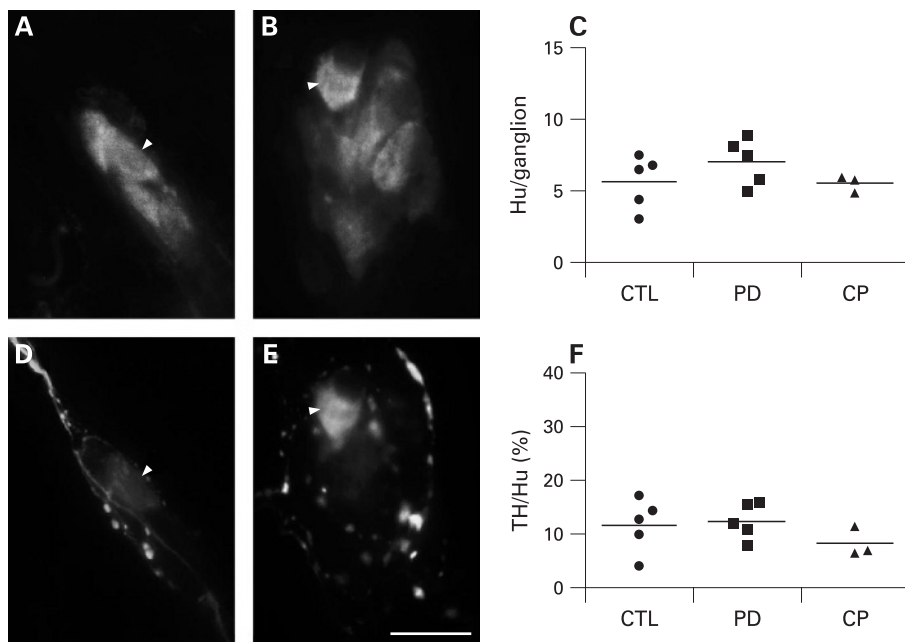


Figure 1 Submucosal neuron counts and dopaminergic phenotype are unchanged in patients with Parkinson's disease (PD). Hu-immunoreactive (IR) submucosal neurons were identified in the colon of controls (n = 5) (A), PD patients (n = 5) (B) and constipated patients (n = 3). There was no change in the number of Hu-IR submucosal neurons per ganglion in the three conditions (C). Double labelling with antibodies against Hu (A,B) and tyrosine hydroxylase (TH) (D,E) showed that occasional submucosal neurons were TH-IR (arrow heads). No significant decrease in the proportion of TH-IR submucosal neurons occurred in PD and in constipated patients (F). Each circle, square and triangle represents one control, PD or constipated patient, respectively. Horizontal bars represent the mean. Scale bar: 20 μ m. CTL, control; CP, constipated patient.

responsible for the major motor symptoms. Nevertheless, it has become increasingly evident that PD is a multicentric neurodegenerative process that also affects neuronal structures outside the SN.² In this context, various reports performed on surgical or autopsy specimens have shown that the enteric nervous system (ENS) is affected during PD.^{3,4} However, it is still a matter of debate whether these alterations occur early in the course of the disease. This is mainly due to a lack of accessibility to the ENS in the living patients. Therefore, demonstrating (1) the ability to study the ENS using routine colonic biopsies and (2) the presence of lesions characteristics of PD could be relevant for an early diagnosis of the disease and to better understand its pathophysiology.

We therefore performed routine colonic biopsies in five PD patients complaining of functional constipation (63 (SD 7) years, three men; all had disease duration >5 years). Five healthy age-matched patients (61 (SD 6.5) years, one man) requiring a total colonoscopy for colorectal cancer screening were included as controls. They had no known neurological disease. None suffered from functional digestive symptoms. In order to avoid any specific role for chronic constipation, we included three additional non-age-matched patients (52 (SD 5) years, no men) who underwent total colonoscopy for the assessment of a chronic intractable

constipation as additional controls. Written consent was obtained according to the principles of the Declaration of Helsinki.

Four biopsies were taken from the ascending colon during colonoscopy. Biopsies were performed using standard biopsy forceps without needles (FB210K; Olympus, Tokyo, Japan). Samples were immediately immersed in 4°C saline solution and microdissected in order to separate the submucosa (containing the internal submucosal plexus) from the mucosa. The submucosa was then fixed in 4% paraformaldehyde. Immunohistochemical studies were then performed on these tissues using a combination of antibodies against rabbit anti-tyrosine hydroxylase (TH) (1:500, Pel-Freez, Rogers, Arkansas, USA), rabbit anti-dopamine- β -hydroxylase (DBH) (1:250, Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France), mouse anti-Hu C/D (1:200, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), rabbit anti-phosphorylated α -synuclein (1:5000, WAKO, Osaka, Japan) or rabbit anti-neurofilament 200 kDa (1:250; Millipore) as previously described.⁵

In control patients, individual biopsies contained 11.2 (SD 7.9) ganglia and each ganglia contained 5.6 (SD 1.9) Hu-immunoreactive (IR) neurons. In PD patients, the number of ganglia per biopsies was similar to controls (13.6 (SD 5.3); $p = 0.22$). In addition, the number of Hu-IR neurons per ganglion in PD was unchanged as compared to controls (7.0 (SD 1.6); $p = 0.25$) (fig

1A,C). Constipated controls did not differ from PD patients in the number of ganglia per biopsy (11.3 (SD 1.5); $p = 0.57$) or in the number of neurons per ganglion (5.5 (SD 0.6); $p = 0.19$) (fig 1C).

In healthy controls, 11.6 (SD 5.0)% of Hu-IR neurons were TH-IR. In PD patients, the proportion of TH-IR neurons was unchanged as compared to controls (12.3 (SD 3.3)%; $p = 0.80$) (fig 1D–F). In constipated patients, the proportion of TH-IR neurons was similar to the one of PD patients (8.0 (SD 2.7)%; $p = 0.12$) (fig 1F). In all groups no neuronal body was DBH positive, suggesting that all TH-IR neurons in the submucosal plexus were dopaminergic. These results are consistent with a previous report by Singaram *et al*⁶ showing the absence of loss of TH-IR neurons in the submucosal and myenteric plexuses of PD patients, suggesting that it is not a marker of choice for detecting PD lesions in the ENS.

However, immunohistochemical staining with an antibody against phosphorylated α -synuclein, revealed that 4 out of 5 PD patients had phospho- α -synuclein-IR neurites (identified with neurofilament (NF) in the submucosa (fig 2A,F). These phospho- α -synuclein-IR neurites were absent in both control and constipated patients. In some cases, large aggregates were observed in dystrophic NF-IR neurites (fig 2E), a pattern reminiscent of Lewy neurites.

Taken together, our pilot study showed that routine colonic biopsies can be used to study the submucosal plexus of the ENS. In addition, we identified for the first time in the gut of living PD patients lesions similar to the ones observed in the brain. This technique could be a reliable tool to detect early lesions in the gut during the course of PD in order to better understand the pathogenesis of the disease and/or to identify novel biomarkers.

T Lebouvier,^{1,2,3,4} T Chaumette,^{1,2,3} P Damier,^{2,4,5} E Coron,^{1,2,3,5} Y Touchefeu,^{1,2,3} S Vignaud,⁶ P Naveilhan,^{2,7} J-P Galmiche,^{1,2,3,5} S Bruley des Varannes,^{1,2,3,5} P Derkinderen,^{1,2,3,4,5} M Neunlist^{1,2,3,4}

¹ Inserm, U913, Nantes, France; ² University Nantes, Nantes, France; ³ CHU Nantes, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, France; ⁴ CHU Nantes, Department of Neurology, Nantes, France; ⁵ Inserm, CIC-04, Nantes, France; ⁶ CHU Nantes, Department of Anesthesia, Nantes, France; ⁷ Inserm, U643, Nantes, France

Correspondence to: Dr M Neunlist, Inserm U913, 1 place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes, France; michel.neunlist@univ-nantes.fr or Dr P Derkinderen, Department of Neurology, CHU Nantes, 44093 Nantes, France; pascal.derkinderen@chu-nantes.fr

Acknowledgements: The authors wish to thank M Roy and F Vasseur for their help in the assessment of patients and controls.

Funding: This work was supported by a grant from France Parkinson, ADPLA (association des parkinsoniens de Loire Atlantique), Groupement de Parkinsoniens de Vendée and Inserm/DHOS (to Pde and MN). Pde and MN are recipients of a Contrat d'Interface Inserm.

Competing interests: None.

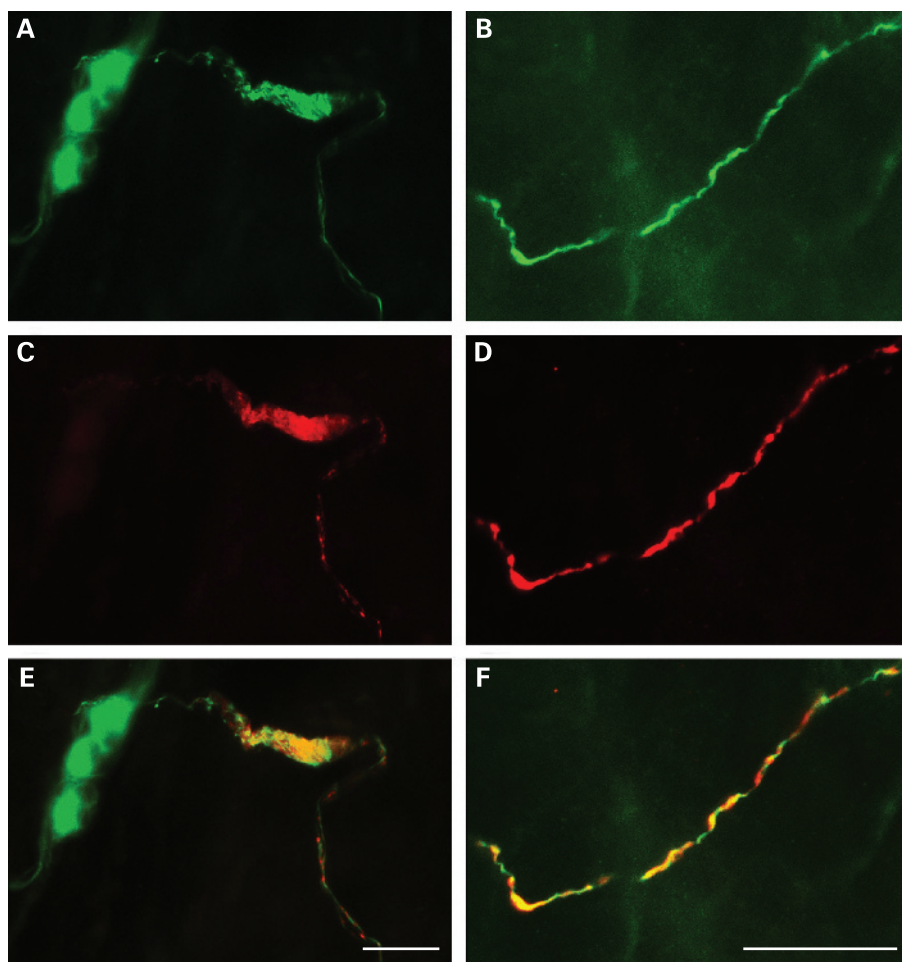


Figure 2 Phospho- α -synuclein-positive submucosal neurites differentiate Parkinson's disease patients from controls. Double labelling with antibodies against neurofilament (NF) (A,B) and phosphorylated α -synuclein (C,D) revealed that some NF-immunoreactive (IR) neuritic structures were also phospho- α -synuclein-IR (merged image in E,F) in the majority of Parkinson's disease patients, but in none of the controls. Occasionally the inclusion-bearing neurites displayed dystrophic alterations (A,C,E). Scale bar: 30 μ m.

Ethics approval: The study protocol was approved by the local Committee on Ethics and Human Research on 27 February 2007.

TC and TL as well as PD and MN contributed equally to this work.

Gut 2008;**57**:1741–1743. doi:10.1136/gut.2008.162503

REFERENCES

1. **Fujiwara H**, Hasegawa M, Dohmae N, *et al.* α -synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 2002;**4**:160–4.
2. **Braak H**, Del Tredici K. Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. *Neurology* 2008;**13**:70:1916–25.
3. **Braak H**, de Vos RA, Bohl J, *et al.* Gastric α -synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett* 2006;**396**:67–72.
4. **Wakabayashi K**, Takahashi H, Takeda S, *et al.* Parkinson's disease: the presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses. *Acta Neuropathol* 1988;**76**:217–21.
5. **Neunlist M**, Aubert P, Toquet C, *et al.* Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. *Gut* 2003;**52**:84–90.
6. **Singaram C**, Ashraf W, Gaumnitz EA, *et al.* Dopaminergic defect of enteric nervous system in Parkinson's disease patients with chronic constipation. *Lancet* 1995;**346**:861–4.

CORRECTION

doi:10.1136/gut.2007.119446corr1

R Spiller, Q Aziz, F Creed, *et al.* Guidelines on the irritable bowel syndrome: mechanisms and practical management (*Gut* 2007;**56**:1770–98). In paragraph 4.4.1 the sentence “This in turn acts on the adrenal medulla, resulting in cortisol secretion into the circulation” should read “This in turn acts on the adrenal cortex, resulting in cortisol secretion into the circulation”.

Editor's quiz: GI snapshot

ANSWER

From the question on page 1673

The patient had a large inflammatory abdominal aortic aneurysm. The abdominal CT scan shows a large infrarenal aortic aneurysm with a maximum diameter of 7.5 cm extending into the iliac vessels. There is an enhancing soft-tissue cuff surrounding the anterolateral margin of the aneurysm. The aneurysm appears to compress the third part of the duodenum (fig 1 below), which, however, was not detected at endoscopy. These CT findings were suggestive of an inflammatory aneurysm. Inflammatory abdominal aortic aneurysms represent 3–10% of all abdominal aortic aneurysms and occur predominantly in men.¹ They differ from atherosclerotic aneurysms in that patients often present with abdominal symptoms or anorexia, weight loss, and raised inflammatory markers. CT has a specificity of 99.7% for diagnosis of inflammatory

aneurysms,² usually showing periaortic fibrosis as a cuff of enhancing soft tissue surrounding the anterolateral margin of the aneurysm. If periaortic fibrosis is extensive, adjacent abdominal structures may be compressed and adherent, most commonly the third part of the duodenum.¹ Although rare, inflammatory abdominal aortic aneurysms should be kept in mind as a cause of abdominal pain and/or anorexia, weight loss, and raised inflammatory markers. The natural history of inflammatory abdominal aortic aneurysms remains unknown, with 3.3–14% patients presenting with acute or chronic rupture.¹ As regards to management, the literature supports an operative approach with a 30 day operative mortality rate of up to 9%.¹ Complete regression of fibrosis and inflammatory process occurs in up to one-half of patients at long-term follow-up post-operatively. Clinical symptoms (such as weight loss and gastrointestinal symptoms) reverse in 93% of the patients after an operation.³ Endovascular therapy is also a potential treatment

Colonic Biopsies to Assess the Neuropathology of Parkinson's Disease and Its Relationship with Symptoms

Thibaud Lebouvier^{1,2,3,4,*}, Michel Neunlist^{1,4,6,*}, Stanislas Bruley des Varannes^{1,2,3,6}, Emmanuel Coron^{1,2,3,6}, Anne Drouard², Jean-Michel N'Guyen⁷, Tanguy Chaumette^{1,4}, Maddalena Tasselli^{1,4}, Sébastien Paillusson^{1,4}, Mathurin Flamand^{1,2,3,6}, Jean-Paul Galmiche^{1,2,3,6}, Philippe Damier^{2,3,5†}, Pascal Derkinderen^{1,2,3,5,6*†}

1 UMR 913, Inserm, Nantes, France, **2** CIC-04, Inserm, Nantes, France, **3** UFR Médecine, Université de Nantes, Nantes, France, **4** UFR Sciences et Techniques, Université de Nantes, Nantes, France, **5** Service de Neurologie, CHU Nantes, Nantes, France, **6** Institut des Maladies de l'Appareil Digestif (IMAD), CHU Nantes, Nantes, France, **7** Pôle d'Information Médicale, Évaluation et Santé Publique (PIMESP), CHU Nantes, Nantes, France

Abstract

Background: The presence of Lewy bodies and Lewy neurites (LN) has been demonstrated in the enteric nervous system (ENS) of Parkinson's disease (PD) patients. The aims of the present research were to use routine colonoscopy biopsies (1) to analyze, in depth, enteric pathology throughout the colonic submucosal plexus (SMP), and (2) to correlate the pathological burden with neurological and gastrointestinal (GI) symptoms.

Methodology/Principal Findings: A total of 10 control and 29 PD patients divided into 3 groups according to disease duration were included. PD and GI symptoms were assessed using the Unified Parkinson's Disease Rating Scale part III and the Rome III questionnaire, respectively. Four biopsies were taken from the ascending and descending colon during the course of a total colonoscopy. Immunohistochemical analysis was performed using antibodies against phosphorylated alpha-synuclein, neurofilaments NF 220 kDa (NF) and tyrosine hydroxylase (TH). The density of LN, labeled by anti-phosphorylated alpha-synuclein antibodies, was evaluated using a quantitative rating score. Lewy pathology was apparent in the colonic biopsies from 21 patients and in none of the controls. A decreased number of NF-immunoreactive neurons per ganglion was observed in the SMP of PD patients compared to controls. The amount of LN in the ENS was inversely correlated with neuronal count and positively correlated with levodopa-unresponsive features and constipation.

Conclusion/Significance: Analysis of the ENS by routine colonoscopy biopsies is a useful tool for pre-mortem neuropathological diagnosis of PD, and also provides insight into the progression of motor and non-motor symptoms.

Citation: Lebouvier T, Neunlist M, Bruley des Varannes S, Coron E, Drouard A, et al. (2010) Colonic Biopsies to Assess the Neuropathology of Parkinson's Disease and Its Relationship with Symptoms. PLoS ONE 5(9): e12728. doi:10.1371/journal.pone.0012728

Editor: Mark R. Cookson, National Institutes of Health, United States of America

Received: May 18, 2010; **Accepted:** August 24, 2010; **Published:** September 14, 2010

Copyright: © 2010 Lebouvier et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by a biomarker grant from the Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research and by a grant from Nantes University Hospital (Direction de la Recherche Clinique). Work in Michel Neunlist's lab is supported by France Parkinson, CECAP (Comité d'Entente et de Coordination des Associations de Parkinsoniens), ADPLA (Association des Parkinsoniens de Loire Atlantique), FFGP (Fédération française des groupements parkinsoniens) and Parkinsoniens de Vendée. TL is a recipient of a Poste d'accueil Inserm. MN and PDe are both recipients of Contrats d'Interface Inserm.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: thibaud.lebouvier@univ-nantes.fr (TL); michel.neunlist@univ-nantes.fr (MN); pascal.derkinderen@chu-nantes.fr (PD)

† These authors contributed equally to this work.

‡ These authors also contributed equally to this work.

Introduction

Normal function of the gastrointestinal (GI) tract relies both on intrinsic reflexes and extrinsic control. The extrinsic innervation depends on parasympathetic and sympathetic outputs. The intrinsic innervation relies on the enteric nervous system (ENS), an integrative neuronal network organized in two main plexuses, myenteric and submucosal, that control bowel motility and transmucosal fluid exchange, respectively [1]. A wide range of GI diseases associated with motility dysfunction can be considered, in part, as extrinsic and/or enteric neuropathies [2]. An emerging concept is that the field of enteric neuropathies extends well beyond digestive diseases, and that a subset of central nervous system (CNS) disorders may present with concomitant alterations

of the ENS [3,4,5]. Among those, Parkinson's disease (PD) is likely to be a prime example because alterations of the ENS and GI dysfunction have been described in the course of the disease [6]. Whether these alterations mirror brain pathology, and how they relate to clinical symptoms, remain open questions.

PD is indeed much more than a selective degeneration of the substantia nigra. The loss of nigral dopaminergic neurons is responsible for the cardinal motor symptoms of PD (i.e. bradykinesia and/or rest tremor), that are improved by dopamine replacement therapy [7]. Yet PD patients also suffer from a wide variety of dopa-unresponsive symptoms likely to reflect lesions beyond the substantia nigra [8]. Most of the non-dopaminergic symptoms appear or worsen with advancing age and disease progression, and represent the majority of the disability observed

in advancing PD [9]. They include dysautonomia and axial symptoms, such as dysarthria, gait and postural instability, and cognitive decline [10]. Among GI symptoms, chronic constipation (CC) is by far the most frequent, affecting up to 60% of PD patients [11].

The pathological hallmarks of PD are neuronal inclusions termed Lewy bodies and Lewy neurites (LN) whose main component is aggregated and phosphorylated alpha-synuclein [12,13,14]. PD pathology concentrates in susceptible regions of the CNS and peripheral autonomic nervous system, including the ENS [15]. Lewy bodies within the ENS, first reported in 1984 [16], provide a putative anatomical basis for GI symptoms [17].

We have recently shown that whole-mounts of submucosa from routine colonic biopsies allow a morphological analysis of the submucosal plexus (SMP) [18,19]. Using this technique in a pilot study, we have demonstrated that 4 out of 5 PD patients display Lewy pathology. Nevertheless, the small number of patients included did not enable us to draw any clinicopathological correlations or to assess the pathology in detail. We have therefore conducted the present study in a larger set of 30 PD patients to allow in depth analysis of enteric pathology throughout the colonic SMP, and to correlate the extent of pathology with motor symptoms and constipation.

Methods

Subjects

PD patients aged 40–75 years were recruited over 24 months from the movement disorder clinic in Nantes University Hospital, France. Diagnosis was made according to the United Kingdom Parkinson's Disease Survey Brain Bank [20]. To limit recruitment bias and in order to span the entire course of PD, 3 groups of patients divided according to disease duration were included (group 1: ≤ 6 years, group 2: 7–12 years and group 3: ≥ 13 years disease duration).

Healthy patients requiring a total colonoscopy for colorectal cancer screening were included as controls. None of the control subjects had a history of neurological or psychiatric diseases.

Patient evaluation

In PD patients, motor symptoms were assessed using the Unified Parkinson's Disease Rating Scale part III (UPDRS-III) [21]. UPDRS-III was performed only in ON-state for group 1 and in both OFF and ON-state for groups 2 and 3. OFF-state was obtained following an overnight withdrawal of dopaminergic treatment, and ON-state was reached one hour after intake of the normal morning dose. Dopa-responsiveness was defined as the percentage of UPDRS-III improvement compared with baseline. UPDRS-III score was subdivided into an axial score (sum of items 18, 19, 22 and 27–30) that evaluates symptoms such as dysarthria or postural instability [22].

Assessment of GI symptoms was performed using the Rome III questionnaire. Chronic functional constipation was diagnosed as defined by Rome III criteria [23]. The sum of the 6 constipation items on the Rome III questionnaire (questions 9 to 14) was used as a semi-quantitative score to assess the severity of CC.

All controls underwent a neurological examination to rule out PD symptoms and cognitive deficiency. The study protocol was approved by the local Committee on Ethics and Human Research (Comité de Protection des Personnes Ouest VI), and registered on ClinicalTrials.gov (identifier NCT00491062). Written informed consent was obtained from each patient and from each normal volunteer.

Colonoscopy biopsies

A total colonoscopy was performed according to the usual procedure of the Gastroenterology department of Nantes Univer-

sity Hospital. In both patients and controls, 4 biopsies were taken in the ascending colon and descending colon, respectively. Biopsies were performed using standard biopsy forceps without needles (FB210K, Olympus co., Japan). Samples were immediately immersed in 4°C saline solution and processed as described.

Immunohistochemistry

Submucosa samples were processed for whole-mount immunostaining as described previously [18]. The primary antibodies used were those directed against phosphorylated alpha-synuclein (1:5000, WAKO, Osaka, Japan), neurofilament H 200 kDa (NF, 1:250, Chemicon, USA), Hu C/D (1:200, Invitrogen, Cergy Pontoise, France), tyrosine hydroxylase (TH, 1:500, Pel-Freez, USA) and dopamine-beta-hydroxylase (DBH, 1:250, Millipore, USA). Suitable secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488, 594 and 647 were used (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France).

Neuronal cell counting and scoring

Neuronal counts were performed in one submucosa sample from the ascending and descending colon, respectively. Hu or NF-immunoreactive (IR) neurons were counted in all available ganglia of the sample using a Zeiss Axiovert 200 M (Zeiss, Thornwood, NY). The results were expressed as the average of the mean number of neurons per ganglion in the two biopsies.

Density of phosphorylated alpha-synuclein inclusions was evaluated after analyzing 2 biopsies from ascending and 2 from descending colon. A biopsy was considered positive when containing at least 1 LN. During the study, we used alternatively a 3-category *semi-quantitative* scale based on the subjective assessment of LN density in all 4 biopsies considered as a single sample, and a *quantitative* rating scale based on the proportion of positive biopsies (0: *absent*; +: 1/4 positive biopsy: *moderate*; ++: $\geq 2/4$ positive biopsies, *severe* pathology). As the two methods yielded similar results (4/29 mismatches), we chose to present only the quantitative rating scale because of its higher reproducibility.

Statistical analysis

Data are presented as mean $\pm$ standard deviation. For graphical representation of the total population of patients ($n = 29$) and controls ($n = 10$), box plots were used in which the end of the whiskers represent the minimum and maximum scores, and '+' sign represents the mean.

Regarding the number of neurons per ganglion, differences between patients and controls were analyzed by unpaired two-tailed Student's t-tests. Differences between subgroups were analyzed by two-way ANOVA followed by post hoc Newman-Keuls tests.

For ordinal data (clinical scores), conventional Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests followed by post hoc Dunn's analyses served to compare median magnitudes of change.

Correlation between Lewy pathology score and other parameters were assessed by Spearman test. Adjustment with age was done with multiple linear regression. Chi square tests were used for frequency analysis. For all statistical tests $p < 0.05$ was deemed significant.

Results

A total of 30 PD patients and 10 controls were recruited. Of these 30 patients, one was excluded because of an error in the processing of their biopsy. Patients were subdivided into groups based on disease progression, resulting in similar group sizes (9 in group 1, ≤ 6 years; 10 in group 2, 7–12 years; 10 in group 3, ≥ 13 years disease duration). **Table 1** shows the main clinical features

Table 1. Main clinical characteristics and immunohistochemical findings in patients.

Patient	Group	Sex	Age	Disease duration (years)	UPDRS-III axial subscore	Dopa-responsiveness	Chronic functional constipation Y/N	Sum of Rome III constipation items	Neurons per ganglion	Lewy pathology quantitative score
1	1	F	44	1	2	–	Y	2	4.4	0
2	1	M	67	2	11	–	Y	3	4.0	++
3	1	F	72	2	10	–	Y	3	2.6	++
4	1	M	47	4	4	–	N	0	3.5	+
5	1	M	66	4	1	–	Y	3	3.7	+
6	1	F	58	5	8	–	Y	4	4.4	++
7	1	F	56	5	3	–	N	1	3.7	0
8	1	M	58	6	5	–	Y	3	4.8	+
9	1	M	71	6	17	–	N	0	3.7	++
10	2	M	63	8	5	70%	N	1	4.0	0
11	2	M	55	9	3	57%	Y	2	3.5	+
12	2	M	63	9	4	72%	Y	4	3.1	+
13	2	F	64	9	5	md*	Y	2	4.4	0
14	2	M	66	9	4	77%	Y	4	5.9	0
15	2	M	63	10	1	61%	Y	3	3.8	+
16	2	F	65	10	5	41%	Y	4	4.6	+
17	2	M	69	10	9	100%	N	3	3.2	0
18	2	F	48	12	1	93%	N	0	4.5	0
19	2	M	65	12	7	44%	Y	3	2.6	++
20	3	M	64	13	5	50%	Y	4	2.6	+
21	3	F	66	13	9	78%	Y	4	3.8	0
22	3	F	69	13	10	41%	Y	3	3.4	++
23	3	F	57	14	4	79%	Y	3	3.9	+
24	3	F	68	14	1	72%	Y	3	4.5	+
25	3	M	65	16	4	72%	Y	6	2.5	++
26	3	M	68	19	4	74%	Y	4	2.6	++
27	3	F	71	20	4	86%	Y	2	3.6	+
28	3	M	72	20	21	29%	Y	4	3.5	++
29	3	M	60	24	13	57%	Y	5	2.4	++

*md: missing data.

doi:10.1371/journal.pone.0012728.t001

and pathological scores of all patients. Age and sex did not differ significantly between patients and controls. CC, as defined by Rome III criteria, affected one of the controls (10%) and 23 out of 29 PD patients (79%, $p < 0.001$) (**table 2**).

Lewy neurites in colonic biopsies from PD patients

Twenty-one out of 29 PD patients (72%) displayed Lewy pathology, in the form of Lewy neurites (LN) immunoreactive (IR) for both neurofilament (NF) and phosphorylated alpha-synuclein (**figure 1A–D**, **table 2**). No immunoreactivity for phosphorylated alpha-synuclein was observed within enteric neurons in controls, with the exception of some faint somatic labeling that was present in both patients and controls (data not shown). The proportion of patients with Lewy pathology did not correlate with disease

progression (78% positive in group 1, 50% positive in group 2 and 90% positive in group 3).

LN were observed in isolated or bundled fibers (**figure 1C–F**). Triple immunostaining experiments showed that 60% of the LN were also IR for tyrosine hydroxylase (TH). Thirty-seven percent of the LN were perivascular (**figure 1GH**), and 92% perivascular LN were TH-IR (**figure 1I–K**). Additional experiments performed in a subset of 6 positive PD patients (patients 16, 19, 22, 26, 28 and 29) showed that 51% of LN also expressed DBH (**figure S1**). No cytoplasmic Lewy body labeling was observed. 72% of patients exhibited phosphorylated alpha-synuclein-positive labeling (PS+ patients). However the pathological burden was strikingly disparate between PS+ patients: some displayed abundant LN in most samples, while others displayed only one

Table 2. Comparison of main clinical and immunohistochemical variables between patients and controls.

Parameters	Controls mean $\pm$ SD	Parkinson's mean $\pm$ SD	p-value
Age	58.6 $\pm$ 7.2	62.8 $\pm$ 7.4	0.131
Gender (% male)	58.6%	60.0%	1.000
Chronic constipation	10%	79%	0.0002***
Neurons per ganglion	4.3 $\pm$ 0.3	3.7 $\pm$ 0.2	0.040*
Lewy neurites (% positive patients)	0%	72%	0.0001***

doi:10.1371/journal.pone.0012728.t002

positive inclusion in a single biopsy. Postulating that the density of LN was a more relevant marker than their mere presence/absence, we used a quantitative Lewy pathology score. Group 0 represented the negative cases ($n = 8$) while groups + ($n = 11$) and ++ ($n = 10$) represented moderate and severe Lewy pathology, respectively.

Neurofilament and tyrosine hydroxylase-expressing neurons in the submucosal plexus

In order to assess the suitability of NF as a neuronal marker in human SMP, we first performed a double Hu and NF-immunostaining in a subset of 3 control and 3 PD patients (patients 9, 17 and 27). Anti-NF 200 kDa antibody virtually labels all submucosal neurons in both conditions (**figure S2**), thus allowing the use of NF-immunostaining for neuronal count. Control submucosal samples displayed 4.3 ± 0.8 NF-IR neurons per ganglion. In PD, there was a decreased number of NF-IR neurons per ganglion (3.7 ± 0.8 ; $p = 0.04$) (**figure 2AB, table 2**).

When patients were separated into two groups according to the presence (PS+) or absence (PS-) of phospho-synuclein IR neurites, only PS+ patients had a significant drop in the amount of NF-IR when compared to controls ($p = 0.01$) (**figure 2C**). When PS+ patients were further stratified into subgroups with moderate (+) and severe (++) pathology, there was a highly significant difference in NF-IR between PS+ patients with severe pathology (++) and the control group ($p < 0.01$), and furthermore significant differences were apparent between the severe pathology group and those with absent (0) and moderate (+) pathology ($p < 0.05$) (**figure 2D**). After adjustment for age, a significant correlation remained between Lewy score and the number of NF-IR neurons per ganglion ($p = 0.02$). There was no correlation between the number of neurons per ganglion and age ($p = 0.193$), nor between the number of neurons per ganglion and disease duration ($p = 0.094$), including after age-adjustment ($p = 0.479$).

Clinicopathological correlations

We then sought to correlate our two primary histological findings, namely LN and the number of NF-IR neurons, with both neurological and chronic constipation (CC) symptoms (**table 3**).

a. Neurological. In order to correlate Lewy pathology with clinical features, we stratified patients according to the quantitative Lewy pathology score, as described above. The Lewy pathology score positively correlated with age ($r_s = 0.395$; $p = 0.03$) (**figure 3A**). Age is associated with worsening prognosis of PD [24], and as such is a potential confounding factor. Therefore, all subsequent correlations between Lewy pathology and disease severity were performed after adjusting for age.

There was no correlation between pathology and disease duration. Axial score was higher in the group with severe Lewy

pathology (++) when compared to the groups with absent (0) or moderate (+) pathology ($p < 0.01$) (**figure 3B**), and axial score positively correlated with the Lewy pathology score ($p = 0.004$). Further reinforcing these findings, dopa-responsiveness negatively correlated with the severity of pathological burden ($p = 0.0064$). The group devoid of LN was significantly more responsive to levodopa than the groups with either moderate ($p < 0.05$) or severe ($p < 0.01$) pathology (**figure 3C**). Conversely, the number of neurons per ganglion did not correlate with either axial score or dopa-responsiveness.

b. Gastrointestinal. CC was significantly more frequent among PS+ (19/21) than among PS- patients (4/8) ($p < 0.05$, Fisher's exact test). The severity of CC, as assessed by the constipation score, positively correlated with the Lewy pathology score ($r_s = 0.381$; $p = 0.042$) (**figure 3D**). However, this correlation was not significant after adjusting for age ($p = 0.17$). There was no correlation between the number of neurons per ganglion and CC score ($p = 0.56$).

Discussion

The four main outcomes of the present survey are (1) the demonstration of LN in the SMP of 72% of PD patients, but in none of the controls, (2) a higher frequency of constipation in LN-positive patients, (3) a strong correlation between LN burden and disease severity, (4) the possibility to readily and reproducibly analyze the ENS in living patients, thereby providing an opportunity to develop an original biomarker for PD.

Lewy pathology in the SMP of PD patients

A major finding of our study was the identification and characterization of neuropathological lesions in the colonic submucosa of PD patients. Lewy pathology in the SMP was composed of LN only. This is consistent with a recent report in which alpha-synuclein inclusions observed in the gastric submucosa of deceased PD patients were LN, while Lewy bodies were present in the soma of myenteric neurons [25]. The absence of Lewy bodies in the SMP precludes affirmation that the SMP is intrinsically affected by the pathological process. Indeed, Lewy bodies and LN have been reported in colonic and gastric myenteric neurons of deceased PD patients ([25] and our unpublished results). In the guinea pig, myenteric neurons have been shown to project to the SMP as well as to the submucosal blood vessels [26].

Intrinsic dopaminergic neurons in the myenteric plexus are altered in PD both in human [27] and animal models [28]. However, intrinsic dopaminergic neurons are a minority in the colonic SMP [29]. At the level of the colonic SMP, the majority of TH-IR neurites are noradrenergic sympathetic axons that also express DBH (94% in our unpublished data). Our present results show that 37% and 60% of LN are perivascular and TH-IR

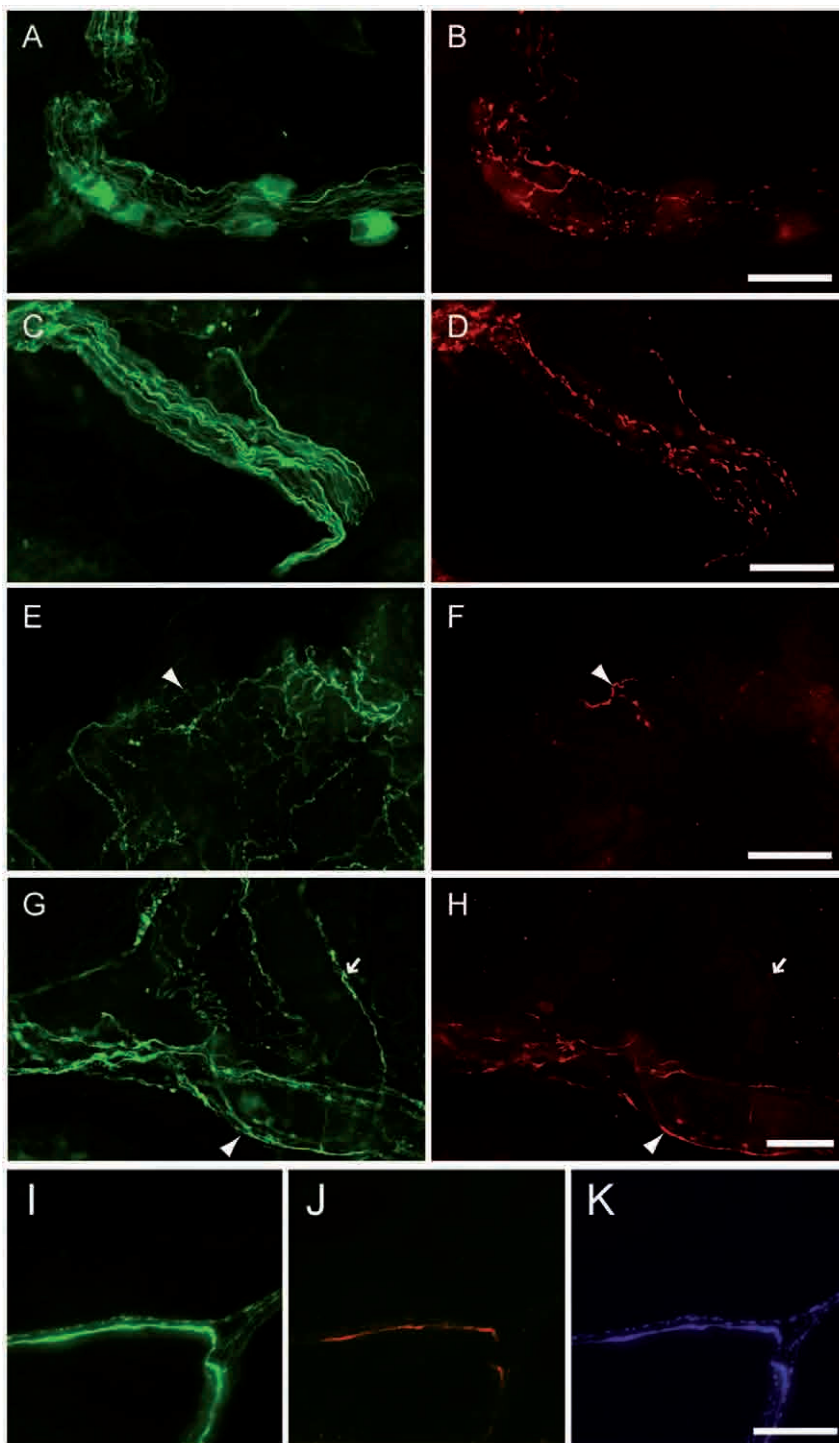


Figure 1. Phospho- α -synuclein-positive submucosal neurites in PD patients. Labeling with antibodies against neurofilament (NF) (**A****C****E****G****I**) and phosphorylated α -synuclein (**B****D****F****H****J**) revealed that some NF-immunoreactive (IR) neurites were also phospho- α -synuclein-IR. Occasionally, these phospho- α -synuclein-IR neurites were present amidst a submucosal ganglion (**A****B**). Some of these structures formed bundles (**D**) while others were isolated (**arrowhead in F**). Thirty seven percents of the phospho- α -synuclein-IR neurites were perivascular (**G****H**). Triple immunostaining with antibodies against tyrosine hydroxylase (**K**) revealed that 60% of LN were also TH-immunoreactive (**I****J****K**). Scale bar: 30 μ m.
doi:10.1371/journal.pone.0012728.g001

respectively, and that 51% are DBH-IR, suggesting that many TH-IR LN belong to postganglionic sympathetic neurons. Thus, a significant proportion of the enteric pathology reflects the widespread sympathetic degeneration seen in other systems [30,31].

LN in the SMP was present in 21 out of 29 PD patients. The heterogeneity of PD with regard to peripheral autonomic alterations was underscored by two recent autopsy-based studies that found Lewy inclusions in the GI tract as well as in the sympathetic network of nearly three-quarters of PD patients

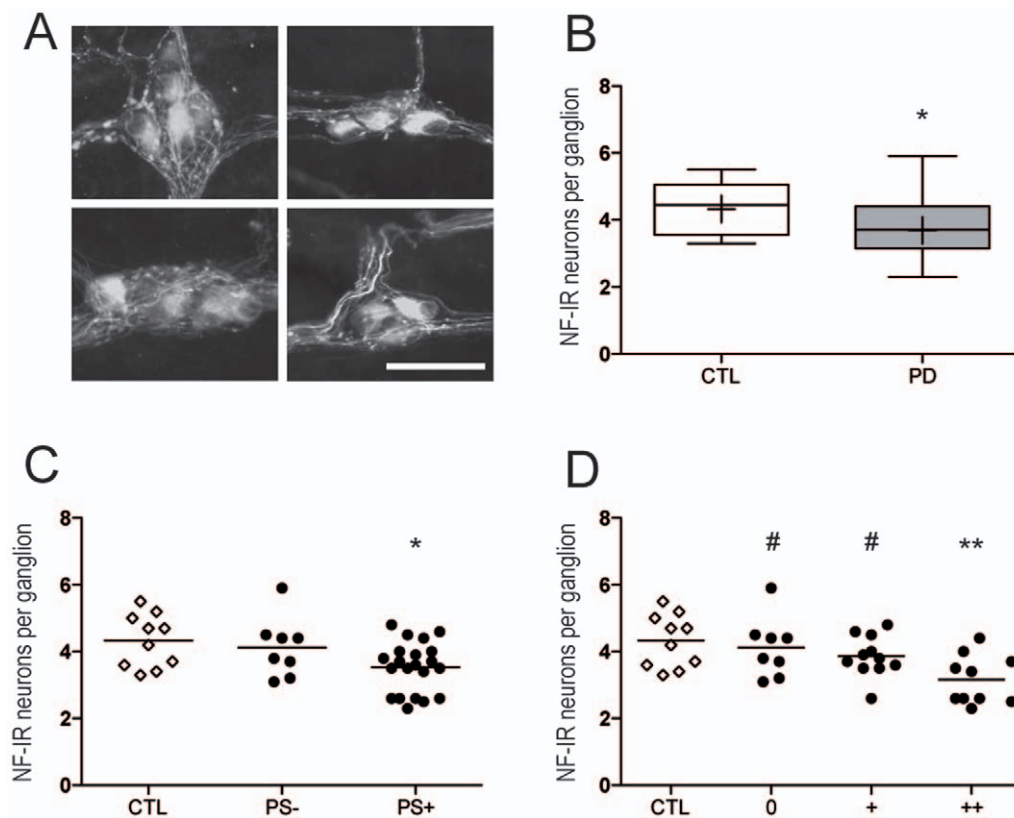


Figure 2. Count of neurofilament-positive neurons in the submucosal plexus of PD patients. **A.** Neurofilament-immunoreactive (NF-IR) submucosal neurons were counted in every available ganglion from colonic biopsies. Representative photographs of ganglia from PD patients (left panels) and controls (right panels). Scale bar: 30 μ m. **B.** A significant decrease in the number of NF-IR neurons per ganglion was present in the SMP of PD patients (PD, $n = 29$) as compared to controls (CTL, $n = 10$) ($p < 0.05$). The bottom and the top of the box represent the 25th and 75th percentiles, respectively, and the end of the whiskers represent the minimum and maximum values; the median is represented as a bar and the mean as a '+' sign inside the box. **C.** When segregating patients according to the presence (PS+) or absence (PS-) of phospho-synuclein IR neurites, the difference between patients and controls was sustained only for the group with Lewy pathology (PS+, $n = 21$, $p < 0.05$). **D.** When further stratifying patients according to the density of pathology, the difference between patients and controls was sustained only for the group with severe Lewy pathology (++, $n = 10$, $p < 0.01$). Groups without (0) or with moderate pathology (+) significantly differed from the group with severe (++) pathology ($p < 0.05$). Each white square represents one control, each black circle represents one PD patient. Horizontal bars represent the mean. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ as compared with controls. # $p < 0.05$ as compared with the group with severe pathology (++)
doi:10.1371/journal.pone.0012728.g002

[30,32]. Whether this heterogeneity reflects different PD subtypes or disease severity will be further discussed.

Because of samples shortage, NF-co-immunostaining was intended both for localizing phosphorylated alpha-synuclein

immunoreactivity within neurons and for neuronal counting, taking advantage of NF somatic labeling. A significant decrease in the number of NF-IR neurons was observed in the SMP of PD patients. The significance of this finding is debatable since the

Table 3. Clinico-pathological correlations.

	Age	Disease duration (years)	UPDRS-III axial subscore	Dopa-responsiveness	Sum of Rome III constipation items	Neurons per ganglion	Lewy pathology quantitative score
Correlations							
Spearman's correlation with quantitative score (p values)	0.034 *	0.290	0.008 **	0.007 **	0.042 *	0.004 **	0
Age-adjusted correlation with quantitative score (p values)		0.507	0.004 **	0.006 **	0.17	0.02 *	0

doi:10.1371/journal.pone.0012728.t003

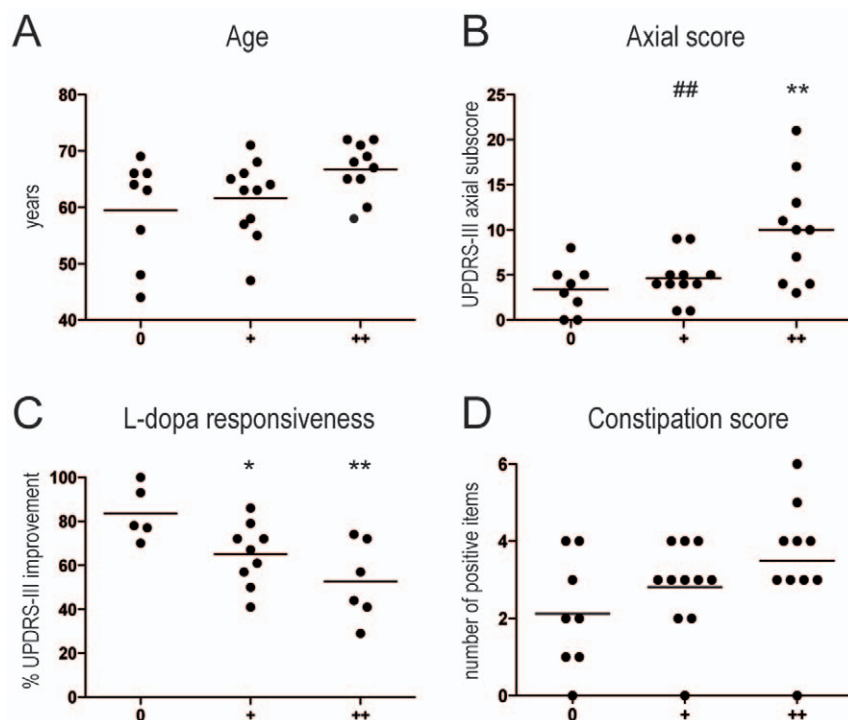


Figure 3. Correlation of clinical symptoms with pathology burden. **A.** Measure of pathology burden using a quantitative score correlated with age, which appeared as a potential confounding factor. Subsequent correlation analysis was performed after adjusting the data for age. **B.** Pathology burden positively correlated with axial score, which measures axial symptoms such as dysarthria and postural instability. The group with severe pathology (++) significantly differed from the group with absent (0) or moderate (+) pathology ($p < 0.01$). **C.** Pathology burden also correlated with L-Dopa responsiveness, estimated by the percentage of UPDRS-III improvement after L-Dopa intake. Responsiveness was higher in the group with absent pathology (0), as compared with the group with moderate (+, $p < 0.05$) or severe (++, $p < 0.01$) pathology. **D.** Pathology burden also correlated with constipation severity, as defined by the number of positive answers to the constipation items of Rome III questionnaire. Each black circle represents one PD patient. Horizontal bars represent the mean. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ as compared with the group with absent pathology (0). ## $p < 0.05$ and ### $p < 0.01$ as compared with the group with severe pathology (++)
doi:10.1371/journal.pone.0012728.g003

suitability of NF as an enteric neuronal marker has been challenged in a recent study showing that as low as 43% of Hu-IR neurons co-expressed NF in the myenteric plexus [33]. However in our experience, virtually all Hu-IR submucosal neurons display somatic NF immunoreactivity (figure S2). This discrepancy might result from differences in the expression of NF between the submucosal and myenteric plexus and/or from differences in the sensitivity of the antibodies that were used.

Although we cannot rule out phenotypic changes resulting in a decreased expression of NF in a subset of neurons, it is tempting to attribute the drop in NF-IR to neuronal loss. Whether enteric neuron loss occurs in PD is still unclear. Two earlier studies performed on biopsies and surgical samples failed to show any neuronal loss in the colonic SMP of PD patients [19,27]. The low number of patients assessed in these studies probably accounts for this discrepancy. If enteric neurodegeneration occurs in the course of PD, the cardinal neuropathology of the disease, namely neuronal death and Lewy inclusions, would be recapitulated in the ENS, thereby mirroring the lesions of affected brainstem nuclei in the CNS.

Lewy pathology burden and constipation

GI dysfunction stands among the most common non-motor symptoms of PD. Symptoms such as dysphagia, nausea, gastroparesis, and bowel dysfunction, including both reduced bowel movement frequency and dyschezia, are a significant cause of disability [34]. CC was significantly more frequent in the group with than without LN, suggesting a pathogenic role for inclusions.

In this aspect however our study suffers from two potential limitations. First, we did not use a validated constipation severity score. Scores such as Patient Assessment of Constipation Symptoms (PAC-SYM) questionnaire [35] might have revealed stronger correlations between pathology burden and CC, while the correlation we found did not remain significant after adjustment for age. Second we did not assess the MP, which is directly involved in the control of bowel motility. Whether the density of LN in the SMP is representative of the pathology burden in the MP is still an open question that could be addressed by a comparative and comprehensive analysis of the myenteric and SMP in surgical or postmortem specimens.

Although controversial, CC has been linked to increased age-related neurodegeneration in the ENS [36]. Loss of submucosal neurons [37,38] and alterations of the sympathetic innervation [39] in the ageing rat have been implicated in the pathophysiology of CC, and a loss of myenteric neurons has been demonstrated in the colon of patients with CC [40]. From our study, CC in PD does not appear to be related with the number of submucosal NF-IR neurons, and degeneration of sympathetic innervation might play a role in this feature, since a significant proportion of LN belonged to sympathetic outputs.

Lewy pathology burden is correlated with PD progression

All patients included in this study had a comprehensive neurological assessment. This enabled us to draw parallels between pathological burden in the ENS and Parkinsonian symptoms.

The density of submucosal LN was significantly correlated with the presence of dopa-unresponsive axial symptoms, such as dysarthria or postural instability but not with disease duration and motor symptoms. Two recent studies relating autonomic dysfunction with the clinical phenotype of PD provided similar results [41,42]. Clinical scores of autonomic symptoms, postural blood pressure response impairment [41] and myocardial ^{123}I -metaiodobenzylguanidine uptake [42] weakly correlated with disease duration and motor symptom severity. Conversely, the presence of axial symptoms was associated with greater autonomic dysfunction. These studies, together with our results, strongly suggest that functional and structural alterations in the enteric and autonomic nervous systems are associated with the presence of axial motor symptoms. Interestingly, a recent survey searching for patterns of coherency among the full clinical spectrum of PD found that dysautonomic, axial and cognitive symptoms co-segregated and best characterized disease severity [43]. In an individual patient, the appearance of axial symptoms is predictive of disease progression toward dementia [10] and is thought to reflect the spreading of pathology to non-dopaminergic structures of the brainstem, forebrain and cortex [44]. Thus, the heterogeneity of PD regarding dysautonomia in general, and alterations of the ENS in particular, might reflect in part different degrees of severity.

The ENS as biomarker in PD

Routine colonic biopsies can be used to provide examination of the submucosal enteric neurons in living patients [45]. Here we confirm on a large scale that such a procedure allows a safe and reliable analysis of the ENS. Total colonoscopy is a simple diagnostic procedure with a low risk of adverse effects [46]. Accordingly, no complications occurred in the 40 patients included in the present study, either during or after the procedure.

The skin and the olfactory epithelium contain neuronal networks affected by Lewy pathology during PD that are also accessible by routine biopsies and have recently been evaluated as histopathological markers for PD [30,47]. However, the results of these works were disappointing since only 2 out of 20 PD patients displayed LN in skin biopsies and no alpha-synuclein aggregates were present in the biopsied olfactory epithelium of 7 Parkinsonian patients [48,49]. Consequently, our study is the first to show that Lewy pathology can be reproducibly analyzed using biopsies from a peripheral tissue in living patients.

The ENS displays specific features that make it a prime candidate for being a histopathological marker of PD (for review see [50]). In contrast to the skin and olfactory epithelium, colonic biopsies allow the retrieval and analysis of a dense integrated neuronal network, not only neuronal processes [18]. Using optical recording techniques, electrophysiological properties of submucosal neurons from colonic biopsies can be studied [51]. Therefore, analysis of the ENS during the progression of PD may represent a unique opportunity to monitor PD pathology and its impact on neuronal function in living patients. We have shown in the present survey that the pathological burden in the ENS is correlated to the presence of dopa-unresponsive axial symptoms, strongly supporting the use of colonic biopsies as a biomarker for the assessment of PD severity. Their use for the positive diagnosis of incipient or even preclinical PD still requires to test the specificity of enteric submucosal LN in larger series and to improve the sensitivity of the technique. Possible strategies include an increased number of colonic samples or the use of upper digestive tract biopsies, which add the potential risk of inhalation during the endoscopy.

Braak and coworkers have postulated that the ENS is affected early by Lewy pathology during the course of PD, even before the

pathology is apparent in the substantia nigra. This suggests that the ENS heralds the onset of a pathological process that further spreads to the CNS via autonomic innervation of the gut [25,52]. Although tempting, this theory relies only on correlations performed in autopsy studies and is still a matter of debate. By demonstrating the presence of LN in the colon at early stages (78% of patients <6 years), our findings do not refute this hypothesis. We believe that the use of colonic biopsies, by enabling analysis of the ENS in PD patients at a very early stage of the disease, will be helpful for validating or refuting Braak's hypothesis.

In conclusion, the ENS can be considered not only as 'the second brain' [53], but also as a window towards the 'first' brain. The ENS probably antedates the CNS in evolutionary terms, and its complexity challenges its central counterpart, especially since the functional and chemical diversity of enteric neurons closely resembles that of the CNS [54]. Enteric neuropathies recapitulate many aspects of neurological diseases [2]. In particular, degenerative changes occur in the aging gut [55]. In this context, it is hardly surprising that enteric neurons can mirror central alterations in neurodegenerative disorders. It is possible that further studies may expand this concept to other neurodegenerative diseases. For example, the presence of hyperphosphorylated tau aggregates in myenteric neurons of aging rats suggests that tauopathies such as Alzheimer's disease may also affect the ENS [56]. We consider our method to represent a major advance in the search for biomarkers for PD. The use of the, as yet unrecognized, ENS as a window into the CNS represents an original approach, with implications that may well extend beyond PD.

Supporting Information

Figure S1 51% of phospho- α -synuclein-positive submucosal neurites express DBH. Labeling with antibodies against dopamine-beta-hydroxylase (DBH) (BDF) and phosphorylated α -synuclein (ACE) revealed that some DBH-immunoreactive (IR) neurites were also phospho- α -synuclein-IR. In a subset of 6 PD patients, the proportion of Lewy neurites that expressed DBH was 51%. Perivascular Lewy neurites in EF. Scale bar 30 μm .
Found at: doi:10.1371/journal.pone.0012728.s001 (3.90 MB PDF)

Figure S2 Evaluation of neurofilament immunostaining as a pan-neuronal marker in human submucosal plexus. Labeling with antibodies against neurofilament 200 kDa (NF) (ACEGIK) and Hu C/D (BDFHJL) revealed that virtually all submucosal neurons, whether isolated (EF and KL) or in submucosal ganglia containing >2 neurons, coexpress NF and Hu C/D. Sample images from 3 controls (A–F) and 3 PD patients (G–L). Note the nuclear expression of Hu in L, a pattern that is occasionally seen in patients and controls. Scale bar 30 μm .
Found at: doi:10.1371/journal.pone.0012728.s002 (8.13 MB PDF)

Acknowledgments

The authors wish to thank Monica Roy, Fabienne Vavasseur and Peggy Agneau for the help in the assessment in patients and controls. We are indebted to Philippe Hulin and the Cellular and Tissue Imaging Core Facility of Nantes University (MicroPICell) for the microscopy study. Study registered at ClinicalTrials.gov (identifier NCT00491062).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MN SBdV JPG P. Damier P. Derkinderen. Performed the experiments: TL EC AD TC MT SP MF JPG. Analyzed the data: TL MN AD JMNG SP P. Derkinderen. Wrote the paper: TL MN SP P. Derkinderen.

References

- Furness JB (2008) The enteric nervous system: normal functions and enteric neuropathies. *Neurogastroenterol Motil* 20(Suppl 1): 32–38.
- De Giorgio R, Camilleri M (2004) Human enteric neuropathies: morphology and molecular pathology. *Neurogastroenterol Motil* 16: 515–531.
- Basilisco G, Gebbia C, Peracchi M, Velio P, Conte D, et al. (2005) Cerebellar degeneration and hearing loss in a patient with idiopathic myenteric ganglionitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 17: 449–452.
- Haik S, Faucheux BA, Hauw JJ (2004) Brain targeting through the autonomous nervous system: lessons from prion diseases. *Trends Mol Med* 10: 107–112.
- Joiner S, Linchan JM, Brandner S, Wadsworth JD, Collinge J (2005) High levels of disease related prion protein in the ileum in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Gut* 54: 1506–1508.
- Lebouvier T, Chaumette T, Paillusson S, Duyckaerts C, Bruley des Varannes S, et al. (2009) The second brain and Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 30: 735–741.
- Lees AJ, Hardy J, Revesz T (2009) Parkinson's disease. *Lancet* 373: 2055–2066.
- Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AH (2006) Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol* 5: 235–245.
- Martinez-Martin P, Schapira AH, Stocchi F, Sethi K, Odin P, et al. (2007) Prevalence of nonmotor symptoms in Parkinson's disease in an international setting; study using nonmotor symptoms questionnaire in 545 patients. *Mov Disord* 22: 1623–1629.
- Aarsland D, Andersen K, Larsen JP, Perry R, Wentzel-Larsen T, et al. (2004) The rate of cognitive decline in Parkinson disease. *Arch Neurol* 61: 1906–1911.
- Kaye J, Gage H, Kimber A, Storey L, Trend P (2006) Excess burden of constipation in Parkinson's disease: a pilot study. *Mov Disord* 21: 1270–1273.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, et al. (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388: 839–840.
- Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, et al. (2002) alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 4: 160–164.
- Anderson JP, Walker DE, Goldstein JM, de Laat R, Banducci K, et al. (2006) Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. *J Biol Chem* 281: 29739–29752.
- Braak H, Braak E (2000) Pathoanatomy of Parkinson's disease. *J Neurol* 247(Suppl 2): I13–10.
- Qualman SJ, Haupt HM, Yang P, Hamilton SR (1984) Esophageal Lewy bodies associated with ganglion cell loss in achalasia. Similarity to Parkinson's disease. *Gastroenterology* 87: 848–856.
- Dickson DW, Fujishiro H, Orr C, DelleDonne A, Josephs KA, et al. (2009) Neuropathology of non-motor features of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord* 15(Suppl 3): S1–5.
- Lebouvier T, Coron E, Chaumette T, Paillusson S, Bruley des Varannes S, et al. (2009) Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients. *Neurogastroenterol Motil*.
- Lebouvier T, Chaumette T, Damier P, Coron E, Touchefeu Y, et al. (2008) Pathological lesions in colonic biopsies during Parkinson's disease. *Gut* 57: 1741–1743.
- Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ (1992) Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55: 181–184.
- Fahn S, Elton R, Members-of-the-UPDRS-development-committee (1987) Unified Parkinson's disease rating scale. In: Fahn S, Marsden C, Calne D, Lieberman A, eds. *Recent developments in Parkinson's disease*. New York: Macmillan. pp 153–163.
- Espey AJ, Li JY, Johnston L, Chen R, Lang AE (2005) Mirror movements in parkinsonism: evaluation of a new clinical sign. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76: 1355–1358.
- (2006) Guidelines—Rome III Diagnostic Criteria for Functional Gastrointestinal Disorders. *J Gastrointest Liver Dis* 15: 307–312.
- Diederich NJ, Moore CG, Leurgans SE, Chmura TA, Goetz CG (2003) Parkinson disease with old-age onset: a comparative study with subjects with middle-age onset. *Arch Neurol* 60: 529–533.
- Braak H, de Vos RA, Bohl J, Del Tredici K (2006) Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett* 396: 67–72.
- Reed DE, Vanner SJ (2003) Long vasodilator reflexes projecting through the myenteric plexus in guinea-pig ileum. *J Physiol* 553: 911–924.
- Singaram C, Ashraf W, Gaumnitz EA, Torbey C, Sengupta A, et al. (1995) Dopaminergic defect of enteric nervous system in Parkinson's disease patients with chronic constipation. *Lancet* 346: 861–864.
- Kuo YM, Li Z, Jiao Y, Gaborit N, Pani AK, et al. (2010) Extensive enteric nervous system abnormalities in mice transgenic for artificial chromosomes containing Parkinson disease-associated alpha-synuclein gene mutations precede central nervous system changes. *Hum Mol Genet* 19: 1633–1650.
- Anlauf M, Schafer MK, Eiden L, Weihe E (2003) Chemical coding of the human gastrointestinal nervous system: cholinergic, VIPergic, and catecholaminergic phenotypes. *J Comp Neurol* 459: 90–111.
- Ikemura M, Saito Y, Sengoku R, Sakiyama Y, Hatsuta H, et al. (2008) Lewy body pathology involves cutaneous nerves. *J Neuropathol Exp Neurol* 67: 945–953.
- Orimo S, Uchihara T, Nakamura A, Mori F, Kakita A, et al. (2008) Axonal alpha-synuclein aggregates herald centripetal degeneration of cardiac sympathetic nerve in Parkinson's disease. *Brain* 131: 642–650.
- Beach TG, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue L, et al. (2010) Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol*.
- Ganns D, Schrodl F, Neuhuber W, Brehmer A (2006) Investigation of general and cytoskeletal markers to estimate numbers and proportions of neurons in the human intestine. *Histol Histopathol* 21: 41–51.
- Pfeiffer RF (2003) Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2: 107–116.
- Frank L, Kleinman L, Farup C, Taylor L, Miner P, Jr. (1999) Psychometric validation of a constipation symptom assessment questionnaire. *Scand J Gastroenterol* 34: 870–877.
- Camilleri M, Cowen T, Koch TR (2008) Enteric neurodegeneration in ageing. *Neurogastroenterol Motil* 20: 418–429.
- Wade PR, Cowen T (2004) Neurodegeneration: a key factor in the ageing gut. *Neurogastroenterol Motil* 16(Suppl 1): 19–23.
- Phillips RJ, Pairitz JC, Powley TL (2007) Age-related neuronal loss in the submucosal plexus of the colon of Fischer 344 rats. *Neurobiol Aging* 28: 1124–1137.
- Phillips RJ, Rhodes BS, Powley TL (2006) Effects of age on sympathetic innervation of the myenteric plexus and gastrointestinal smooth muscle of Fischer 344 rats. *Anat Embryol (Berl)* 211: 673–683.
- Wedel T, Spiegler J, Soellner S, Roblick UJ, Schiedeck TH, et al. (2002) Enteric nerves and interstitial cells of Cajal are altered in patients with slow-transit constipation and megacolon. *Gastroenterology* 123: 1459–1467.
- Allcock LM, Kenny RA, Burn DJ (2006) Clinical phenotype of subjects with Parkinson's disease and orthostatic hypotension: autonomic symptom and demographic comparison. *Mov Disord* 21: 1851–1855.
- Kim JS, Lee KS, Song IU, Kim YI, Kim SH, et al. (2008) Cardiac sympathetic denervation is correlated with Parkinsonian midline motor symptoms. *J Neurol Sci* 270: 122–126.
- van Rooden SM, Visser M, Verbaan D, Marinus J, van Hilten JJ (2009) Patterns of motor and non-motor features in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80: 846–850.
- Alves G, Larsen JP, Emre M, Wentzel-Larsen T, Aarsland D (2006) Changes in motor subtype and risk for incident dementia in Parkinson's disease. *Mov Disord* 21: 1123–1130.
- Lebouvier T, Coron E, Chaumette T, Paillusson S, Bruley des Varannes S, et al. (2009) Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients. *Neurogastroenterol Motil* In press.
- Dafnis G, Ekblom A, Pahlman L, Blomqvist P (2001) Complications of diagnostic and therapeutic colonoscopy within a defined population in Sweden. *Gastrointest Endosc* 54: 302–309.
- Beach TG, White CL, 3rd, Hladik CL, Sabbagh MN, Connor DJ, et al. (2009) Olfactory bulb alpha-synucleinopathy has high specificity and sensitivity for Lewy body disorders. *Acta Neuropathol* 117: 169–174.
- Miki Y, Tomiyama M, Ueno T, Haga R, Nishijima H, et al. (2010) Clinical availability of skin biopsy in the diagnosis of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 469: 357–359.
- Witt M, Bormann K, Gudziol V, Pehlke K, Barth K, et al. (2009) Biopsies of olfactory epithelium in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* 24: 906–914.
- Lebouvier T, Tasselli M, Paillusson S, Pouclet H, Neunlist M, et al. (2010) Biopsable neural tissues: toward new biomarkers for Parkinson's disease? *Front Neurosci* in press.
- Buhner S, Li Q, Vignali S, Barbara G, De Giorgio R, et al. (2009) Activation of human enteric neurons by supernatants of colonic biopsy specimens from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 137: 1425–1434.
- Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H (2007) Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33: 599–614.
- Gershon MD (1998) *The second brain: the scientific basis of gut instinct and a groundbreaking new understanding of nervous disorders of the stomach and intestine*. New York, NY: HarperCollinsPublishers, xvi: 314 p.
- Benarroch EE (2007) Enteric nervous system: Functional organization and neurologic implications. *Neurology* 69: 1953–1957.
- Phillips RJ, Powley TL (2007) Innervation of the gastrointestinal tract: patterns of aging. *Auton Neurosci* 136: 1–19.
- Phillips RJ, Walter GC, Ringer BE, Higgs KM, Powley TL (2009) Alpha-synuclein immunopositive aggregates in the myenteric plexus of the aging Fischer 344 rat. *Exp Neurol* 220: 109–119.

Colonic Neuropathology is Independent of Olfactory Dysfunction in Parkinson's Disease

Thibaud Lebouvier^{a,b,c,d,e}, Hélène Pouclet^{a,b,c,d,e}, Emmanuel Coron^{a,b,c,e}, Anne Drouard^{b,c}, Jean-Michel N'Guyen^f, Monica Roy^b, Fabienne Vavasseur^b, Stanislas Bruley des Varannes^{a,b,c,e}, Philippe Damier^{b,c,d}, Michel Neunlist^{a,b,c,e}, Pascal Derkinderen^{a,b,c,d,e,*} and Tiphaine Rouaud^{a,b,c,d,e}

^a*Inserm, Nantes, France*

^b*Inserm, Nantes, France*

^c*University Nantes, Nantes, France*

^d*CHU Nantes, Department of Neurology, Nantes, France*

^e*CHU Nantes, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, France*

^f*CHU Nantes, Pôle d'Information Médicale, Évaluation et Santé Publique (PIMESP), Nantes, France*

Abstract. Olfactory dysfunction (OD) and constipation are two frequent and early non-motor features of Parkinson's disease (PD). Colonic PD neuropathology, the putative cause of constipation, can be analyzed and quantified using routine colonic biopsies and parallels disease severity. The present study was aimed at investigating whether the severity of neuropathology in the colon in PD is related to OD. Twenty-six PD patients were included. Colonic neuropathology, i.e., the density of Lewy pathology and the number of submucosal neurons, was unrelated to OD as assessed using the University of Pennsylvania Smell Identification. This suggests that unlike colonic Lewy pathology, OD is unrelated to disease severity.

Keywords: Parkinson's disease, olfactory dysfunction, enteric nervous system, constipation, Lewy neuritis, biopsies

It is widely accepted that Parkinson's disease (PD) is associated with a variety of non-motor features, which affect the vast majority of patients during the course of the disease. Two such non-motor symptoms are olfactory dysfunction (OD) and constipation. Almost all patients with PD have at least some loss of sense of smell and 60% experience chronic constipation [1, 2]. Both OD and chronic constipation can antedate the onset of motor symptoms and according to Braak hypothesis, the enteric nervous system (ENS) and the olfactory structures simultaneously herald the pathological process in the central nervous system [3, 4]. The enteric Lewy pathology within the ENS is likely to contribute to the gastrointestinal dysfunction observed in PD patients [5–7] and especially to constipation [8].

We have recently shown that routine colonic biopsies enable a precise analysis of the Lewy pathology in living PD patients [8, 9]. Interestingly the pathology burden in the colon correlated with disease severity [8]. We thus undertook the present research to investigate whether olfactory dysfunction in PD is related to the extent of Lewy pathology in the colon – and hence to disease severity.

PATIENTS AND METHODS

Subjects

Details of patient selection and study design have been published previously [8]. Briefly, 30 PD patients aged 40–75 years were enrolled [8]. Diagnosis was made according to the United Kingdom PD Survey Brain Bank [10]. To limit recruitment bias and in order to span the entire course of PD, 3 groups of

*Correspondence to: Pascal Derkinderen, Inserm U913, 1 place Alexis Ricordeau, CHU Nantes, 44093 Nantes Cedex 1, France. Tel.: 0033240165205; Fax: 0033240165203; E-mail: derkindere np@yahoo.fr; pascal.derkinderen@chu-nantes.fr.

patients divided according to disease duration were included (group 1: ≤ 6 years, group 2: 7–12 years and group 3: ≥ 13 years disease duration) [8]. PD patients with irritable bowel syndrome and/or anorectal dysfunction were excluded. All patients underwent nasal examination in order to rule out local nasal disease. Cognitive functions were assessed using the MATTIS dementia rating scale administered by a trained neuropsychologist (MR). Patients who scored below 130 were excluded. This study was conducted with the approval of the local Ethical Committee (Comité de protection des personnes Ouest VI, Brest) and registered on ClinicalTrials.gov (identifier NCT00491062). Written informed consent was obtained from each patient.

Patients' evaluation

Olfactory function was tested using the French version of the University of the Pennsylvania Smell Identification Test (UPSIT) and was carried out by the same investigator (AD) [11].

Colonoscopy biopsies

A total colonoscopy was performed according to the usual procedure of the Gastroenterology Department of Nantes University Hospital (all colonoscopies were performed by EC or SBV). In both patients and controls, 2 biopsies were taken in the ascending colon and descending colon. Biopsies were performed using standard biopsy forceps without needles (FB210K, Olympus co., Japan). Samples were immediately immersed in 4°C saline solution and processed as described previously [12, 13].

Microdissection and immunohistochemistry

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

Whole-mount preparations of submucosa were permeabilized for 3 hours in PBS/NaN₃ containing 1% Triton X-100 and 10% horse serum. They were then incubated with antibodies against phosphorylated alpha-synuclein (1:5000, WAKO, Osaka, Japan), which reliably detect Lewy pathology in the ENS and in the autonomic nervous system [5, 14], and neurofilament 200 kDa (NF, 1:500, Chemicon, USA). No pretreatment was used for immunohistochemistry with phosphorylated alpha-synuclein antibodies. Suitable secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488, 594 and 647 were used (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Specimens of submucosa were viewed under a Zeiss Axiovert 200 M microscope fluorescence microscope.

Neuronal cell counting and scoring

Neuronal counts were performed in one submucosa sample from the ascending and descending colon, respectively and were performed by two investigators (HP and TL). NF-immunoreactive neurons were counted in all available ganglia of the sample using a Zeiss Axiovert 200 M (Zeiss, Thornwood, NY). We have shown in a previous study that NF immunostaining virtually labels all submucosal neurons, thus allowing the use of NF-immunostaining for neuronal count [8]. The results were expressed as the average of the mean number of neurons per ganglion in the two biopsies. Density of phosphorylated alpha-synuclein inclusions was blindly assessed by two investigators (HP and PDe) after analyzing 2 biopsies from the ascending colon and 2 biopsies from the descending colon. A biopsy was considered positive when containing at least 1 LN. The density of Lewy pathology (exclusively Lewy neurites, as previously reported [8]) was evaluated using a quantitative rating score ("Lewy score") based on the proportion of positive biopsies (0: *absent*, scored 0; 1/4 positive biopsy: *moderate pathology*, scored 1; $\geq 2/4$ positive biopsies, *severe pathology* scored 2) [8].

Statistical analysis

Correlation between Lewy pathology score and other parameters were assessed by Spearman rank order correlation. Adjustment with age was done with multiple linear regression. Chi square tests were used for frequency analysis. For all statistical tests $p < 0.05$ was deemed significant.

RESULTS

A total of 30 PD patients were recruited. Four were excluded due to unavailability of UPSIT tests at the time of the visit (3 patients) and experimental mistakes during biopsies processing (one patient). Table 1 shows the main clinical features and pathological scores of all patients. Nineteen out of 26 patients displayed Lewy pathology, in the form of Lewy neurites (LN) immunoreactive for both NF and phosphorylated alpha-synuclein (Fig. 1 A, B, C and Table 1). A representative NF immunostaining used to label and to count submucosal neurons is shown in Fig. 1D.

We then sought to correlate our two primary histological findings, namely LN score and the number of NF-immunoreactive neurons, with OD. We have shown in a previous report that pathology burden in the ENS as assessed by colonic submucosal Lewy score, is associated with age [8]. Therefore, all subsequent regressions analyses were performed after adjusting for age. Lewy score and neuronal count did not correlate with disease duration ($p=0.23$ and $p=0.08$ respectively), with gender ($p=0.20$ and

$p=0.08$ respectively), or with UPSIT score ($p=0.382$ and $p=0.644$ respectively).

DISCUSSION

Impairment of sense of smell in PD was first reported in 1975 [15]. Since then, several studies have evaluated the putative relationship between OD, disease duration and motor and non-motor symptoms of the disease. The results of longitudinal analyses of olfactory function in subjects with PD are contradictory and show either no change over time [16] or a progressive increase in the olfactory deficit [17]. In cross-sectional studies, both odor detection and identification deficits are unrelated to disease stage, duration or motor severity [2, 16, 18–20]. Regarding non motor-symptoms, the results are still sparse but several recent reports have focused on the correlation between OD and sympathetic and/or parasympathetic dysautonomia. The severity of OD has been shown to be associated with loss of norenergic innervation of the heart [21], with baroreflex failure as well as with extracardiac dysautonomia [22].

Table 1
Main clinical characteristics, immunohistochemical findings and scoring in patients

Patient	Age	Sex	Group	DD (years)	CC	UPSIT	Neurons per mm ²	Lewy pathology score
1	67	M	1	2	Y	16	5,8	2
2	72	F	1	2	Y	7	3,2	2
3	47	M	1	4	N	22	3,8	1
4	66	M	1	4	Y	18	3,1	1
5	58	F	1	5	Y	30	3,9	2
6	56	F	1	5	N	28	3,7	0
7	58	M	1	6	Y	25	3,8	1
8	71	M	1	6	N	25	3,6	2
9	63	M	2	8	N	18	4,1	0
10	55	M	2	9	Y	22	3,6	1
11	63	M	2	9	Y	15	4,7	1
12	64	F	2	9	Y	25	3,9	0
13	66	M	2	9	Y	15	2,3	0
14	63	M	2	10	Y	10	4,0	1
15	65	F	2	10	Y	22	4,8	1
16	69	M	2	10	N	28	3,5	0
17	48	F	2	12	N	20	3,7	0
18	65	M	2	12	Y	15	3,7	2
19	64	M	3	13	Y	18	2,9	1
20	66	F	3	13	Y	21	3,1	0
21	57	F	3	14	Y	16	3,0	1
22	68	F	3	14	Y	16	2,5	1
23	65	M	3	16	Y	22	3,2	2
24	68	M	3	19	Y	14	3,5	2
25	72	M	3	20	Y	11	2,9	2
26	60	M	3	24	Y	14	4,3	2

Patients were classified in three groups according to disease duration (DD). Chronic constipation (CC) present (Y) or absent (N). Results from submucosal neuronal density (neurons per mm²) and Lewy neurites burden (Lewy pathology score, see methods) are included.

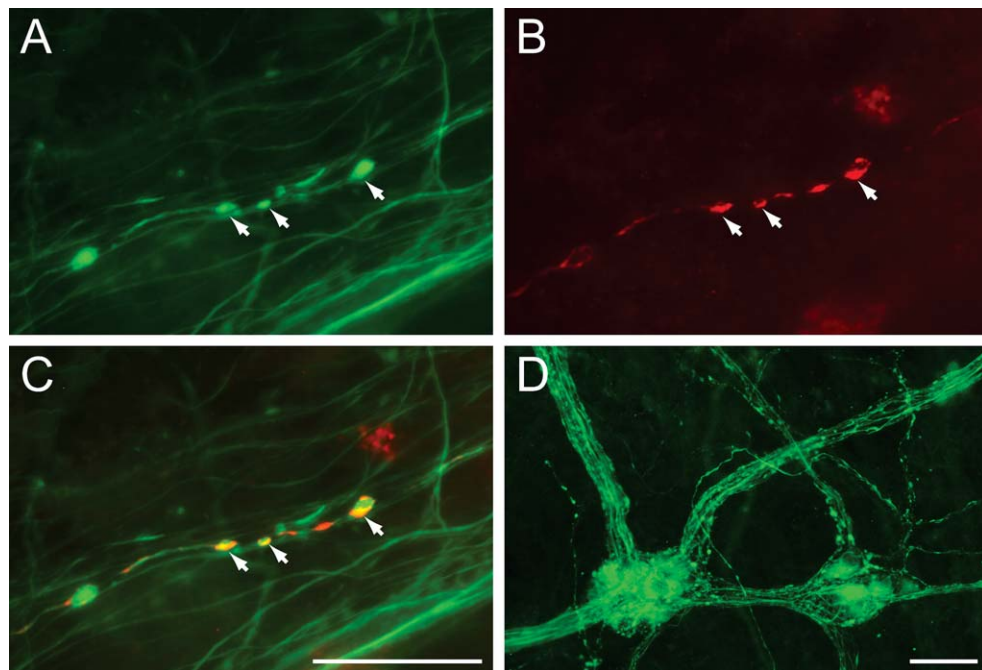


Fig. 1. Lewy neurites and neuronal counting in the submucosal plexus of PD patients. Labeling with antibodies against neurofilament (A) and phosphorylated alpha-synuclein (B) revealed that some neurofilament-immunoreactive neurites are also immunoreactive for phospho-alpha-synuclein (arrows, merge in C). Neurofilament-immunoreactive submucosal neurons were counted in every available ganglion from colonic biopsies. Representative photograph of a submucosal ganglia from a PD patient, devoid of Lewy pathology, is shown in D. Scale bars: 20 μ m.

The ENS is usually regarded as the third division of the autonomic nervous system, besides the sympathetic and the parasympathetic networks [23, 24]. Therefore, our results showing a lack of association between OD and colonic neuropathology are at odds with the results of the previous studies on cardiovascular dysautonomia. It should be pointed out however that all aforementioned studies on cardiovascular dysautonomia were performed using rating scales and/or physiologic and neuroimaging tests [21, 22]. There is thus a critical need for studies that will address the clinicopathological correlation of OD in PD. A study comparing the OD to the amount of Lewy pathology in the olfactory bulb, and especially the anterior olfactory nucleus that contain the higher density of Lewy bodies, would be ideal [25]. Nevertheless, olfactory bulb biopsy is a risky and invasive procedure that cannot be performed routinely in living patients [26]. As the only component of the olfactory system accessible to biopsy, olfactory epithelium was logically screened for Lewy pathology. The results were nevertheless disappointing as no evidence of disease-specific pathology was observed in the seven hyposmic PD patients who took part to the study [27]. In contrast to olfactory bulb, the ENS can be readily reached

and analyzed in living patients using routine biopsies obtained through colonoscopy [8, 9, 12, 13] or rectosigmoidoscopy [9, 28]. Recently, Shannon and collaborators have shown the presence of alpha-synuclein staining in biopsies taken from the distal sigmoid colon in 9 early-untreated PD patients. In this study, biopsies were processed using standard procedures, being sectioned and deparaffinized [28]. Despite being easy to perform, this method is not relevant for a precise morphological analysis of the ENS. We have therefore set up a microdissection technique of biopsies in order to obtain whole-mounts of submucosa [13]. Whole mounts from a single colonic biopsy allow a morphological and quantitative analysis of the ENS thereby providing the opportunity to directly assess the pathologic burden in the autonomic nervous system and to draw clinicopathological correlations [12, 13, 29]. Using this technique, we have previously shown that the pathological burden in the ENS is related to both chronic constipation and severity of levodopa-unresponsive axial features [8].

In this report, we extend our previous results by showing that OD is not associated with the severity of Lewy pathology in the ENS, reinforcing the notion that OD occurs early and progresses alongside PD

symptomatology [30]. The lack of correlation between OD and Lewy pathology in the ENS suggests that OD does not follow the same pattern of development as Lewy body pathology or other disease elements associated with increased severity of the disease.

ACKNOWLEDGMENTS

This present study was supported by a biomarker grant from the Michael J Fox Foundation for Parkinson's Research and by a grant from Nantes University Hospital (Direction de la Recherche Clinique). Work in Michel Neunlist's lab is supported by France Parkinson, Fondation de France, Aramisé, FFPG (Fédération française des groupements parkinsoniens), Parkinsoniens de Vendée and PSP France. TL is a recipient of poste d'accueil Inserm. We are indebted to Philippe Hulin and the Cellular and Tissular Imaging Core Facility of Nantes University (MicroPICell) for the microscopy study. There is no conflict of interest.

REFERENCES

- [1] Kaye J, Gage H, Kimber A, Storey L, & Trend P (2006) Excess burden of constipation in Parkinson's disease: A pilot study. *Mov Disord*, **21**, 1270-1273.
- [2] Tissingh G, Berendse HW, Bergmans P, DeWaard R, Drukarch B, Stoof JC, & Wolters EC (2001) Loss of olfaction in de novo and treated Parkinson's disease: Possible implications for early diagnosis. *Mov Disord*, **16**, 41-46.
- [3] Beach TG, Adler CH, Lue L, Sue LI, Bachalakuri J, Henry-Watson J, Sasse J, Boyer S, Shirohi S, Brooks R, Eschbacher J, White CL, 3rd, Akiyama H, Caviness J, Shill HA, Connor DJ, Sabbagh MN, & Walker DG (2009) Unified staging system for Lewy body disorders: Correlation with nigrostriatal degeneration, cognitive impairment and motor dysfunction. *Acta Neuropathol*, **117**, 613-634.
- [4] Hawkes CH, Del Tredici K, & Braak H (2007) Parkinson's disease: A dual-hit hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol*, **33**, 599-614.
- [5] Beach TG, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue L, White Iii CL, Akiyama H, Caviness JN, Shill HA, Sabbagh MN, & Walker DG (2009) Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol*, **119**, 689-702.
- [6] Braak H, de Vos RA, Bohl J, & Del Tredici K (2006) Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett*, **396**, 67-72.
- [7] Wakabayashi K, Takahashi H, Takeda S, Ohama E, & Ikuta F (1988) Parkinson's disease: The presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses. *Acta Neuropathol*, **76**, 217-221.
- [8] Lebouvier T, Neunlist M, Bruley des Varannes S, Coron E, Drouard A, N'Guyen JM, Chaumette T, Tasselli M, Paillusson S, Flamand M, Galmiche JP, Damier P, & Derkinderen P (2010) Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PLoS One*, **5**, e12728.
- [9] Pouclet H, Lebouvier T, Coron E, Bruley des Varannes S, Rouaud T, Roy M, Neunlist M, & Derkinderen P (2011) A comparison between rectal and colonic biopsies to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*.
- [10] Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, & Lees AJ (1992) Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: A clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **55**, 181-184.
- [11] Doty RL, Shaman P, Kimmelman CP, & Dann MS (1984) University of Pennsylvania Smell Identification Test: A rapid quantitative olfactory function test for the clinic. *Laryngoscope*, **94**, 176-178.
- [12] Lebouvier T, Chaumette T, Damier P, Coron E, Touchefeu Y, Vignaud S, Naveilhan P, Galmiche JP, Bruley des Varannes S, Derkinderen P, & Neunlist M (2008) Pathological lesions in colonic biopsies during Parkinson's disease. *Gut*, **57**, 1741-1743.
- [13] Lebouvier T, Coron E, Chaumette T, Paillusson S, Bruley des Varannes S, Neunlist M, & Derkinderen P (2010) Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients. *Neurogastroenterol Motil*, **22**, e11-e14.
- [14] Orimo S, Uchihara T, Nakamura A, Mori F, Kakita A, Wakabayashi K, & Takahashi H (2008) Axonal alpha-synuclein aggregates herald centripetal degeneration of cardiac sympathetic nerve in Parkinson's disease. *Brain*, **131**, 642-650.
- [15] Ansari KA, & Johnson A (1975) Olfactory function in patients with Parkinson's disease. *J Chronic Dis*, **28**, 493-497.
- [16] Doty RL, Deems DA, & Stellar S (1988) Olfactory dysfunction in parkinsonism: A general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration. *Neurology*, **38**, 1237-1244.
- [17] Muller A, Reichmann H, Livermore A, & Hummel T (2002) Olfactory function in idiopathic Parkinson's disease (IPD): Results from cross-sectional studies in IPD patients and long-term follow-up of de-novo IPD patients. *J Neural Transm*, **109**, 805-811.
- [18] Boesveldt S, Verbaan D, Knol DL, Visser M, van Rooden SM, van Hilten JJ, & Berendse HW (2008) A comparative study of odor identification and odor discrimination deficits in Parkinson's disease. *Mov Disord*, **23**, 1984-1990.
- [19] Doty RL, Stern MB, Pfeiffer C, Gollomp SM, & Hurtig HI (1992) Bilateral olfactory dysfunction in early stage treated and untreated idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **55**, 138-142.
- [20] Ward CD, Hess WA, & Calne DB (1983) Olfactory impairment in Parkinson's disease. *Neurology*, **33**, 943-946.
- [21] Lee PH, Yeo SH, Kim HJ, & Youm HY (2006) Correlation between cardiac 123I-MIBG and odor identification in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Mov Disord*, **21**, 1975-1977.
- [22] Goldstein DS, Sewell L, & Holmes C (2010) Association of anosmia with autonomic failure in Parkinson disease. *Neurology*, **74**, 245-251.
- [23] Benarroch EE (2007) Enteric nervous system: Functional organization and neurologic implications. *Neurology*, **69**, 1953-1957.
- [24] Schemann M, & Neunlist M (2004) The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil*, **16**(Suppl 1), 55-59.
- [25] Beach TG, White CL, 3rd, Hladik CL, Sabbagh MN, Connor DJ, Shill HA, Sue LI, Sasse J, Bachalakuri J, Henry-Watson J, Akiyama H, & Adler CH (2009) Olfactory bulb alpha-synucleinopathy has high specificity and sensitivity for Lewy body disorders. *Acta Neuropathol*, **117**, 169-174.

- [26] Parkkinen L, Silveira-Moriyama L, Holton JL, Lees AJ, & Revesz T (2009) Can olfactory bulb biopsy be justified for the diagnosis of Parkinson's disease? Comments on "olfactory bulb alpha-synucleinopathy has high specificity and sensitivity for Lewy body disorders". *Acta Neuropathol*, **117**, 213-214; author reply 217-218.
- [27] Witt M, Bormann K, Gudziol V, Pehlke K, Barth K, Minovi A, Hahner A, Reichmann H, & Hummel T (2009) Biopsies of olfactory epithelium in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord*, **24**, 906-914.
- [28] Shannon KM, Keshavarzian A, Mutlu E, Dodiya HB, Daian D, Jaglin JA, & Kordower JH (2011) Alpha-synuclein in colonic submucosa in early untreated Parkinson's disease. *Mov Disord*.
- [29] Derkinderen P, Rouaud T, Lebouvier T, Bruley des Varannes S, Neunlist M, & De Giorgio R (2011) Parkinson disease: The enteric nervous system spills its guts. *Neurology*, **77**, 1761-1767.
- [30] Doty RL (2007) Olfaction in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, **13**(Suppl 3), S225-S228.

4.3 Perspectives d'amélioration du biomarqueur

Nous avons établi que les biopsies coliques contiennent des prolongements de Lewy chez plus de 7 patients sur 10. Il existe deux freins principaux à l'utilisation large des biopsies coliques en pratique clinique quotidienne: la lourdeur de l'examen, d'une part, qui dans le cas d'une coloscopie totale nécessite une fastidieuse préparation colique et dans la plupart des cas une anesthésie générale; la sensibilité imparfaite de la méthode, qui laisse 28% de « faux négatifs » – si l'on prend comme référence les meilleures séries autopsiques démontrant l'atteinte presque systématique du SNE pris dans son ensemble.

Dans le prolongement des études précédentes, une partie du travail de maîtrise de Hélène Pouclet a été consacré à la simplification et à l'amélioration de la sensibilité de notre méthode.

4.3.1 Valeur des biopsies rectales

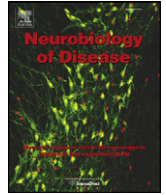
L'intérêt de cette étude réside dans la simplicité d'obtention des biopsies rectales. Ces biopsies peuvent être réalisées en ambulatoire, de façon rapide, sans nécessiter de préparation colique.

Ce travail a été effectué sur 26 patients et 9 témoins issus de la cohorte principale ([article 3](#)). Deux biopsies rectales ont été analysées pour chaque patient. Seuls 23% des patients (6/26) avaient une biopsie positive. Dans aucun cas la biopsie rectale n'a « redressé le diagnostic ».

Dans la perspective de développer un biomarqueur de la MP, les biopsies rectales ne semblent pas pouvoir se substituer aux biopsies coliques. Une augmentation du nombre de biopsie pourrait peut-être améliorer leur sensibilité, mais le gradient oro-anal de la pathologie de Lewy décrit dans les études autopsiques [141, 147] font douter de la pertinence de cette approche. L'alternative à mi-chemin entre coloscopie et rectoscopie est celle de la rectosigmoïdoscopie, qui permet l'obtention de biopsies du côlon terminal au cours d'un examen également ambulatoire, requérant une préparation par lavement.

Article 5 : A comparison between rectal and colonic biopsies to detect Lewy pathology in Parkinson's disease

Pouclet H, [Lebouvier T](#), Coron E, Bruley des Varannes S, Rouaud T, Roy M, Neunlist M, Derkinderen P. *A comparison between rectal and colonic biopsies to detect Lewy pathology in Parkinson's disease*. Neurobiology of Disease. *In press*.



A comparison between rectal and colonic biopsies to detect Lewy pathology in Parkinson's disease

Hélène Pouclet^{a,b,c,d}, Thibaud Lebouvier^{a,b,c,d}, Emmanuel Coron^{a,b,c,e}, Stanislas Bruley des Varannes^{a,b,c,e}, Tiphaine Rouaud^{b,c,d}, Monica Roy^b, Michel Neunlist^{a,c,e}, Pascal Derkinderen^{a,b,c,d,e,*}

^a Inserm, U913, Nantes, F-44093, France

^b Inserm, CIC-04, Nantes, F-44093, France

^c University Nantes, Nantes, F-44093, France

^d CHU Nantes, Department of Neurology, Nantes, F-44093, France

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 July 2011

Revised 5 August 2011

Accepted 15 August 2011

Available online 22 August 2011

Keywords:

Parkinson's disease

Enteric nervous system

Lewy neurites

Alpha-synuclein

Colonoscopy

Rectosigmoidoscopy

Routine biopsy

ABSTRACT

We have shown that routine biopsies of the ascending colon obtained at colonoscopy allow the detection of Lewy neurites (LN) in the enteric nervous system (ENS) of Parkinson's disease (PD) patients. Although colonoscopy is a relatively safe procedure, it requires colon preparation and anesthesia. The present study was therefore undertaken to evaluate whether descending colon and rectal biopsies that are obtainable by rectosigmoidoscopy allow the detection of Lewy pathology in the ENS. A total of 9 controls and 26 PD patients were included and analyzed. Two biopsies were taken from the ascending, descending colon and rectum during the course of a total colonoscopy. Immunohistochemical analysis was performed using antibodies against phosphorylated alpha-synuclein to detect LN and neurofilaments 200 kDa to label the neuronal structures. Biopsies from ascending, descending colon and rectum were morphologically comparable. LN were detected in the biopsies of ascending colon in 17 PD patients (65%), of descending colon in 11 patients (42%) and of rectum in only 6 patients (23%). No LN were seen in control biopsies. Our results show that Lewy pathology follows a rostrocaudal distribution in the colon and rectum of PD patients. Therefore, rectal biopsies have substantially lower sensitivity than ascending colon biopsies to detect Lewy pathology in the gut.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

From a pathological point of view, Parkinson's disease (PD) is classically characterized by a loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra along with the presence of intraneuronal inclusions termed Lewy bodies and Lewy neurites (LN), whose main component is phosphorylated alpha-synuclein (Dickson et al., 2009). Nevertheless, it has become increasingly evident that the distribution of Lewy bodies and LN is much greater than formerly appreciated. Lewy pathology extends to peripheral nervous systems such as the enteric nervous system (ENS) (Beach et al., 2009). In the ENS, the presence of Lewy pathology has been demonstrated from the upper esophagus to the rectum, affecting both the submucosal and myenteric plexus (Beach et al., 2009; Braak et al., 2006; Wakabayashi et al., 1988). Two reports, including one recent comprehensive autopsy survey have shown that the distribution of pathology follows a rostrocaudal gradient, with the lower esophagus having the greatest involvement and

the colon and rectum the lowest (Beach et al., 2009; Wakabayashi et al., 1988). Still, no study has specifically compared the amount of Lewy pathology between ascending colon, descending colon and rectum.

One of the relevant features of the ENS is its accessibility to biopsies, making it a putative source of biomarkers for PD (Lebouvier et al., 2010c). We have indeed shown that a morphological analysis of the submucosal plexus (SMP) can be achieved using routine colonic biopsies thereby allowing identification of LN in PD patients (Lebouvier et al., 2008; Lebouvier et al., 2010a). This methodological approach has been originally designed with biopsies from the ascending colon obtained during a colonoscopy (Lebouvier et al., 2008). Although colonoscopy is a relatively safe diagnostic procedure, serious adverse event such as perforation occur in about 1:1000 patients (Dafnis et al., 2001). This, along with the necessity of anesthesia and colon preparation, makes it unlikely that colonoscopy will be used in large scale for the detection of PD pathology. There is therefore a need for an alternative technique to access to the SMP in living PD patients.

Provided that the descending colon and rectum are affected by the pathological process in PD, rectosigmoidoscopy could be used as a surrogate to colonoscopy to retrieve Lewy pathology in the ENS. In this context, we took advantage of the colonoscopy performed in

* Corresponding author at: Inserm U913, 1 place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes, France. Fax: +33 240087506.

E-mail address: derkinderenp@yahoo.fr (P. Derkinderen).

Available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

our PD patients (Lebouvier et al., 2010b) to compare the pathology burden of biopsies from the ascending colon to the pathology burden of biopsies from the descending colon and rectum.

Patients and methods

Subjects

Details of patient selection and study design have been published previously (Lebouvier et al., 2010b). Briefly, 30 PD patients aged 40–75 years divided into 3 groups according to disease duration were enrolled. Diagnosis was made according to the United Kingdom PD Survey Brain Bank (Hughes et al., 1992). To limit recruitment bias and in order to span the entire course of PD, 3 groups of patients divided according to disease duration were included (group 1: ≤ 6 years, group 2: 7–12 years and group 3: ≥ 13 years disease duration).

Healthy patients requiring a total colonoscopy for colorectal cancer screening were included as controls. None of the control subjects had a history of neurological or psychiatric diseases. All controls underwent a neurological examination to rule out PD symptoms and cognitive deficiency. Controls and PD patients with irritable bowel syndrome and/or anorectal dysfunction were excluded. The study protocol was approved by the local Committee on Ethics and Human Research and registered on ClinicalTrials.gov (identifier NCT00491062). Written informed consent was obtained from each patient and from each normal volunteer.

Colonoscopy biopsies

A total colonoscopy was performed according to the usual procedure of the Gastroenterology department of Nantes University Hospital. In both patients and controls, 2 biopsies were taken in the ascending colon and descending colon as well as in the rectum. Biopsies were performed using standard biopsy forceps without needles (FB210K, Olympus Co., Japan). Samples were immediately immersed in 4 °C saline solution and processed as described (Lebouvier et al., 2010a).

Immunohistochemistry

Submucosa samples were processed for whole-mount immunostaining as described previously (Lebouvier et al., 2010a; Lebouvier

et al., 2010b). The primary antibodies used were those directed against phosphorylated alpha-synuclein (1:5000, WAKO, Osaka, Japan) and neurofilament 200 kDa (NF, 1:250, Chemicon, USA). Suitable secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488, 594 and 647 were used (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Specimens of submucosa were viewed under a Zeiss Axiovert 200 M microscope fluorescence microscope. Each fragment of submucosa was entirely scanned using the MosaiX module of Axovision software (Zeiss, Göttingen, Germany). The generated image was used as a map to analyze the whole biopsy and to perform the neuronal count. Area of each specimen was calculated from the reconstructed image using ImageJ software (National Institute of Health, Bethesda, MD).

Neuronal cell counting and morphological assessment of biopsies

Neuronal counts were performed in one submucosa sample from the ascending, descending colon and rectum, respectively. We have shown in a previous study that NF immunostaining virtually labels all submucosal neurons, thus allowing the use of NF-immunostaining for neuronal count (Lebouvier et al., 2010b). NF-immunoreactive neurons were counted in all available ganglia of the sample using a Zeiss Axiovert 200 M (Zeiss, Thornwood, NY). The results were expressed as the average of the mean number of neurons per ganglion, neurons per mm² and ganglia per mm².

Statistical analysis

According to the normality of the distribution, differences between ascending colon, descending colon and rectal biopsies of control patients were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) or Kruskal–Wallis test.

Results

The clinical characteristics of the patients enrolled in the present study have been described previously (Lebouvier et al., 2010b). A total of 30 PD patients and 10 controls were recruited. Four patients were excluded: 3 because only one rectal biopsy was performed and one because of an error during the processing of its biopsies. One control was also excluded because only one rectal biopsy was available.

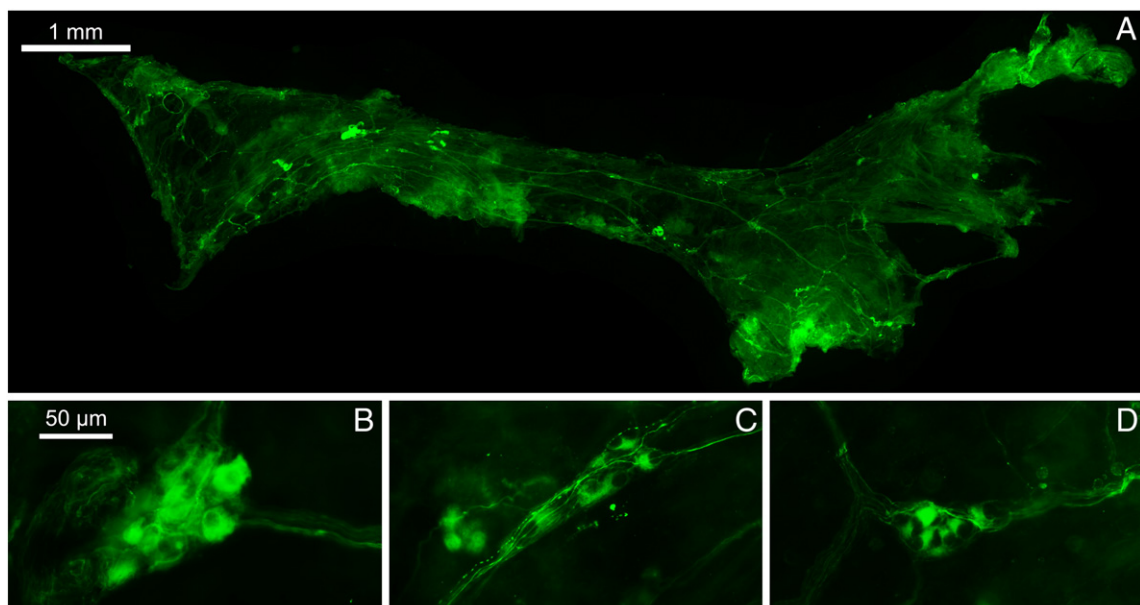


Fig. 1. Whole-mount of rectal SMP stained with an antibody against neurofilament 200 (NF). This technique allows performing neuronal and ganglion counts and measuring the area of the fragment (A). In controls, the morphology of the ganglia is the same in ascending colon (B), descending colon (C) and rectum (D). Scale bar: 1 mm in A, 50 μ m in B, C and D.

Table 1

Characteristics of colonic and rectal biopsies from controls. One biopsy per site was stained with the antibody against NF200. The results are given as the mean number of neurons and ganglia per biopsy, the average mean number of neurons per ganglion, the mean area of biopsies and the mean density of neurons and ganglia. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. There is no statistically significant differences between the biopsy parameters from each site ($n=9$).

	Ascending colon	Descending colon	Rectum
Neurons	133 $\pm$ 48	105 $\pm$ 21	115 $\pm$ 29
Ganglions	25 $\pm$ 8	28 $\pm$ 5	32 $\pm$ 8
Neurons per ganglion	4.4 $\pm$ 1.5	3.6 $\pm$ 0.2	3.3 $\pm$ 0.3
Area (mm ²)	8.3 $\pm$ 1	7.9 $\pm$ 0.8	7.1 $\pm$ 1.5
Neuronal density (neurons/mm ²)	14.2 $\pm$ 3.7	13 $\pm$ 2.1	17.1 $\pm$ 5.1
Ganglion density (ganglions/mm ²)	2.8 $\pm$ 0.6	3.5 $\pm$ 0.5	4.75 $\pm$ 1.1

Rectal biopsies are comparable to biopsies from the ascending and descending colon

Before comparing colonic and rectal biopsies in pathological conditions, we first studied whether the submucosal whole-mount obtained from rectal biopsies in controls was morphologically comparable to colonic biopsies. This morphological analysis of the SMP was performed in one biopsy per site using NF immunostaining (Fig. 1). Surface, neuronal and ganglion densities of whole-mount of submucosa were not significantly different in rectal biopsies and in ascending and descending colon biopsies (Table 1 and Fig. 1). Altogether these results indicate that routine rectal biopsies provide submucosal whole-mounts with similar morphological features than the ones

obtained after microdissection of ascending and descending colon biopsies.

Lewy pathology follows a rostrocaudal distribution in the colon and rectum of PD patients

For each subject, the two biopsies performed on each site were stained with antibodies against phosphorylated alpha-synuclein and NF. A biopsy was considered positive when containing at least one LN immunoreactive for phosphorylated alpha-synuclein. A patient was noted positive when at least one biopsy displayed inclusion(s). Seventeen out of 26 PD patients (65%) were positive in the ascending colon, 11/26 (42%) in the descending colon while only 6/26 (23%) were positive when rectal biopsies were analyzed (Fig. 2). Patients with positive rectal biopsies were equally distributed in each group (two patients in groups 1, 2 and 3 respectively). No immunoreactivity for phosphorylated alpha-synuclein was observed within enteric neurons in controls, apart from a mild somatic labeling that was present in both patients and controls (data not shown and Figs. 2A and B). Some phospho-alpha-synuclein inclusions were not immunoreactive for NF (arrowheads in Figs. 2C and D and Figs. 3A and D), possibly due to neuritic loss.

Among the 4 patients who had 2 out of their 2 biopsies positive in the ascending colon (three patients from group 1 and one patient from group 3), 4 (100%) had at least one positive biopsy in the descending colon and 3 (75%) at least one positive rectal biopsy (Table 2 and Fig. 3). Only one patient devoid of Lewy pathology in the ascending colon displayed lesions in the rectum. Taken as a whole, these results show that (i) Lewy pathology in the colonic and rectal SMP is distributed along a rostrocaudal gradient (ii) the

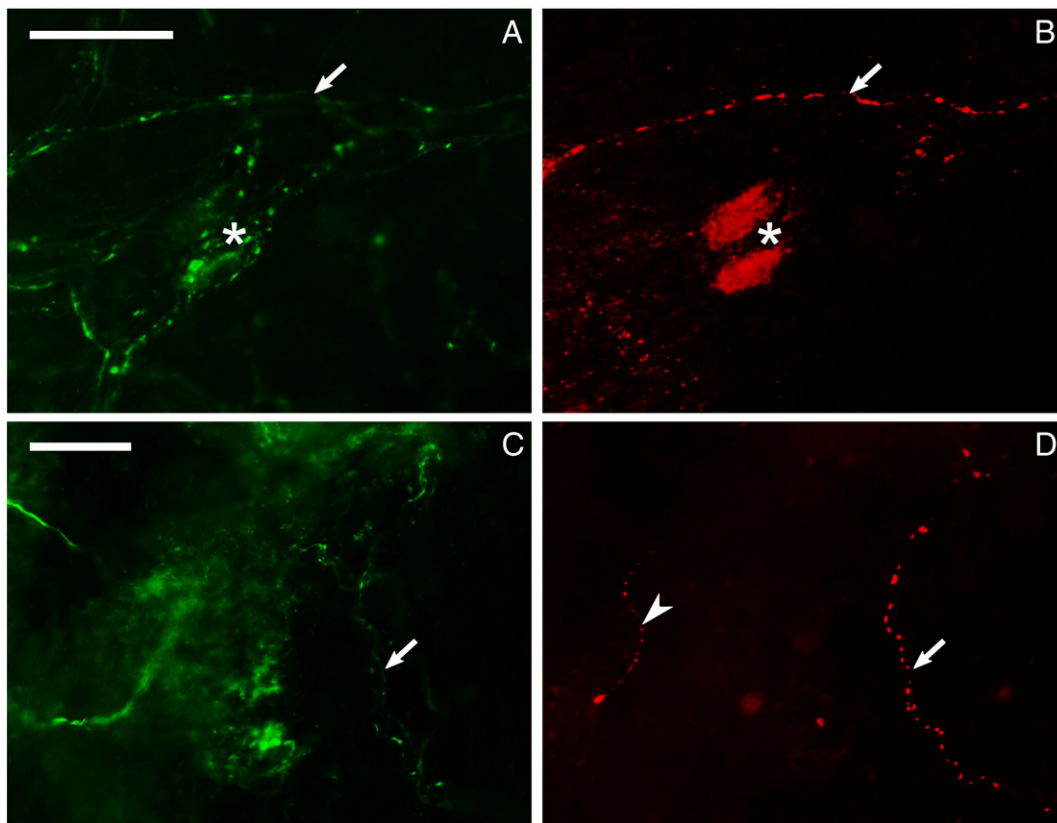


Fig. 2. Lewy neurites in the rectal SMP of PD patients. Labeling with antibodies against NF (A, C) and phosphorylated alpha-synuclein (B, D) reveals that most phospho-alpha-synuclein immunoreactive inclusions are also NF-immunoreactive (arrow). Occasionally some inclusions do not display NF-immunoreactivity, although they have the same aspect (arrowhead, D). The somatic staining (asterisk, A, B) is also present in controls, and thus not specific for PD. None of the controls display Lewy pathology. Scale bar: 50 μ m.

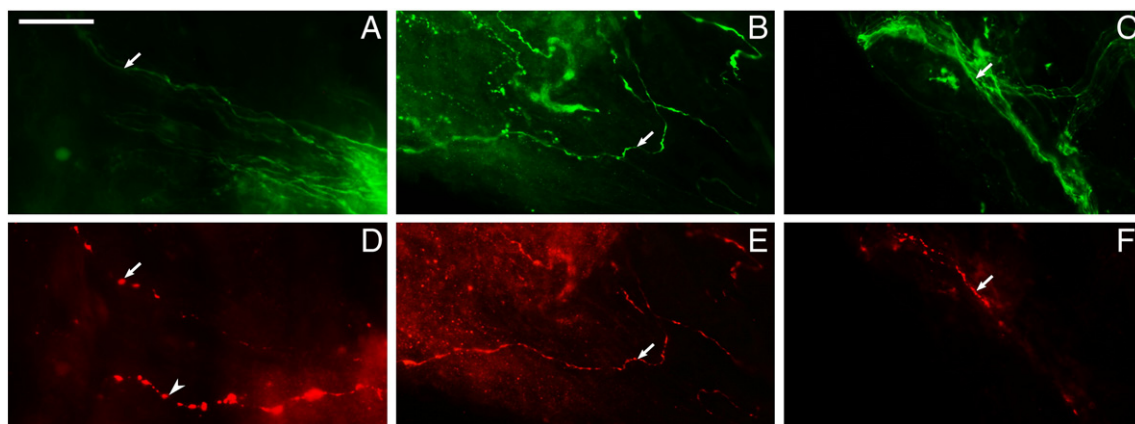


Fig. 3. Lewy neurites in the colonic and rectal SMP. One PD patient with a high Lewy pathology burden displayed Lewy neurites in the ascending (A) and descending colon (B) and rectal (C) submucosal plexus. Most phospho-alpha-synuclein-immunoreactive structures (arrows in D, E, F) are labeled with the NF antibody (arrows in A, B, C), but some of them are not (arrowhead in D). Scale bar: 50 μ m.

proportion of patients with Lewy pathology in the rectum does not increase with disease progression.

Discussion

The two main outcomes of the present research are: (i) the rostro-caudal distribution of Lewy pathology in lower digestive tract of PD patients and (ii) the low sensitivity of rectal biopsies to detect Lewy pathology in PD.

To the best of our knowledge, our study is the first to specifically address and compare the frequency of Lewy pathology between the ascending colon, descending colon and rectum. Using microdissection of colonic and rectal biopsies, we have clearly demonstrated that the frequency of LN in the SMP of PD patients follows a rostrocaudal gradient. Our results are in accordance with previous surveys that demonstrated such a rostrocaudal distribution of Lewy pathology within the whole gastrointestinal tract, from the lower esophagus to the rectum (Beach et al., 2009; Wakabayashi et al., 1988). Wakabayashi et al. (1988) mapped the Lewy pathology in the ENS of 7 consecutive autopsies performed in PD patients using classical stains. They found Lewy bodies in the gut of all 7 subjects. The pathology was more heavily distributed to the lower esophagus than to the colon and rectum. This rostrocaudal distribution was further confirmed in a recent comprehensive autopsy survey in which phosphorylated alpha-synuclein staining was used (Beach et al., 2009). Again, the lower esophagus was the more frequently and severely affected, followed by the stomach, jejunum and ileon, then by colon and rectum. Compared to these two autopsy surveys, the main limitation of our method is the inability to access to the myenteric plexus, which also bears Lewy pathology (Lebouvier et al., 2010a). Nevertheless, lesions in both the myenteric plexus and the SMP have

been demonstrated in PD, and though being less abundant, lesions in the SMP roughly mirror the presence of myenteric pathology (Beach et al., 2009; Kupsky et al., 1987; Wakabayashi et al., 1988). This suggests that the analysis of the sole SMP, as performed in our study is relevant to assess enteric pathology in PD.

It is tempting to postulate that the rostrocaudal gradient we have observed is due to the known distribution of vagal innervation. Indeed, the ascending colon is constantly innervated by vagal efferents while the vagal innervation of descending colon and rectum are in-constant and absent, respectively (Christensen et al., 1984; Hopkins et al., 1996). If so, this suggests that Lewy pathology within vagal efferents would predominate over alpha-synuclein pathology from the sympathetic projections or from enteric neurons. However, others and we have shown that the Lewy pathology in the ENS also occurs in extrinsic sympathetic neurons as well as in intrinsic enteric neurons (Braak et al., 2006; Kupsky et al., 1987; Lebouvier et al., 2010b; Wakabayashi et al., 1988). It is thus likely that both extrinsic and intrinsic innervations of the gut display a rostrocaudal sensitivity to Lewy pathology.

The present results have practical consequences in the growing field of biomarkers for PD. Currently, diagnosis and evolution of PD relies mainly on clinical criteria. Therefore, efforts are made to identify biomarkers, that may be helpful for the early and accurate diagnosis of the disease and to monitor its progression (Marek et al., 2008). The presence of Lewy pathology in peripheral neural tissues that are accessible to biopsies has provided new opportunities to develop biomarkers of the disease (Lebouvier et al., 2010c). In this context, the ENS is not the only peripheral neuronal network affected by Lewy pathology that is accessible to biopsies (Lebouvier et al., 2010c). For instance, autopsy studies have revealed that alpha-synuclein is deposited in peripheral autonomic nervous systems that innervate the skin and the submandibular glands (Beach et al., 2009; Del Tredici et al., 2009; Ikemura et al., 2008). This prompted a Japanese team to investigate whether Lewy pathology could be retrieved in living patients using routine skin biopsies. The results were nevertheless disappointing, since only 2 out of 20 PD patients displayed Lewy pathology in their skin biopsies (Miki et al., 2009). Regarding salivary glands, two autopsy studies have demonstrated Lewy pathology in the submandibular glands in almost all patients examined (Beach et al., 2009; Del Tredici et al., 2009). The submandibular gland can only be accessed through incisional biopsy in living patients, a procedure that cannot be used routinely. A recent preliminary report has shown that minor salivary glands may also display Lewy pathology, suggesting that analysis of labial salivary glands could be used as a histopathological marker of PD (Cersosimo et al., 2011). In contrast to skin and salivary glands biopsies which only contain postganglionic neuronal processes, we have shown that colonic

Table 2

Comparison between Lewy pathology in ascending colon, descending colon and rectum. Patients were divided according to the frequency of Lewy pathology in their ascending biopsy (2 out of 2 positive biopsies, 1/2 or 0/2). The presence of at least one positive biopsy in the descending colon or in the rectum was assessed in each subset of patients.

	At least one + biopsy in descending colon	At least one + biopsy in rectum
2/2 positive biopsies in ascending colon (n = 4)	4 (100%)	3 (75%)
1/2 positive biopsies in ascending colon (n = 13)	5 (38.5%)	2 (15.4%)
0/2 positive biopsies in ascending colon (n = 9)	2 (22.2%)	1 (11.1%)

biopsies allow a morphological and quantitative analysis of an integrated neuronal network (Lebouvier et al., 2010a), making the ENS a prime candidate tissue for examining peripheral histopathological markers of PD. This methodological approach has been originally designed and validated with biopsies from the ascending colon obtained during a colonoscopy (Lebouvier et al., 2008). Although colonoscopy is a relatively safe diagnostic procedure, it has several shortcomings precluding its use for the detection of Lewy pathology in large scale. Serious adverse events, such as perforation, occur in about 1:1000 patients (Dafnis et al., 2001) and it requires colon preparation and anesthesia. One of the aims of the present study was therefore to determine whether rectal biopsies, which can be quickly obtained by rectosigmoidoscopy, could be used to detect LN in the ENS. Rectal biopsies were morphologically comparable to colonic biopsies, especially in term of neuronal and ganglion densities. However, their low sensitivity to detect Lewy pathology when compared to ascending colon biopsies precludes their usefulness for premortem diagnosis of PD.

In conclusion, Lewy pathology in the SMP of PD patients is distributed along a rostrocaudal gradient from the ascending colon to the rectum. This has a practical impact, as rectal biopsies have a low sensitivity to detect Lewy pathology in PD.

Acknowledgments

This work was supported by a biomarker grant from the Michael J Fox Foundation for Parkinson's disease and by a grant from Nantes University Hospital (Direction de la Recherche Clinique). Work in Michel Neunlist's lab is supported by France Parkinson, FFPG (Fédération française des groupements parkinsoniens) and Parkinsoniens de Vendée.

References

- Beach, T.G., et al., 2009. Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol.* 119, 689–702.
- Braak, H., et al., 2006. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci. Lett.* 396, 67–72.
- Cersosimo, M.G., et al., 2011. Alpha-synuclein immunoreactivity in minor salivary gland biopsies of Parkinson's disease patients. *Mov. Disord.* 26, 188–190.
- Christensen, J., et al., 1984. Comparative anatomy of the myenteric plexus of the distal colon in eight mammals. *Gastroenterology* 86, 706–713.
- Dafnis, G., et al., 2001. Complications of diagnostic and therapeutic colonoscopy within a defined population in Sweden. *Gastrointest. Endosc.* 54, 302–309.
- Del Tredici, K., et al., 2009. Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 119, 703–713.
- Dickson, D.W., et al., 2009. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet Neurol.* 8, 1150–1157.
- Hopkins, D.A., et al., 1996. Vagal efferent projections: viscerotopy, neurochemistry and effects of vagotomy. *Prog. Brain Res.* 107, 79–96.
- Hughes, A.J., et al., 1992. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 55, 181–184.
- Ikemura, M., et al., 2008. Lewy body pathology involves cutaneous nerves. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67, 945–953.
- Kupsky, W.J., et al., 1987. Parkinson's disease and megacolon: concentric hyaline inclusions (Lewy bodies) in enteric ganglion cells. *Neurology* 37, 1253–1255.
- Lebouvier, T., et al., 2008. Pathological lesions in colonic biopsies during Parkinson's disease. *Gut* 57, 1741–1743.
- Lebouvier, T., et al., 2010a. Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients. *Neurogastroenterol. Motil.* 22, e11–e14.
- Lebouvier, T., et al., 2010b. Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PLoS One* 5, e12728.
- Lebouvier, T., et al., 2010c. Biopsable neural tissues: toward new biomarkers for Parkinson's disease? *Front Psychiatry.* 1, 128.
- Marek, K., et al., 2008. Biomarkers for Parkinson's [corrected] disease: tools to assess Parkinson's disease onset and progression. *Ann. Neurol.* 64 (Suppl 2), S111–S121.
- Miki, Y., et al., 2009. Clinical availability of skin biopsy in the diagnosis of Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 469, 357–359.
- Wakabayashi, K., et al., 1988. Parkinson's disease: the presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses. *Acta Neuropathol.* 76, 217–221.

4.3.2 Comparaison systématique entre l'analyse de la muqueuse et l'analyse de la sous-muqueuse pour la mise en évidence des inclusions de Lewy

Notre travail initial s'est focalisé sur la sous-muqueuse, où le tissu nerveux est le plus dense, et a totalement négligé le fragment de muqueuse qu'on écarte lors de la microdissection. Or ce fragment peut contenir les terminaisons des neurones postganglionnaires au niveau de la lamina propria.

Ce travail a été réalisé sur 9 patients parkinsoniens chez lesquels 4 biopsies coliques obtenues par rectosigmoïdoscopie ont été analysées. La recherche de prolongements de Lewy par immunomarquage de l' α -synucléine phosphorylée a été effectuée sur la muqueuse et sur la sous-muqueuse.

Des prolongements de Lewy étaient retrouvés chez 4 patients sur 9 au niveau de la sous-muqueuse et 3 patients sur 9 au niveau de la muqueuse. L'un de ces 3 patients était dénué d'inclusions sous-muqueuses, ce qui a porté la sensibilité globale de la méthode à 5/9. L'aspect des prolongements muqueux et sous-muqueuse est similaire, mais la co-expression de NF moins fréquente dans la muqueuse.

Article 6 : A comparison between colonic submucosa and mucosa to detect Lewy pathology in Parkinson's disease

Pouclet H, Lebouvier T, Coron E, Bruley des Varannes S, Neunlist M, Derkinderen P. *A comparison between colonic submucosa and mucosa to detect Lewy pathology in Parkinson's disease*. Neurogastroenterology and Motility. *In press*.

A comparison between colonic submucosa and mucosa to detect Lewy pathology in Parkinson's disease

Hélène Pouclet^{a, b, c, d}, Thibaud Lebouvier^{a, b, c, d}, Emmanuel Corona^{a, b, c, e}, Stanislas Bruley des Varannes^{a, b, c, e}, Michel Neunlist^{a, c, e} and Pascal Derkinderen^{a, b, c, d, e}

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

^bInserm, CIC-04, Nantes, F-44093, France

^cNantes University, Nantes, F-44093, France

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

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

Corresponding author:

Pascal Derkinderen, Inserm U913, 1 place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes, France. Tel: 0033(0)240087924; Fax: 0033(0)240087506; E-mail: derkinderenp@yahoo.fr; pascal.derkinderen@chu-nantes.fr

Running title: Colonic mucosa in Parkinson's disease

Abstract

Background

Lewy bodies and neurites (LN), the two pathological hallmarks of Parkinson's disease (PD), are found in the enteric nervous system (ENS). We have previously shown that whole-mounts of submucosa obtained after microdissection of colonic biopsies can be used for the detection of LN in the submucosal plexus (SMP) of PD patients. Recent reports suggest that Lewy pathology may extend beyond the submucosa to involve the digestive mucosa. The aim of the present research was to determine whether the analysis of the mucosa obtained after microdissection may help improve the sensitivity of colonic biopsies to detect Lewy pathology in the colon of PD patients.

Methods

Nine PD patients were included. Four biopsies were taken from the descending colon during the course of a rectosigmoidoscopy. Biopsies were microdissected, the mucosa was separated from the submucosa and both structures were analyzed by immunohistochemistry. Immunohistochemical analysis was performed using antibodies against phosphorylated alpha-synuclein to detect LN and neurofilaments NF 200 kDa to label the neuronal structures.

Key Results

The colonic SMP and mucosa were analyzed and compared in 9 PD patients. LN were present in the SMP of 4 patients and in the mucosa of 3 patients. Remarkably, among the patients who displayed LN within their mucosa, one was devoid of Lewy pathology in his SMP.

Conclusions & Inferences

The parallel analysis of colonic mucosa, along with the SMP, can help detect Lewy pathology in PD.

Keywords

Parkinson's disease; colon; biopsies, submucosal plexus; mucosa; biomarker

Introduction

The degenerative process in Parkinson's disease (PD) is characterized by the development of specific intraneuronal inclusions termed Lewy neurites (LN) in dendrites and axons and Lewy bodies in the somata (1). The main component of Lewy bodies and LN is aggregated and phosphorylated alpha-synuclein (2). It has now been clearly established that Lewy pathology affects the enteric nervous system (ENS) (3-5). Lewy pathology has indeed been described in both the myenteric and submucosal plexus (SMP) in a large proportion of PD patients (3). Combining routine colonic biopsies and microdissection techniques (6), we have shown that whole-mounts of submucosa can be used for a comprehensive assessment of the SMP thereby allowing identification of LN in 65% of PD patients when biopsies of ascending colon were analysed and in 42% when biopsies of descending colon were performed (7). This led us to propose that the ENS is an original source of histopathological marker and a unique window to assess the neuropathology in living PD patients.

Comprehensive autopsy surveys performed by Braak and collaborators have shown that terminal ramifications of LN can, in some cases, cross the muscularis mucosa to reach the *lamina propria* and to ramify in the gastric glands (4, 8). This suggests that the analysis of the mucosa in parallel with the submucosa could increase the sensitivity of colonic biopsies for detecting Lewy pathology. In order to test this hypothesis, mucosa and submucosa of PD patients, microdissected from colonic biopsies, were analyzed and compared for the presence of Lewy pathology.

Patients and Methods

Subjects

Nine PD patients aged 40-75 years were enrolled. Diagnosis was made according to the United Kingdom PD Survey Brain Bank (9). The study protocol was approved by the local Committee on Ethics and Human Research and registered on ClinicalTrials.gov (identifier NCT00491062). Written informed consent was obtained from each patient.

Rectosigmoidoscopy biopsies

A rectosigmoidoscopy was performed according to the usual procedure of the Gastroenterology department of Nantes University Hospital. Four biopsies were taken in the descending colon. Biopsies were performed using standard biopsy forceps without needles (FB210K, Olympus co., Japan). Samples were immediately immersed in 4°C saline solution and microdissected.

Microdissection and immunohistochemistry

Microdissection was performed as previously described (6). Briefly, biopsies were transferred in a Sylgard-coated Petri dish filled with 4°C Hank's Buffered Salt Solution then stretched and pinned flat under a stereomicroscope with the mucosa oriented on the bottom of the dish. The submucosa was then mechanically separated from the mucosa with watchmaker's forceps. Both submucosa and mucosa were fixed in phosphate buffered saline (PBS) with 4% paraformaldehyde for 3h at room temperature or overnight at 4°C. After fixation, the samples were rinsed 3 times for 10 min with PBS and kept at 4°C in PBS with 1% sodium azide (PBS/NaN₃) until further use.

Each whole-mount preparation of mucosa and submucosa obtained from a single biopsy were permeabilised for 3 hours in PBS/ NaN_3 containing 1% Triton X-100 and 10% horse serum, and then incubated with the antibodies against phosphorylated alpha-synuclein (1:5000, WAKO, Osaka, Japan) and neurofilament 200 kDa (NF, 1:500, Chemicon, USA). Suitable secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488, 594 and 647 were used (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Specimens of submucosa and mucosa were viewed under a Zeiss Axiovert 200M microscope fluorescence microscope.

Results

Table 1 shows the main clinical features and pathological scores of all patients. For each subject, the four biopsies performed were stained with antibodies against phosphorylated alpha-synuclein and NF. A sample, either submucosa or mucosa, was considered positive when containing at least one LN immunoreactive for phosphorylated alpha-synuclein. Four out of 9 PD patients had at least one positive biopsy when the SMP was analysed (**Table 1 and Figure 1 A, B**) while 3 patients had at least one positive biopsy when the mucosa was screened for Lewy pathology (**Table 1 and Figure 1 C, D**). Among the three patients with a positive biopsy in the mucosa, one did not display alpha-synuclein immunoreactive lesions in the SMP (**Table 1**). Morphological features of phospho-alpha-synuclein immunoreactive neurites were similar between mucosa and submucosa, with a dot-like aspect (**Figure 1 B, D**).

Discussion

Using routine colonic biopsies and microdissection techniques, our study demonstrates that the mucosa should be analyzed along with the submucosa to detect Lewy pathology in living PD patients. Four out of 9 PD patients displayed LN within their descending colon SMP, a proportion comparable to that of our previous studies (7, 10). The parallel analysis of the corresponding mucosa enabled to detect LN in 3 patients. Remarkably, one patient displayed LN in 3 out of 4 mucosa samples while his submucosa was devoid of pathology.

First, our results have implications regarding the pathophysiology of PD. The dendrites and axons found in the mucosa, which regulates secretion and microvasculature, originate primarily from the SMP and to a much lower extent from the myenteric plexus (11-13). The presence of widespread Lewy pathology in the mucosa along with absence or rarity of LN in the SMP in two patients (patients 1 and 6) suggests that in some cases, alpha-synuclein aggregates occur primarily in the most distal part of the neurites. This is consistent with a recent thorough autopsy survey in which accumulation of alpha-synuclein in the distal axons of the cardiac sympathetic nervous system was more severe and antedated that of neuronal somata or neurites in the paravertebral sympathetic ganglia (14). As a whole, this suggests that neurodegeneration of the autonomic nervous system and of the ENS could follow a centripetal pattern. In keeping with such, Braak has proposed that submucosal neurons that send an axon to the mucosa, which lie in close proximity of the gut lumen, could be one of the very first neuronal structure affected by Lewy pathology in the course of PD (15). In this scenario, a hitherto unidentified neurotropic pathogen would cross the mucosal epithelial barrier to reach the underlying mucosal neurites whose cell bodies are located in the SMP (16).

Second, our results have direct consequences on the use of colonic biopsies as a source of biomarker for PD (17, 18). We have set up a microdissection technique that allows a comprehensive morphological analysis of the SMP and an accurate appraisal of Lewy pathology (6). Using this approach, LN were found in 65% of patients when submucosa of ascending colonic biopsies were analysed, dwindling to 42% and 23% for biopsies of the descending colon and rectum respectively (7). As rectosigmoidoscopy is a safer and easier procedure than colonoscopy, we undertook the present study to determine whether LN can be also retrieved from mucosa in order to improve the sensitivity of descending colonic biopsies as a histopathological marker of PD. In one patient out of 9 (patient 1), the appraisal of the mucosa allowed to rectify the pathological diagnosis. This suggests that the analysis of the mucosa may be warranted when the assessment of the sole SMP does not show obviously detectable Lewy pathology.

Acknowledgments and Disclosures

This work was supported by a biomarker grant from the Michael J Fox Foundation for Parkinson's research (to MN and PD) and by a grant from Nantes University Hospital (Direction de la Recherche Clinique, to PD). Work in Michel Neunlist's lab is supported by France Parkinson, FFPG (Fédération française des groupements de parkinsoniens) and Parkinsoniens de Vendée. We are indebted to Philippe Hulin and the Cellular and Tissular Imaging Core Facility of Nantes University (MicroPICell) for the microscopy study.

HP, TL, MN and PD designed the research study, performed the research and analyzed the data ; EC and SBV performed the rectosigmoidoscopy and helped in analyzing the data ; HP and PD wrote the manuscript

Competing Interests: the authors have no competing interests

Table

Patient	Age/Sex	DD	SMP	Mucosa
1	56/F	13	0	3
2	64/F	15	0	0
3	67/M	10	1	0
4	55/F	4	0	0
5	71/M	4	1	0
6	67/M	11	1	3
7	53/F	3	0	0
8	52/F	7	0	0
9	70/M	12	2	1

Legend to table

Main clinical characteristics and immunohistochemical findings in patients. DD: disease duration; SMP: number of positive (containing at least one LN) samples out of 4 in the submucosal plexus; mucosa: number of positive (containing at least one LN) samples out of 4 in the mucosa.

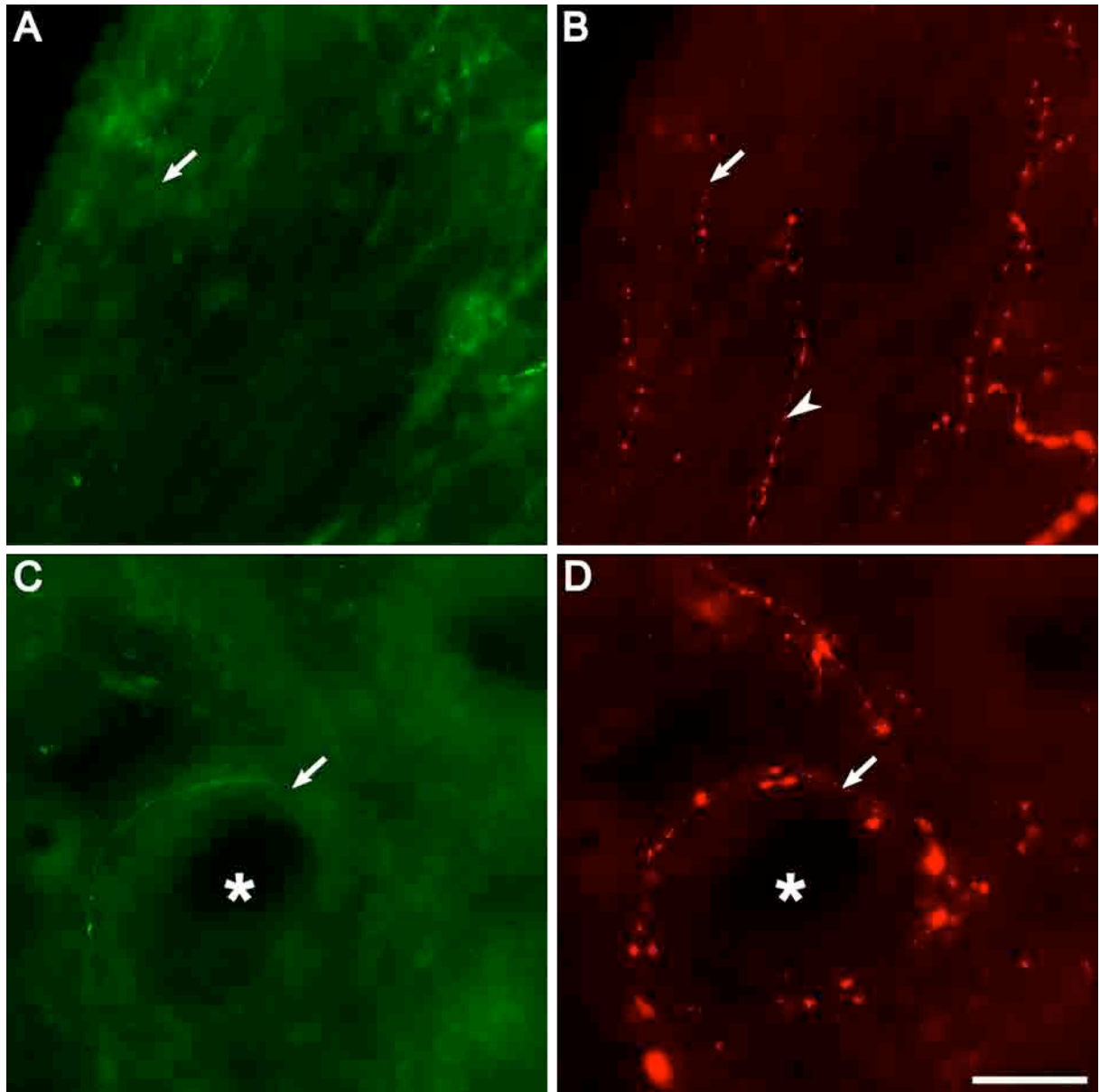
Legend to figure

Lewy neurites in the submucosal plexus (A,B) and in the mucosa (C,D) of two PD patients. Labeling with antibodies against phosphorylated alpha-synuclein (B,D) reveals the presence of dot-like pathological inclusions in the submucosal plexus (B, arrow and arrowhead) and in the mucosa (D, arrow), where they encircle a colonic crypt (asterisk in C and D). Most of these structures are immunoreactive for the neuronal marker neurofilament 200kD (arrows in A and C). Some inclusions do not display NF-immunoreactivity, although their morphology is highly suggestive of LN (B, arrowhead). Scale bar: 40 μ m.

References

1. Dickson DW, Braak H, Duda JE, *et al.* Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet neurology* 2009; 8: 1150-1157.
2. Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, *et al.* alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 2002; 4: 160-164.
3. Beach TG, Adler CH, Sue LI, *et al.* Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta neuropathologica* 2009; 119: 689-702.
4. Braak H, de Vos RA, Bohl J, Del Tredici K. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neuroscience letters* 2006; 396: 67-72.
5. Wakabayashi K, Takahashi H, Takeda S, Ohama E, Ikuta F. Parkinson's disease: the presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses. *Acta neuropathologica* 1988; 76: 217-221.
6. Lebourvier T, Coron E, Chaumette T, *et al.* Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients. *Neurogastroenterol Motil* 2010; 22: e11-14.
7. Pouclet H, Lebourvier T, Coron E, *et al.* A comparison between rectal and colonic biopsies to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neurobiology of disease* 2011.
8. Braak H, Del Tredici K. Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. *Neurology* 2008; 70: 1916-1925.
9. Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 1992; 55: 181-184.

10. Lebouvier T, Neunlist M, Bruley des Varannes S, *et al.* Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PloS one* 2010; 5: e12728.
11. Neunlist M, Dobрева G, Schemann M. Characteristics of mucosally projecting myenteric neurones in the guinea-pig proximal colon. *The Journal of physiology* 1999; 517 (Pt 2): 533-546.
12. Neunlist M, Schemann M. Projections and neurochemical coding of myenteric neurons innervating the mucosa of the guinea pig proximal colon. *Cell Tissue Res* 1997; 287: 119-125.
13. Neunlist M, Schemann M. Polarised innervation pattern of the mucosa of the guinea pig distal colon. *Neuroscience letters* 1998; 246: 161-164.
14. Orimo S, Uchihara T, Nakamura A, *et al.* Axonal alpha-synuclein aggregates herald centripetal degeneration of cardiac sympathetic nerve in Parkinson's disease. *Brain* 2008; 131: 642-650.
15. Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathology and applied neurobiology* 2007; 33: 599-614.
16. Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H. A timeline for Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* 2009; 16: 79-84.
17. Lebouvier T, Tasselli M, Paillusson S, Pouclet H, Neunlist M, Derkinderen P. Biopsable neural tissues: toward new biomarkers for Parkinson's disease? *Frontiers in psychiatry / Frontiers Research Foundation* 2010; 1: 128.
18. Shannon KM, Keshavarzian A, Mutlu E, *et al.* Alpha-synuclein in colonic submucosa in early untreated Parkinson's disease. *Mov Disord* 2011.



5 Le système nerveux entérique, une fenêtre sur le système nerveux central ?

*It is a maxim, that those to whom everybody allows the second place
have an undoubted title to the first*
Jonathan Swift, *Tale of a Tub*

Nos travaux montrent l'accessibilité de la composante sous-muqueuse du système nerveux entérique *in vivo* et suggèrent que le PSM se comporte dans la MP comme les structures végétatives et les noyaux pigmentés du tronc cérébral: atteint précocement, le PSM reproduit l'essentiel de la neuropathologie de la MP (inclusions de Lewy et perte neuronale) et la charge lésionnelle reflète la sévérité de la maladie plus fidèlement que sa durée d'évolution.

Les implications de ces résultats sont multiples. **Les perspectives diagnostiques** sont bien entendu les plus évidentes. Les progrès de la sémiologie clinique (notamment pour la reconnaissance des syndromes parkinsoniens atypiques) et de nouveaux outils paracliniques (qu'ils soient biologiques ou d'imagerie) ont cependant abouti à l'excellente fiabilité du diagnostic de MP dans les services spécialisés [107]. Il serait crédule d'affirmer qu'à la lumière de nos modestes travaux, le diagnostic de MP requerra dorénavant l'association d'un neurologue et d'un endoscopiste. Nous verrons cependant dans quels cas de figure ces biopsies pourraient avoir un intérêt comme **biomarqueur de la MP**.

Les perspectives pour la recherche sont certainement celles dont les applications sont les plus immédiates. Du fait de leur complexité, de leur archaïsme et de leurs manifestations cliniques moins spectaculaires, le SNE et le SNA restent en retrait de l'essor des neurosciences. Dans le cas particulier de la MP, si l'atteinte du SNE n'est sans doute pas le point de départ unique de la maladie, le SNE est pour autant l'une des premières structures atteintes et semble se comporter comme une structure du SNC. Son accessibilité jusqu'alors sous-estimée ouvre la voie à un vaste champ d'expérimentation sur du tissu humain viable et directement affecté par le processus dégénératif.

Enfin au-delà de la MP, nous éprouverons le paradigme résumé dans le titre de cette section : le SNE, notre « deuxième cerveau » selon Gershon, peut-il servir de fenêtre sur le premier ? Si l'idée est plaisante, nous verrons qu'outre la MP, en dehors de rares exceptions où le SNE reproduit en effet la pathologie centrale, elle n'est à l'heure actuelle que littérature.

5.1 Les biopsies digestives comme biomarqueur de la maladie de Parkinson

Un biomarqueur est un paramètre mesurable utilisé comme indicateur d'un processus biologique normal ou pathologique [247]. En cancérologie les biomarqueurs sont employés comme outil de diagnostic, de pronostic ou de surveillance d'une réponse thérapeutique. Un intérêt croissant leur est porté en pathologie neurodégénérative, essentiellement pour l'heure à visée diagnostique. Certains biomarqueurs sont déjà d'usage courant ou font leur apparition dans les critères diagnostiques consensuels : c'est le cas du dosage de la protéine 14-3-3 dans le liquide cébrospinal (LCS) dans les suspicions de maladies à prion [248], ou du dosage intrathécal du peptide A β ₄₂ et de la protéine tau totale et phosphorylée dans les troubles mnésiques suspects de maladie d'Alzheimer [249-252].

5.1.1 Pourquoi un biomarqueur de la maladie de Parkinson ?

Le diagnostic de MP repose essentiellement sur les critères cliniques d'un syndrome parkinsonien relativement pur et réactif à la lévodopa [107]. La prééminence du syndrome parkinsonien dans les critères actuels implique que la maladie ne soit diagnostiquée qu'à un stade relativement tardif, tant d'un point de vue neuropathologique [108] que chronologique [9, 161]. En outre, à l'apparition des signes moteurs, la MP peut être difficile à différencier de pathologies dégénératives telles que le tremblement essentiel, l'atrophie multi-systématisée et la paralysie supranucléaire progressive [107].

La stratégie thérapeutique actuelle de la MP vise à soulager les symptômes moteurs et non à modifier le cours évolutif de la maladie [253]. Le développement de traitements neuroprotecteurs est l'objectif principal de la recherche biomédicale sur les maladies neurodégénératives. Pour accompagner ce développement, **des marqueurs fiables de progression ou de sévérité de la MP sont indispensables**. A l'heure actuelle l'échelle UPDRS reste le critère d'évaluation principal des essais sur les traitements neuroprotecteurs [254, 255]. La plupart des traitements testés ayant également un effet symptomatique (en agissant sur la neurotransmission dopaminergique) [75], des schémas d'étude complexes sont nécessaires pour espérer entrevoir un effet neuroprotecteur.

Il existe donc un réel besoin de biomarqueurs pour le diagnostic positif de la MP, le plus précocement possible, mais également pour son suivi évolutif : ces deux outils seraient précieux pour les essais thérapeutiques de molécules neuroprotectrices, dont on souhaiterait qu'elles soient testées le plus précocement possible et évaluées selon des critères indiscutables de progression du processus dégénératif (figure 18).

Parmi les biomarqueurs de la MP actuellement en développement, l'échographie trans-crânienne [256], l'IRM à très haut champ magnétique [257] et le dosage des protéines impliquées dans le processus dégénératif [258], parmi lesquelles l' α -synucléine totale [259] ou oligomérique [260] sont autant de techniques prometteuses. Pour autant, aucun de ces biomarqueurs potentiels n'a été à ce jour validé [261], et aucun ne répond à l'ensemble des besoins. Les résultats du dosage de l' α -synucléine dans le liquide cébrospinal montrent par exemple un certain recouvrement avec les sujets atteints d'autres pathologies dégénératives [259]. La clef se trouve peut-être dans une combinaison de biomarqueurs [261].

Biomarkers in Parkinson's Disease: What For?

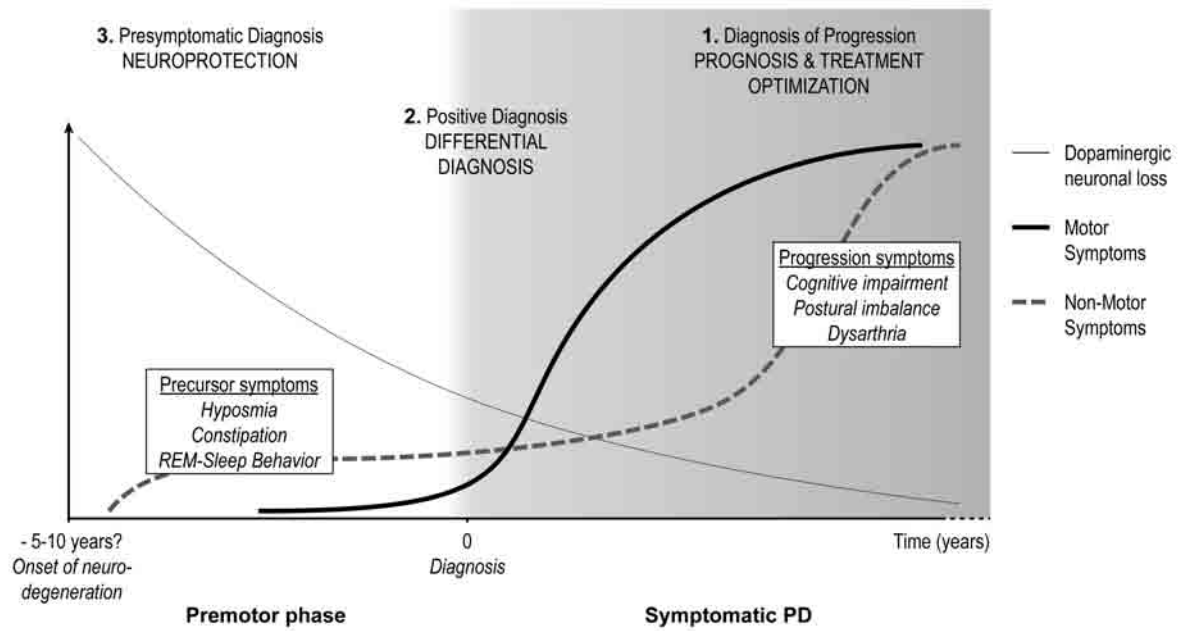


Figure 18. Biomarqueurs de la maladie de Parkinson : pour quoi faire ?

5.1.2 Biomarqueurs histologiques de la maladie de Parkinson

Dans cette quête de marqueurs de la maladie, la possibilité de visualiser directement le processus dégénératif par prélèvement de tissus atteints, de le quantifier et de comparer la charge lésionnelle à celle de prélèvements antérieurs, représenterait la situation idéale. La prise de conscience de l'existence d'une synucléinopathie diffuse et précoce dans la MP a suscité quelques études visant à la mettre en évidence dans des tissus accessibles à la biopsie.

Dans les suites des travaux de Braak pointant le bulbe olfactif et le noyau dorsal du nerf vague comme les sites d'initiation de la pathologie dans l'encéphale, une équipe a cherché des lésions de l'épithélium olfactif. Dans une étude pilote, 7 patients parkinsoniens hypo- ou anosmiques se sont soumis à des biopsies d'épithélium olfactif sans que ne soit retrouvée aucune lésion spécifique [262]. Pour cause, les études neuropathologiques montrent que la pathologie est restreinte au bulbe olfactif, une structure qui se situe hors d'atteinte des biopsies de routine [263].

Stimulée par l'étude autopsique montrant des inclusions de Lewy dans le derme profond chez 70% des patients parkinsoniens autopsiés [140], une équipe japonaise a recherché des inclusions au sein de biopsies cutanées réalisées dans la poitrine et les cuisses. Seuls 2 patients en présentaient parmi les 20 testés [264]. Cette discordance avec les résultats de l'étude autopsique s'explique essentiellement par la différence de taille et de profondeur des prélèvements, soulignant **le caractère épars de la pathologie de Lewy** dans le SNA.

Deux études autopsiques montrent l'atteinte presque systématique des glandes salivaires dans la MP [141, 265]. La glande sous-mandibulaire ne peut être biopsiée en routine que par cytoponction ; une analyse histologique ne peut être réalisée que sur biopsie chirurgicale, à laquelle est associé un risque non négligeable de lésion nerveuse (branche mandibulaire du nerf facial, nerfs hypoglosse et lingual). Les risques sont encore supérieurs avec la glande parotide au sein de laquelle se divise le nerf facial. **La biopsie des glandes salivaires accessoires** est en revanche une technique sûre, réalisée en routine dans les services et consultations de médecine [266]. Si l'innervation végétative des glandes salivaires accessoires est aussi constamment atteinte que celle des glandes salivaires majeures, si les biopsies labiales suffisent à mettre en évidence quelques filets nerveux, alors elles s'imposeront comme biomarqueur histologique de la MP. En dehors d'une étude préliminaire sur 3 patients et 3 témoins qui n'est pas sans susciter quelques réserves méthodologiques (doute sur la spécificité des immunomarquages sur les photographies présentées) [267], leur intérêt reste à démontrer. Une étude est actuellement en cours dans notre centre pour trancher la question.

5.1.3 Les biopsies coliques constituent-elles un biomarqueur de la maladie ?

Dans la perspective de la recherche d'un biomarqueur histologique de la MP, le SNE possède à l'évidence des caractéristiques intéressantes, qui tiennent à son accessibilité et à la densité du tissu nerveux entérique. Contrairement aux sites de prélèvement présentés plus haut, les biopsies digestives donnent accès non seulement à des prolongements nerveux mais également aux somas des neurones postganglionnaires (jusqu'à 150 par biopsie selon notre travail de mise au point, [article 1](#)).

Nos résultats montrent que des inclusions de Lewy dans le PSM peuvent être mises en évidence chez 72% des patients prélevés. La corrélation entre la charge lésionnelle et la sévérité de la maladie, exprimée par la résistance des symptômes à la lévodopa et par l'importance de la symptomatologie axiale, établit la pertinence clinique de ces lésions ([article 3](#)). Cette corrélation suggère d'emblée l'intérêt de notre technique comme **biomarqueur de progression** de la MP ([figure 18](#)). Considéré sous cet angle, la sensibilité limitée de notre méthode ne constitue pas un frein si l'on admet que les 28% de négativité représentent les formes moins évoluées de la maladie.

Deux difficultés doivent être surmontées avant de considérer notre méthode comme **biomarqueur pour le diagnostic positif** :

- sa spécificité, absolue dans notre étude (aucun témoin ne présentait d'inclusion) doit être testée dans la population même où les biopsies auraient un intérêt diagnostique, à savoir celle des syndromes parkinsoniens atypiques ;
- sa sensibilité largement insuffisante pour en faire un biomarqueur de diagnostic [268] doit être améliorée ;
- une cohorte plus large doit bien entendu être testée, si possible dans le cadre d'une étude multicentrique.

5.1.3.1 Spécificité des inclusions de Lewy pour la maladie de Parkinson

Le diagnostic différentiel essentiel à considérer est bien entendu celui **de l'atrophie multi-systématisée**, qui est également caractérisée par des inclusions d' α -synucléine. Si les inclusions emblématiques de cette maladie sont essentiellement oligodendrogiales (inclusions de Papp et Lantos), des inclusions sont également présentes dans les astrocytes et les neurones [13]. Dans cette synucléinopathie parente de la MP, l'atteinte du SNA est réputée comme étant principalement préganglionnaire, et le réseau postganglionnaire y serait épargné. Si d'élégantes études autopsiques confortent ce point de vue [154, 225, 265], une caractérisation fine du SNE manque encore et justifie des travaux complémentaires.

La paralysie supranucléaire progressive, qui est une taupathie pure, ne semble pas de prime abord poser de problèmes de diagnostic différentiel. Cependant la mise en évidence de corps de Lewy dans une certaine proportion de cas avérés de paralysie supranucléaire progressive [269] incite à la prudence et renvoie à la problématique de la synergie des processus pathologiques et des comorbidités neurodégénératives du sujet âgé.

Dans ce contexte, notre équipe mène actuellement une étude pour tester la spécificité des inclusions de Lewy du PSM dans une population de syndromes parkinsoniens atypiques (5 patients atteints d'atrophie multi-systématisée et 5 patients atteints de paralysie supranucléaire progressive).

5.1.3.2 Stratégies pour améliorer la sensibilité

Plusieurs stratégies peuvent être développées pour améliorer la sensibilité de notre méthode. La plus évidente est **de multiplier les prélèvements** : dans notre étude principale ([article 3](#)) seules 4 biopsies étaient analysées, alors qu'il est possible de réaliser de multiples biopsies étagées (jusqu'à 30 ou plus au cours d'une coloscopie totale) sans faire courir de risque excessif de saignement. Le caractère épars des inclusions est précisément ce qui a poussé Braak et Beach à l'utilisation de coupes épaisses (80 μ m contre

5.1.3.3 Nos concurrents sont-ils meilleurs que nous ?

En effet, l'équipe de Jeffrey Kordower (Chicago) a récemment analysé des biopsies coliques conventionnelles prélevées au cours d'une rectosigmoïdoscopie chez 10 patients souffrant de MP débutante et non traitée et 46 témoins, parmi lesquels 23 étaient atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin [272]. Les biopsies ont été traitées par des techniques d'immunohistochimie conventionnelles (inclusion en paraffine, analyse de 8 coupes par biopsie, 1 biopsie par patient). L'immunomarquage de l' α -synucléine totale a été utilisée comme critère de jugement principal.

Les résultats sont incomparablement meilleurs que les nôtres puisqu'est mise en évidence une forte immunoréactivité pour l' α -synucléine dans la lamina propria de la sous-muqueuse colique chez 9 des 10 patients parkinsoniens et chez aucun des témoins. **Toutes les coupes analysées semblaient anormales chez les patients.** L'unique patient parkinsonien négatif avait des biopsies de piètre qualité. En somme, leur méthode atteint une sensibilité et une spécificité de 100% chez les sujets ayant des biopsies exploitables. A noter la présence d'une faible immunoréactivité pour l' α -synucléine au sein de cellules non identifiées chez quelques témoins, en tout état de cause sans commune mesure avec le franc marquage de la lamina propria des patients parkinsoniens.

Ces résultats nous ont interpellés puisqu'ils nous semblent en contradiction avec notre expérience de l'immunomarquage de l' α -synucléine dans les biopsies coliques (voir 4.2.3.1) et avec les études montrant le caractère éparé et inconstant de la pathologie [133, 135], *a fortiori* dans une maladie débutante et particulièrement dans les régions les plus distales du tube digestif [141]. Il est possible néanmoins que nous nous soyons fourvoyés en préférant marquer l' α -synucléine phosphorylée et que le processus d'inclusion en paraffine et de prétraitement des lames facilite la mise en évidence des inclusions pathologiques aux dépens de l' α -synucléine normale.

En science ces conjectures n'ont aucune valeur et seules comptent la validité et la reproductibilité des données. Aussi nous attendons avec impatience que ces résultats impressionnants soient confirmés par d'autres équipes (y compris la nôtre), et que notre méthode soit systématiquement comparée à la leur. **Dans la perspective du développement d'un biomarqueur histologique pour le diagnostic positif, les résultats de Shannon et Kordower sont de loin les meilleurs, conjuguant une excellente sensibilité et spécificité et l'immédiate accessibilité des techniques aux laboratoires d'anatomie pathologique.** Notre méthode de microdissection conserve un intérêt marginal pour appréhender l'organisation du PSM, ce qui revêt plus un intérêt pour la recherche que pour le diagnostic.

5.1.4 Perspectives

Les progrès de la neuropathologie de la MP ont révolutionné la conception de la maladie en montrant que les structures végétatives étaient les premières affectées par le processus dégénératif chez la majorité des patients et qu'il présentait une progression centripète au sein du système nerveux autonome périphérique [154, 273].

Disposer d'un biomarqueur histologique analysant l'atteinte des neurones postganglionnaires, qui appartiennent aux structures les plus précocement touchées, ouvre évidemment des perspectives pour **le diagnostic pré moteur de la MP** (figure 18). Dans la perspective de leur proposer des traitements neuroprotecteurs, des travaux s'efforcent de définir le profil des patients à risque de développer une MP

[274]. Ce profil inclut certainement les personnes souffrant de troubles du comportement en sommeil paradoxal ; mais des personnes de plus de 50 ans souffrant d'hyposmie ou d'une constipation récentes pourraient se voir proposer un dépistage de la maladie si des biomarqueurs fiables étaient disponibles.

A supposer que les biopsies digestives aient une sensibilité suffisante pour mettre en évidence la pathologie au stade pré moteur, les questions qu'une telle approche suscite sont multiples. Au-delà du questionnement éthique, quelle serait la signification de quelques prolongements de Lewy entériques chez une personne pauci-symptomatique ?

Le cas des troubles du comportement en sommeil paradoxal fournit des éléments de réponse et en apportera certainement à l'avenir. Ces troubles peuvent longtemps rester isolés avant l'apparition de troubles moteurs qui ne sont pas inéluctables. S'ils sont effectivement liés à une synucléinopathie ayant atteint le stade 2 de Braak [160, 275, 276], ce qui demande encore à être confirmé par d'autres études autopsiques, alors la mise en évidence d'une synucléinopathie digestive, normalement antérieure à l'atteinte du complexe cœuruleus-subcœuruleus, n'aura qu'une valeur limitée pour prédire l'émergence d'une MP. La valeur d'une prédiction qui pourrait ne se vérifier que plusieurs dizaines d'années après mérite en effet d'être questionnée.

Une fois qu'un biomarqueur indiscutable sera disponible, qu'il passe ou non par une endoscopie digestive, l'étude de la population des troubles du comportement en sommeil paradoxal « idiopathiques » apparaît donc comme une priorité. Existe-t-il systématiquement une synucléinopathie ? Sa présence ou son intensité peuvent-elles prédire l'apparition d'une MP et à quelle échéance ? Ou ne s'agit-il que d'un facteur de risque, qui requerra l'association à d'autres marqueurs (dysautonomie, dénervation dopaminergique striatale débutante, hyposmie) pour qu'un diagnostic de MP pré motrice puisse être posé [277] ?

Ces questions stimulantes renvoient à la problématique de la définition des maladies neurodégénératives. Loin d'apporter une simplification des concepts, les progrès parallèles de la neuropathologie et de la clinique aboutissent à une situation où le diagnostic neuropathologique n'est pas moins probabiliste que le diagnostic clinique. Quelques inclusions de Lewy médullaires et entériques font-elles une MP ? L'analogie la plus pertinente est celle des dégénérescences neurofibrillaires du cortex entorhinal. Ces lésions sont tellement fréquentes chez le sujet âgé que le diagnostic neuropathologique ne dépend pas de leur présence mais de leur densité, de leur extension et... de leurs conséquences cliniques. Dans le domaine des démences, le diagnostic neuropathologique s'exprime en termes de *probabilité que les signes cliniques soient liés à tel type de lésion*. C'est la cas de la démence à corps de Lewy [278]. Il est vraisemblable qu'une telle approche s'applique également à la MP.

En dehors de la MP, le seul exemple de biomarqueur histologique dans les maladies neurodégénératives est fourni par le nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob. L'analyse histologique et biochimique du tissu lymphoïde des amygdales peut en effet mettre en évidence la forme pathologique de la protéine prion chez les patients touchés [279, 280].

5 µm pour des coupes en paraffine standard dans l'étude de Beach), de façon à augmenter la quantité de tissu analysé [135, 141] ; lorsqu'il travaille sur des coupes en paraffine habituelles, Beach fait passer la sensibilité de la recherche d'inclusions dans la moelle épinière de 1/7 à 6/7 chez des sujets atteints de maladie à corps de Lewy incidents [141]. La sensibilité suit vraisemblablement une progression asymptotique en fonction du nombre de biopsies analysées, et les études ultérieures devront déterminer le meilleur ratio nombre de prélèvements/rentabilité diagnostique.

La deuxième stratégie est **de changer de site de prélèvement**, en biopsies les régions où la pathologie est la plus dense et la plus constante. Au sein du tractus digestif, il existe un gradient oro-anal de la charge lésionnelle à partir de l'œsophage bas [141], qui est la région où le SNE est le plus atteint [133, 141] ; il est donc vraisemblable que **des biopsies du tractus digestif haut** aient un meilleur potentiel pour le diagnostic de la synucléinopathie. Plusieurs obstacles pondèrent cependant l'enthousiasme *a priori* pour cette approche que nous avons envisagée :

- la fibroscopie œsogastroduodénale requiert en général une anesthésie générale (ce n'est pas forcément le cas pour une coloscopie, *a fortiori* si l'objectif n'est pas d'atteindre le bas-fond cæcal, ce qui nécessite des manœuvres parfois douloureuses avec l'endoscope) ;
- elle ajoute le risque d'inhalation aux risques des endoscopies digestives en général (hémorragie, perforation), ce qui n'est pas à négliger chez des patients pouvant présenter des troubles de déglutition et un émoussement des réflexes de protection des voies aériennes liés à la maladie ;
- la muqueuse digestive est souvent plus épaisse et le PSM moins développé au niveau du tractus digestif supérieur ; la muqueuse est particulièrement épaisse par exemple au niveau de l'œsophage bas, où les prélèvements peuvent être hémorragiques et douloureux ;
- l'acceptabilité de l'examen est finalement moindre que pour l'endoscopie basse.

Cela étant, le fait de ne pas atteindre le PSM n'empêche pas d'atteindre des prolongements muqueux, tels que ceux présentés par Braak dans sa publication initiale sur le sujet [135]. Et dès lors qu'il est atteint, ce qui est inconstant avec les pinces à biopsies classiques utilisées, les résultats peuvent être spectaculaires par la densité des inclusions de Lewy (travaux non publiés).

La troisième stratégie serait **d'augmenter la profondeur des biopsies** pour atteindre le PM, plus touché que le PSM [133, 141] et dont le dysfonctionnement est directement responsable de la dysmotilité digestive. A l'heure actuelle la seule technique ambulatoire permettant d'atteindre le PM est **la biopsie rectale par succion** pratiquée chez le petit enfant pour le diagnostic des dysganglionoses (maladie de Hirschprung en premier lieu) [270]. Son intérêt dans la MP pourrait être testé car l'atteinte du PM, plus constamment atteint que le PSM, pourrait compenser la raréfaction de la pathologie dans le segment terminal du tube digestif. Mais les progrès des techniques endoscopiques autoriseront peut-être d'atteindre le PM dans d'autres régions en minimisant les risques de perforation et de saignement [213, 215, 216, 271].

La solution se trouve peut-être enfin, en conservant les mêmes biopsies, dans **une modification du protocole d'immunomarquage**. Nous avons montré que l'analyse conjointe systématique de la muqueuse augmente la sensibilité de notre méthode ([article 6](#)). Mais une publication récente outre-Atlantique montre que notre procédure est peut-être inutilement sophistiquée et que des techniques conventionnelles peuvent parvenir à un bien meilleur résultat [272].

5.2 Les biopsies digestives comme outil pour la recherche

L'utilisation dans un avenir proche de biopsies digestives pour le diagnostic de la MP reste incertaine. En revanche, l'accès direct et aisé qu'elles procurent à des neurones affectés par le processus dégénératif en font un outil d'ores et déjà précieux pour la recherche, vraisemblablement sous-estimé. Au delà de l'intérêt des biopsies comme biomarqueur pour la recherche clinique, une recherche plus fondamentale pourrait bénéficier de ces tissus. Quatre directions sont proposées.

5.2.1 Répercussions de la pathologie de Lewy sur la barrière épithéliale intestinale

Des outils pour évaluer la fonction de l'épithélium digestif sur des biopsies conventionnelles sont disponibles au laboratoire [281]. Les mesures de perméabilité paracellulaire et de résistance transépithéliale et le dosage des facteurs solubles sécrétés permettent d'appréhender le fonctionnement de la barrière épithéliale intestinale. Or les fonctions de la barrière sont étroitement dépendantes de l'intégrité du SNE [282-288]. **L'étude de la perméabilité épithéliale sur les biopsies** présentant des altérations neuritiques peut contribuer à éclaircir la physiopathologie de l'atteinte digestive dans la MP. L'existence d'altérations de la perméabilité épithéliale interrogerait sur les liens de cause ou de conséquence avec la synucléinopathie entérique, et apporterait des arguments aux tenants de l'hypothèse toxique.

5.2.2 Expression constitutionnelle de l' α -synucléine par le système nerveux entérique et vulnérabilité à la pathologie de Lewy

Une forte expression physiologique endogène de l' α -synucléine semble prédisposer les neurones à la neurodégénérescence. Au sein du tronc cérébral, le noyau dorsal du nerf vague, le locus coeruleus et la substance noire sont intrinsèquement riches en α -synucléine [289]. De façon troublante, les fibres efférentes du nerf vague, qui sont les seules à être atteintes dans la maladie de Parkinson, se distinguent des fibres afférentes par leur expression sélective de l' α -synucléine [223].

L'expression de l' α -synucléine au sein du SNE, l'une des structures les plus précocement atteintes dans la MP, reste méconnue. Il est pourtant tentant de penser que les neurones l'exprimant le plus sont également les plus vulnérables à la pathologie de Lewy. Dans ce sens, l'étude des mécanismes de la régulation de l'expression de l' α -synucléine dans le SNE ([article 12](#)) et des variations de son expression en fonction du phénotype neurochimique est fondamentale. Un accès au PM par prélèvement autopsique ou chirurgical permettrait de déterminer le phénotype neurochimique des neurones atteints.

Une étude chez le rat montre que l'expression de l' α -synucléine ne dépend pas du phénotype neurochimique, puisque parmi les neurones l'exprimant sont principalement cholinergiques dans l'antré et nitrergiques dans le fundus [223]. Dans cette étude, les neurones myentériques exprimant l' α -synucléine représentent une minorité de la population générale, avec un gradient oro-anal positif contre-intuitif connaissant la répartition de la pathologie chez l'homme (3% dans l'estomac, 22% dans le jéjunum) [223]. Dans nos travaux sur les cultures primaires de neurones de rat, nous montrons que l'expression de l' α -synucléine dépend surtout de l'activité neuronale ([article 12](#)), ce qui semble en cohérence avec sa fonction présumée de régulation de la neurotransmission [290, 291]. Les neurones TH et NOS sont ceux qui

expriment le plus constamment et le plus intensément l' α -synucléine, mais 30% des neurones cholinergiques et 70% des neurones VIP l'expriment également, quoiqu'à un degré moindre (données non publiées). L'importance des variations inter-espèces de phénotype neurochimique rend néanmoins modeste sur la portée de ces résultats.

Dans ce contexte, notre technique permet l'analyse chez l'homme et *in vivo* de l'expression endogène de l' α -synucléine en fonction du phénotype neurochimique. Cette étude dans la population des neurones sous-muqueux à différents niveaux du tube digestif devra être complétée par l'analyse du PM, pour déterminer si la vulnérabilité des neurones est liée à l'expression d' α -synucléine et au phénotype neurochimique (figure 19).

5.2.3 Accès à des neurones viables

L'accès relativement aisé à des neurones viables est une manne pour une série de manipulations : cultures organotypiques [292], analyse du transcriptome ou du génome nucléaire ou mitochondrial non biaisée par les modifications post mortem, sur le tissu ou sur cellule unique [293, 294], etc.

5.2.4 Modélisation de la maladie de Parkinson *in vitro*

Le développement exponentiel des neurosciences entériques offre des outils particulièrement attractifs pour la recherche sur la MP. L'équipe de Gershon est la première à démontrer l'existence d'une neurogénèse postnatale dans le SNE [295]. Il existe chez les souris à quelques mois de vie des niches germinatives apposées au muscles longitudinal contenant des cellules souches neurales capables de se différencier et de coloniser les ganglions [295]. Après quelques mois de vie, ces cellules souches disparaissent mais les cellules gliales entériques murines conservent la capacité de se dédifférencier et de s'engager dans une neurogénèse chez l'adulte [296]. Cultivées dans des milieux adéquats, les cellules gliales entériques et les cellules souches reconstituent un réseau neuro-glial *in vitro* [296].

Récemment, l'équipe de Metzger a montré **que des cellules souches pouvaient être isolées chez l'homme à partir de biopsies digestives hautes réalisées chez le jeune enfant** [217]. En culture ces cellules forment des neurosphères et certaines se différencient en neurones. La capacité de neurogénèse des cellules gliales incite à reproduire ce tour de force à partir de biopsies digestives réalisées chez l'homme adulte. La culture de cellules gliales entériques à partir de tissus humains est une technique d'ores et déjà maîtrisée au laboratoire.

Ces résultats augurent la possibilité de réaliser des cultures primaires de neurones entériques humains, à partir de biopsies de témoins et à partir de biopsies de malades. L'une des manipulations les plus intéressantes sur un tel modèle serait d'étudier la sécrétion de l' α -synucléine et la transmission trans-neuronale des oligomères sur ces neurones [297]. Il s'agirait de tester *in vitro* l'hypothèse de la transmission « de type prion » de la pathologie de Lewy [298] en s'adressant à des neurones appartenant au premier maillon du processus dégénératif de la MP.

Selon l'hypothèse centripète, les premières **inclusions d'alpha-synucléine** apparaîtraient dans le contingent périphérique du système nerveux autonome, au niveau de l'axone du **neurone post-ganglionnaire**. C'est au niveau du **système nerveux entérique** que les neurones post-ganglionnaires d'origine parasympathique forment le réseau le plus différencié. Fonctionnellement divers, ils expriment des phénotypes neurochimiques divers. **Les neurones nitrergiques, VIPergiques** et les plus rares neurones **dopaminergiques** du système nerveux entérique sont ceux qui expriment le plus l'alpha-synucléine, et sont vraisemblablement les plus susceptibles à la pathologie (1).

Le système nerveux entérique reçoit également une abondante innervation sympathique. **Les axones des neurones post-ganglionnaires sympathiques**, situés dans les ganglions mésentériques, sont également sujet à la neurodégénérescence au cours de la maladie de Parkinson (2).

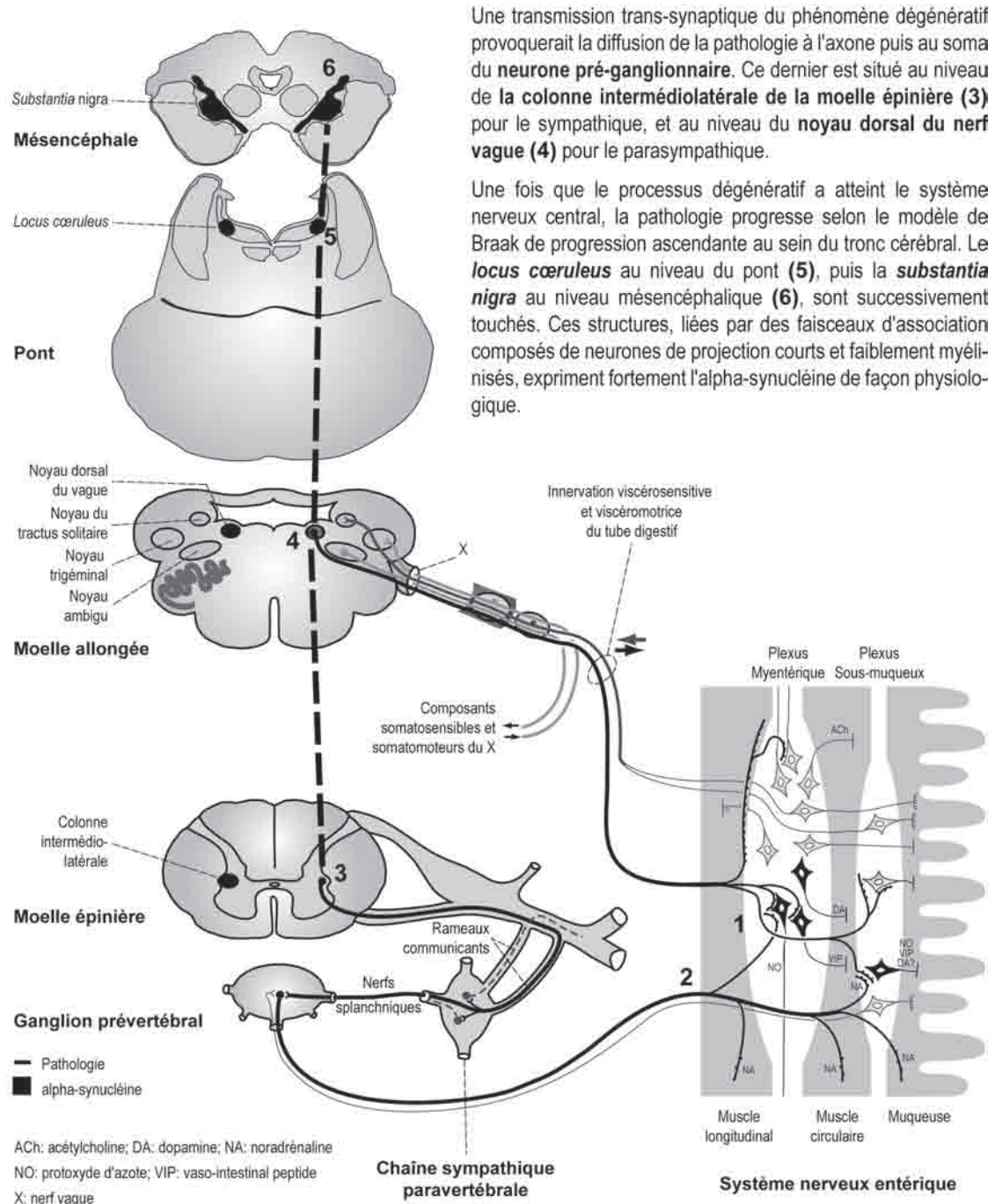


Figure 19. Place du système nerveux entérique dans l'hypothèse centripète de la maladie de Parkinson

5.3 Le système nerveux entérique comme fenêtre sur le système nerveux central

Dans le cas particulier de la MP, le SNE semble constituer un miroir fidèle de la pathologie centrale. Au terme de ce travail, il est légitime de s'interroger sur les possibilités d'étendre ce paradigme à l'ensemble des pathologies neurodégénératives, et au-delà aux pathologies neurologiques.

5.3.1 SNE-SNC : similitudes, différences et relations

Le fameux ouvrage de vulgarisation scientifique de Michael Gershon, transfuge de la neurobiologie ayant consacré sa vie à l'étude du SNE, présente le SNE comme « le deuxième cerveau » [299].

Rien de plus dissemblable pourtant que le cerveau et les plexus nerveux du tube digestif. Le SNC, dans le sanctuaire de la boîte crânienne et du canal médullaire, n'est composé que de tissu nerveux différencié en organes tridimensionnels. Il est relié aux récepteurs et aux effecteurs de l'ensemble de l'organisme par un réseau de nerfs périphériques contenant les prolongements extraordinairement longs de ses propres neurones. A l'inverse le SNE est différencié en deux plexus majoritaires qui occupent deux couches distinctes du tube digestif. Ces plexus s'organisent en structures bidimensionnelles immédiatement accolées aux récepteurs et aux effecteurs dont elles ont la charge : épithélium et glandes excrétrices pour le PSM, fibres musculaires lisses pour le PM.

A l'échelle cellulaire les différences sont également marquantes. Les cellules interstitielles de Cajal, population cellulaire spécifique du tube digestif interposée entre nerf et muscle, joue le rôle de *pace maker* pour les fibres musculaires lisses dont elles coordonnent également la contraction harmonieuse ; cette population n'a pas son équivalent dans la motricité somatique. L'importance de la « transmission volumique » aux dépens de synapses différenciées entre neurones ou entre neurone et effecteur est un autre élément distinctif du SNE. Un tel mode de neurotransmission paracrine est moins commun dans le SNC [300], à l'exception notable de l'hypothalamus. Enfin la complexité du codage neurochimique fait la singularité du SNE. L'importance des neurotransmetteurs peptidergiques, le recours à des cotransmetteurs qui modulent le signal, l'utilisation du NO comme gazotransmetteur inhibiteur, et l'existence de neurotransmetteurs inhibiteurs à la jonction nerf-muscle lisse en sont autant d'exemples. Quelques contre-exemples montrent que la spécificité pour le SNE des éléments susmentionnés est toute relative. Le SNC utilise également des cotransmetteurs peptidergiques [301] et contient quelques neurones nitrergiques [302].

Mais au-delà de ces différences relatives, les caractéristiques morphologiques et électrophysiologiques des neurones entériques et centraux sont remarquablement comparables. Au niveau physiologique des circuits réflexes comparables aux réflexes centraux ont été décrits ; les similitudes entre réflexe myotatique et réflexe péristaltique sont par exemple troublantes. Mais la comparaison va au-delà, et des parallèles peuvent être tracés entre des fonctions apparemment totalement distinctes : ainsi le rôle des CGE dans la perméabilité épithéliale est comparé à celui des astrocytes dans le maintien de la barrière hémato-encéphalique [193]. A l'échelle moléculaire, les populations cellulaires du SNE expriment nombre de marqueurs classiques du SNC (NF, β -tubuline 3, PGP 9.5, Hu, S100- β , GFAP, etc.) Enfin les protéines majeures de la neurodégénérescence, tau et α -synucléine, sont exprimées par les neurones entériques.

SNE et SNA sont interconnectés. Leurs rapports sont bidirectionnels et sans hiérarchie nette. La connexion entre ces deux systèmes est assurée par le SNA et le système endocrinien (les sécrétions neuro-humorales qu'elles soient issues de l'hypothalamus ou du tube digestif constituent une forme transitionnelle de communication). Tout comme le SNC agit sur le SNE par les voies que nous avons décrites, le SNE agit sur le SNC en modulant l'appétit et certains aspects du métabolisme et la digestion [303]. Ces interactions peuvent prendre un tour étonnant : une étude en imagerie fonctionnelle montre que l'infusion intragastrique d'acides gras diminue la sensibilité à des stimulus tristes (visages et musique), prouvant que la signalisation neuroendocrine d'origine digestive peut influencer sur le comportement et les émotions [304].

Il n'y aurait donc rien d'étonnant à ce que ces deux systèmes comparables et étroitement connectés puissent présenter des altérations en parallèle.

5.3.2 SNE-SNC en pathologie : ce qui les rassemble

En pathologie, l'atteinte conjointe des systèmes nerveux central et entérique n'est rapportée que lorsque les manifestations digestives l'emportent sur les signes neurologiques centraux, comme dans le syndrome des anti-Hu. La fréquence des signes fonctionnels digestifs dans les maladies neurologiques suggère pourtant que l'atteinte combinée « silencieuse » du SNE pourrait être bien plus commune [305]. Plus rares sont les cas inverses où le SNC est atteint de façon occulte au cours d'une neuropathie entérique. Nous exposerons enfin, sans prétendre à l'exhaustivité, les cas où le SNE constitue une porte d'entrée dans le SNC.

5.3.2.1 *Atteinte parallèle du système nerveux entérique et du système nerveux central*

Quatre affections emblématiques sont présentées dans cette catégorie : une pathologie paranéoplasique, une maladie neurodégénérative, une pathologie infectieuse et une mitochondriopathie.

Le syndrome des anti-Hu est le plus fréquent des syndromes paranéoplasiques mais également l'un des plus mal compris, puisque l'auto-anticorps en cause n'est qu'un marqueur indirect de la maladie sans rôle pathogène propre [306]. Ses manifestations cliniques par ordre de fréquence sont la neuronopathie sensitive subaiguë de Denny-Brown, l'encéphalite limbique et l'ataxie cérébelleuse. Mais un tableau de pseudo-obstruction intestinale chronique, des troubles de la motilité œsophagienne ou une gastroparésie peuvent également inaugurer le tableau [307]. La physiopathologie renvoie à une destruction des neurones entériques par un processus inflammatoire à médiation cellulaire dont l'anti-Hu n'est qu'un témoin indirect [308]. La symptomatologie se complète habituellement pour constituer un tableau d'encéphalomyélite multifocale avec dysautonomie. Ainsi un même mécanisme pathogénique peut-il avoir des répercussions sur le SNE, le système nerveux périphérique et sur le SNC.

La maladie à inclusions nucléaires intraneuronales est une affection dégénérative rarissime vraisemblablement d'origine génétique [309], qui se présente comme une pseudo-obstruction intestinale chronique. La perte neuronale massive dans le PM et associée à des inclusions protéiques nucléaires éosinophiles dans les neurones restants. La maladie est diagnostiquée par biopsie rectale profonde. Il existe vraisemblablement un continuum pathologique entre des formes purement digestives [309, 310] et des formes associées à une atteinte du SNC parfois massive et fatale, comportant un syndrome cérébelleux et un syndrome parkinsonien juvénile [311]. Les inclusions hyalines nucléaires retrouvées également dans le SNC les rapprochent du groupe des maladies à expansion de triplets [312, 313]. Conceptuellement intéressante malgré sa rareté, la maladie à inclusions nucléaires intraneuronales fournit un exemple inédit

de maladie neurodégénérative dont le diagnostic neuropathologique peut être établi par l'étude du SNE en attendant l'identification du gène. L'existence de formes digestives pures pose la question de l'origine neurologique de certains troubles fonctionnels intestinaux actuellement considérés comme idiopathiques.

La maladie de Chagas ou trypanosomiase américaine est une maladie parasitaire provoquée par *Trypanosoma cruzi* qui sévit dans les régions tropicales d'Amérique du Sud et centrale. Les altérations principalement cardiaques et digestives observées au cours de la phase chronique de l'infection sont causées par le parasite lui-même ou par la réponse immunoinflammatoire de l'hôte [314]. Dans cette affection une destruction majeure des plexus du SNE est observée au niveau de l'œsophage, du côlon ou des deux régions à la fois, du fait du tropisme particulier du parasite pour le tube digestif. Contrairement à la trypanosomiase africaine (maladie du sommeil), l'atteinte directe du SNC est rare ; les méningoencéphalites sont propres à l'immunodéprimé. La démence tardive classiquement décrite est en réalité liée à la sommation d'infarctus causés par la cardiopathie [315]. En somme et contrairement aux conceptions anciennes de la maladie, il ne s'agit pas à proprement parler d'une atteinte infectieuse combinée du SNE et du SNC.

Enfin **le syndrome MNGIE** (*Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy*) est une maladie autosomale récessive associant troubles de la motilité intestinale, ptôsis, ophtalmoparésie, neuropathie périphérique et hypersignaux de la substance blanche. Cette mitochondriopathie nucléaire est également un contre-exemple puisque l'atteinte digestive est plus liée à une myopathie qu'à l'atteinte du SNE [316].

5.3.2.2 Atteinte occulte du système nerveux entérique dans les pathologies neurologiques

Le syndrome de prémutation de l'X fragile (*Fragile X Tremor-Ataxia Syndrome FXTAS*) associe à l'ataxie cérébelleuse et au tremblement postural une pléiade de symptômes reflétant une pathologie multi-systémique (déclin cognitif, syndrome parkinsonien, neuropathie périphérique). Les lésions emblématiques de la maladie sont des inclusions intranucléaires éosinophiles positives pour l'ubiquitine dans les neurones et les astrocytes. Le cœur des agrégats serait composé de l'ARNm du gène FMR1 [317].

Dans une série autopsique récente de 10 cas de FXTAS, des inclusions intranucléaires ont été retrouvées dans les fibres musculaires lisses du tube digestif ainsi que dans les neurones myentériques et sous-muqueux [318]. Ce résultat n'est pas spécifique au tissu nerveux ni au tube digestif puisque les fibres musculaires lisses, les cardiomyocytes et le parenchyme rénal, thyroïdien et testiculaire en contiennent également. Le caractère « occulte » de cette pathologie du SNE est discutable puisque la dysautonomie appartient au spectre des manifestations du syndrome de prémutation de l'X fragile et que 30,6% des patients souffrent de troubles digestifs au cours du vieillissement [319]. Cette affection fournit en tous cas un deuxième exemple de maladie neurodégénérative, dont le caractère génétique est cette fois établi, affectant à la fois le SNE et le SNC.

5.3.2.3 Atteinte occulte du système nerveux central dans les maladies digestives

Dans cette catégorie se situe **les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin** (maladie de Crohn et rectocolite hémorragique) qui sont considérées comme étant également des neuropathies entériques. Le SNE y joue en effet un rôle clef dans le contrôle de la réaction inflammatoire et des fonctions de la barrière épithéliale intestinale, et ses altérations, qu'elles soient une cause ou une conséquence de la maladie, participe à la pathogénie [320]. Dans une étude controversée, des hyperintensités de la substance blanche

étaient présentes chez 20 parmi 48 (42%) patients ayant une maladie de Crohn, chez 11 parmi 24 (46%) patients avec une rectocolite hémorragique, mais chez seulement 8 sur 50 (16%) témoins appariés en âge [321]. Ces résultats n'ont pas été confirmés sur une deuxième série de 40 patients même si une tendance favorisant un excès de lésions de la substance blanche chez les patients était notée [322].

La pertinence clinique de ces lésions est discutable. Mais leur interprétation doit prendre en compte l'existence d'authentiques maladies inflammatoires du SNC au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. S'agit-il des manifestations systémiques de la pathologie digestive ou d'une comorbidité ? En tout état de cause le processus inflammatoire primitivement digestif semble pouvoir toucher le SNC de façon ouverte ou occulte.

5.3.2.4 Le système nerveux entérique comme porte d'entrée sur le système nerveux central

Un certain nombre de virus neurotropes tels que le virus HSV1 [323] ou le papovavirus JC [324] ont été récemment impliqués dans la survenue de troubles de la motilité intestinale. Il n'existe en revanche aucun argument en faveur de l'utilisation de cette voie pour atteindre le SNC.

C'est dans le domaine **des agents transmissibles non conventionnels** que la littérature est la plus prolixe sur le sujet. De nombreux modèles ou cas animaux de maladies à prions suggèrent l'implication du SNE et de ses connexions au SNC comme voie de propagation vers le SNC [325]. La forme constitutive de la protéine prion, nécessaire à la propagation de la maladie, est fortement exprimée dans les neurones entériques [326]. Sa conformation anormale (PrP^{sc}) est retrouvée deux mois après une inoculation orale chez le hamster dans les follicules lymphoïdes de l'intestin (plaques de Peyer) et dans les neurones entériques. La PrP^{sc} est retrouvée dans les ganglions et les centres végétatifs, dont le noyau dorsal du vague, dans les modèles murins [327] comme dans l'encéphalopathie spongiforme des cervidés [328]. Chez l'homme le SNA est atteint dans le nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob : contrairement à ce qui est observé dans les formes sporadiques, la PrP^{sc} est retrouvée dans les ganglions sympathiques innervant le tube digestif [329]. La voie inverse est possible : l'inoculation intracérébrale de PrP^{sc} chez la souris se traduit par une perte neuronale et une expression de la PrP^{sc} dans les plaques de Peyer 7 mois après [330]. Ces données sont des arguments forts en faveur d'une propagation centrale empruntant les voies du système nerveux autonome dans le nouveau variant. Le rôle respectif du système immunitaire et du SNE dans la transmission de la pathologie au SNC reste cependant incertain.

La maladie de Creutzfeldt-Jakob a suscité un nouveau regard sur les pathologies dégénératives. Ce modèle de propagation transneuronal d'anomalies conformationnelles protéiques [331] est actuellement envisagé dans des affections neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Huntington [332]. Le nouveau variant, qui procède d'une inoculation orale et semble se propager via le SNA, est évidemment rapproché de la maladie de Parkinson [333]. La mise en évidence d'agrégats d' α -synucléine satellites des agrégats de PrP^{sc} est troublante dans le contexte [334].

5.3.3 SNE-SNC : le concept confronté à la réalité

Loin de dévoiler une règle générale, l'analyse critique de la littérature consacrée aux atteintes conjointes du SNE et du SNC montre une succession de cas particulier dont la pertinence est parfois relative (cf. la maladie de Chagas, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et le syndrome MNGIE). La catégorie des maladies neurodégénératives est sans doute la plus représentée et sera détaillée ci-après.

Le cas des synucléinopathies a déjà été largement exposé. L'atteinte des plexus digestifs est possible dans l'AMS mais vraisemblablement inconstante et tardive compte tenu de la progression centrifuge des lésions [13, 154]. Outre la MP et l'AMS, le groupe comporte l'**hypotension orthostatique primaire**. Cette entité controversée correspond en réalité à un stade 1 particulièrement symptomatique de la maladie de Parkinson, caractérisé par une dysautonomie et des corps de Lewy dans l'ensemble des contingents du SNA [335]. En somme, dans le groupe des synucléinopathies, l'hypotension orthostatique primaire, la maladie de Parkinson et avec quelques réserves la démence à corps de Lewy associent une atteinte du SNE et du SNC.

Le cas des maladies à expansion de triplets est intéressant puisque le substratum génétique peut faire supposer une atteinte diffuse du système nerveux – et par conséquent une atteinte représentative du SNE.

La maladie à inclusions intranucléaires neuronales rentre possiblement dans ce groupe même si le gène en cause n'a pas été encore identifié. **Le syndrome de prémutation de l'X fragile** comporte en effet des lésions du SNE participant d'une atteinte multi-systémique [318]. En revanche, le SNE a été analysé en vain dans l'atrophie spino-cérébelleuse de type 3 (maladie de Machado-Joseph) en dépit d'une atteinte des ganglions végétatifs [336]. Aucune lésion du SNE n'a été retrouvée dans l'atrophie dentato-rubro-pallido-luysienne (DRPLA) et la maladie de Kennedy (atrophie musculaire spinale et bulbaire) [337, 338]. Dans les modèles murins de la maladie de Huntington, les inclusions de huntingtine sont ubiquitaires et affectent notamment les neurones entériques [339]. Cela suggère l'existence d'altérations du SNE chez l'homme, mais aucune étude n'en a été effectuée à ce jour.

C'est dans **le groupe des taupathies** que les résultats sont les plus décevants. En dépit d'une expression physiologique de la protéine Tau, aucun cas de dégénérescence neurofibrillaire (DNF) dans le SNE n'a été rapporté à ce jour. Sur les 10 seuls cas rapportés de DNF dans les ganglions végétatifs, seuls 3 étaient associées à une taupathie centrale (lésions de type Alzheimer). A l'inverse la pathologie neurofibrillaire végétative était absente dans toutes les séries autopsiques de maladies d'Alzheimer qui se sont intéressées au SNA, ce qui plaide en faveur du caractère fortuit de ces DNF périphériques [340]. Plus spécifiquement, la seule étude s'étant intéressée au SNE dans la maladie d'Alzheimer montre l'absence de DNF recherchées avec un anticorps phosphospécifique de tau dans une série de 10 patients [341]. Dans la paralysie supranucléaire progressive, en dehors de deux cas rapportés de DNF dans les ganglions spinaux, aucune inclusion n'a été retrouvée dans le système nerveux périphérique. Le SNE n'a jamais été spécifiquement exploré [340].

« L'espoir » de mettre en évidence une taupathie entérique repose peut-être sur les formes génétiques. Le SNE n'a jamais été exploré dans les démences frontotemporales avec syndrome parkinsonien liées au chromosome 17 (FTDP-17), secondaires à une mutation du gène *MAPT* codant pour Tau. Dans la quête d'une taupathie entérique, **la myotonie de Steinert**, qui associe des troubles de la motilité digestive [342] et une pathologie neurofibrillaire encéphalique [343] avec une signature biochimique particulière [344] est un candidat de premier choix. Enfin un article confidentiel fait état d'un marquage phospho-Tau dans le SNE de patients atteints de trisomie 21. Dans cette maladie chromosomique la pathologie Alzheimer est systématique au cours du vieillissement par effet de dosage génique.

En ce qui concerne la pathologie amyloïde, si la protéine précurseur du peptide β -amyloïde (APP) est exprimée dans de nombreux tissus parmi lesquels le SNE, aucun dépôt amyloïde spécifique n'est observé

en dehors du parenchyme et de la vascularisation cérébraux [345]. En ce qui concerne enfin le groupe récent des tardopathies (maladies dégénératives avec agrégation de la protéine TDP-43), aucune étude n'a regardé spécifiquement le système nerveux périphérique.

En conclusion, il n'existe aucune raison de considérer le SNE comme miroir du SNC en dehors du cas particulier des synucléinopathies et de quelques maladies génétiques rares. Faute de l'avoir systématiquement analysé sans doute : notre méthode, qui permet de s'affranchir de l'autopsie, pourrait être utilisée largement pour tester cette hypothèse. Mais faute surtout de correspondre à une réalité ; la probabilité de trouver des lésions spécifiques semblent faible dans des pathologies comme la maladie d'Alzheimer ou les démences fronto-temporales. Dans le premier cas parce que bien qu'imparfaitement, le SNE a déjà été regardé ; dans le second parce qu'il n'existe pas de dysautonomie ni de troubles gastro-intestinaux.

Conclusion

A ce jour, malgré l'essor de la neuroimagerie, le diagnostic de certitude de pathologies neurodégénératives comme la MP n'est définitivement acquis qu'à l'examen autopsique [107]. Le travail que nous présentons ici est préliminaire, et suscite encore beaucoup plus de questions que de réponses. Cependant la mise en évidence de lésions du SNE accessibles par de simples biopsies endoscopiques laisse entrevoir la possibilité **d'un diagnostic neuropathologique simple et reproductible du vivant des patients**, ce qui constituerait évidemment une petite révolution dans le domaine des maladies neurodégénératives, où en dehors de rares exceptions l'anatomie pathologique n'intervient qu'en *post mortem*.

Au delà du diagnostic, les perspectives pour la recherche clinique et fondamentale sur la MP sont multiples. Certaines sont encore de la fiction, d'autres pourraient voir le jour dans un proche avenir.

L'idée du SNE comme miroir du SNC s'inspire de nos résultats sur la MP. Le concept est fragile et, à quelques exceptions près, ne se vérifie probablement pas au-delà des synucléinopathies.

Articles de revue

Article 7 : The second brain and Parkinson's disease

Lebouvier T, Chaumette T, Paillusson S, Duyckaerts C, Bruley des Varannes S, Neunlist M and Derkinderen P. *The second brain and Parkinson's disease*. **Review**. Eur J Neurosci. 2009 Sep;30(5):735-41.

Cet article est une revue aussi exhaustive que possible en 2009 sur le sujet du SNE dans la MP. Y sont abordés à grands traits la physiologie du SNE et ses connections avec le SNC. A une revue de la littérature sur la pathologie de Lewy dans le SNE succède une discussion sur l'existence d'une perte neuronale entérique et les conséquences de ces altérations sur la fonction digestive. Sont enfin présentés les différents modèles animaux tentant de reproduire l'atteinte digestive de la MP, et les hypothèses pathogéniques principales.

REVIEW ARTICLE

The second brain and Parkinson's disease

Thibaud Lebouvier,^{1,2,3,4,5} Tanguy Chaumette,^{1,2,3} Sébastien Paillusson,^{1,2,3} Charles Duyckaerts,⁶ Stanislas Bruley des Varannes,^{1,2,3,5} Michel Neunlist^{1,2,3,4} and Pascal Derkinderen^{1,2,3,4,5}

¹Inserm, U913, CHU Nantes, 44093 Nantes, France

²University of Nantes, Nantes, France

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

⁴CHU Nantes, Department of Neurology, Nantes, France

⁵Inserm, CIC-04, Nantes, France

⁶Laboratoire de Neuropathologie R. Escourolle, Hôpital de la Salpêtrière, Paris, France

Keywords: α -synuclein, enteric nervous system, Lewy bodies, Parkinson's disease

Abstract

Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disease after Alzheimer's disease. It has been classically considered that the pathological hallmarks of Parkinson's disease, namely Lewy bodies and Lewy neurites, affect primarily the substantia nigra. Nevertheless, it has become increasingly evident in recent years that Parkinson's disease is a multicentric neurodegenerative process that affects several neuronal structures outside the substantia nigra, among which is the enteric nervous system. Remarkably, recent reports have shown that the lesions in the enteric nervous system occurred at a very early stage of the disease, even before the involvement of the central nervous system. This led to the postulate that the enteric nervous system could be critical in the pathophysiology of Parkinson's disease, as it could represent a route of entry for a putative environmental factor to initiate the pathological process (Braak's hypothesis). Besides their putative role in the spreading of the pathological process, it has also been suggested that the pathological alterations within the enteric nervous system could be involved in the gastrointestinal dysfunction frequently encountered by parkinsonian patients. The scope of the present article is to review the available studies on the enteric nervous system in Parkinson's disease patients and in animal models of the disease. We further discuss the strategies that will help in our understanding of the roles of the enteric nervous system, both in the pathophysiology of the disease and in the pathophysiology of the gastrointestinal symptoms.

Introduction

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease. The 'core' of the neuronal lesions is the progressive degeneration of dopamine neurons in the central nervous system (CNS), which accounts for most of the symptoms (slowness of movement, rest tremor, and rigidity). It is now well established that PD lesions occur outside the CNS and, in particular, in the enteric nervous system (ENS). The aims of the present article are as follows: (i) to give a short overview of the ENS and on its connections with the CNS; (ii) to review the lesions of the ENS both in PD patients and in experimental parkinsonism; (iii) to discuss their role in the pathophysiology of the gastrointestinal (GI) symptoms frequently encountered by PD patients; and (iv) to discuss their role in the pathophysiology of PD *per se*.

The ENS is a second brain

The postulate that the gut is a second brain arose in the early 1900s, when it was found that the ENS control of intestinal motility and secretion was largely independent of influences from the CNS. The ENS contains as many neurons as the spinal cord (approximately 80–

100 million neurons), and the functional and chemical diversity of enteric neurons closely resembles that of the CNS (Goyal & Hirano, 1996; Benarroch, 2007).

The ENS is an integrative neuronal network organized in two ganglionated plexuses, myenteric and submucosal, composed of neurons and enteric glial cells (EGCs). Neurons of the myenteric plexus (or Auerbach's plexus) (MP) control the activity of the smooth muscle of the gut, whereas those in the submucosal plexus (or Meissner's plexus) (SMP) regulate mucosal secretion and blood flow (Schemann & Neunlist, 2004). The ENS controls gut motility and secretion via local reflexes that are triggered by local distension of the intestinal wall, distortion of the mucosa, and chemical contents in the lumen. These reflexes involve parallel circuits of synaptically interconnected ENS neurons. This neuronal regulation of GI functions is due to the liberation of specific neuromediators synthesized by functionally defined enteric neurons. For instance, among the most common neurotransmitters in the ENS, vasoactive intestinal peptide (VIP) and nitric oxide are often found in inhibitory muscle motoneurons, and acetylcholine and substance P are found in excitatory motoneurons (Schemann & Neunlist, 2004).

There is also a relatively small proportion of dopaminergic neurons in the ENS. Enteric dopaminergic neurons, which express tyrosine hydroxylase (TH) and the dopamine transporter but lack dopamine β -hydroxylase, have been identified in mouse, guinea pig (Li *et al.*,

Correspondence: Dr P. Derkinderen, ¹Inserm, U913, as above.
E-mail: derkinderenp@yahoo.fr

Received 10 May 2009, revised 5 June 2009, accepted 29 June 2009

2004), and human (Anlauf *et al.*, 2003). Moreover, all subtypes of dopaminergic receptor (D1–D5) are expressed by enteric neurons (Li *et al.*, 2004). Approximately 10–13% of both myenteric and submucosal neurons in the ileum and bowel of mice are dopaminergic (Li *et al.*, 2004). In humans, a detailed survey of the proportion of dopaminergic neurons has clearly demonstrated that these neurons are distributed along an oral–aboral gradient. Dopaminergic neurons are abundant in both plexuses of the upper GI tract, accounting for 14–20% of the total enteric neurons, whereas their proportion decreases to 1–6% in the lower small intestine and large intestine (Anlauf *et al.*, 2003). A comprehensive review of the putative role of dopaminergic neurons in the ENS has been recently published (Natale *et al.*, 2008b). Although their precise function remains largely unclear, it has been suggested that enteric dopaminergic neurons exert an inhibitory effect upon motility because: (i) electrically induced contractions of mouse colon smooth muscle are decreased in dopamine transporter knockout mice (Walker *et al.*, 2000); and (ii) mice invalidated for the gene encoding D2 have an increase in intestinal motility (Li *et al.*, 2006).

The most abundant cells in the ENS are EGCs (approximately four EGCs for one neuron), which are adjacent to the neurons in the enteric ganglia and envelop both their cell bodies and axon bundles (Ruhl, 2005). It is suggested that EGCs represent the ENS counterpart of CNS astrocytes, as they resemble astrocytes both morphologically and immunohistochemically (Jessen & Mirsky, 1980; Gabella, 1981; Ferri *et al.*, 1982). Likewise, 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 (Bassotti *et al.*, 2006; Neunlist *et al.*, 2007; Savidge *et al.*, 2007).

The ENS is connected to the CNS

Although the ENS can function independently from the CNS, the ENS is connected to the CNS through both afferent and efferent pathways of the parasympathetic and sympathetic nervous systems (Fig. 1). Beyond their role in the regulation of ENS functions by the CNS, these connections, as further discussed, are likely to be critically involved in the pathophysiology of PD.

Afferent pathways

Primary afferent neurons that carry sensory information to the CNS are located in the vagal and sympathetic (splanchnic) nerves. The primary vagal afferent neurons in the smooth muscle layer are sensitive to mechanical distension of the gut, whereas primary vagal afferent neurons in the mucosa are sensitive to luminal concentrations of glucose, amino acids, or long-chain fatty acids (Berthoud & Neuhuber, 2000). These neurons, whose cell bodies are located in the vagal (nodose and jugular) ganglia, project to the nucleus of the solitary tract and initiate several vagovagal reflexes affecting swallowing, gut motility, and secretion. Splanchnic primary afferent neurons have their endings in the gut wall and their cell bodies in the dorsal root ganglia. These afferent neurons are mostly nociceptors and are involved in sensing pain in the GI tract (Mei, 1985).

Efferent pathways

The parasympathetic motor efferent pathways consist of the vagus nerves, which control the motor and secretomotor functions of the upper GI tract, and the sacral nerves, which regulate the functions of the distal colon and rectum (Kirchgeßner & Gershon, 1989). The

vagal efferent innervation of the upper GI tract originates from two nuclei of the medulla, the dorsal motor nucleus of the vagus (DMV) and the nucleus ambiguus (Hopkins *et al.*, 1996). The nucleus ambiguus contains non-autonomic somatomotor neurons that innervate the striate muscle of the pharynx, larynx, and esophagus. The DMV contains visceromotor preganglionic neurons that extensively innervate the neurons of the MP and SMP of the ENS (Hopkins *et al.*, 1996; Walter *et al.*, 2009). All vagal efferents use acetylcholine as their primary neurotransmitter.

The ENS of PD patients is affected by the pathological process of the disease

The two pathological hallmarks of PD are a loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra (SN) and the presence of cytoplasmic eosinophilic inclusions termed Lewy bodies (LBs) and Lewy neurites (LNs) in the remaining surviving neurons (Duyckaerts, 2000). Until recently, the identification of LBs and LNs was mainly based on histochemical staining. This changed in 1997, when Polymeropoulos *et al.* reported that a mutation in the gene encoding α -synuclein, a synaptic protein of still largely unknown function, was responsible for a rare familial form of PD (Duyckaerts, 2000; Shults, 2006). Following this discovery, several research groups quickly reported that α -synuclein was the major component of LBs (Spillantini *et al.*, 1997, 1998; Irizarry *et al.*, 1998; Wakabayashi *et al.*, 1998). Since then, immunolabeling with α -synuclein antibodies has become the reference standard in the assessment of LBs and LNs in both the CNS and peripheral nervous system (Shults, 2006).

The degeneration of neurons in the SN leads to a striatal dopamine deficiency, which is responsible for the major motor symptoms of the disease, such as slowness of movement, rest tremor, and rigidity (Thobois *et al.*, 2005). Nevertheless, it has become increasingly evident that PD is a multicentric neurodegenerative process that affects several neuronal structures outside the SN (Braak & Del Tredici, 2008, 2009). Various reports have suggested that, among these structures, the ENS is affected by the pathological process of PD (Braak & Del Tredici, 2008, 2009). In a seminal paper, Qualman *et al.* (1984) compared the neuropathological features in autopsies of 22 PD patients and 50 controls matched for age and sex. Among PD patients, three suffered from upper GI symptoms, especially dysphagia. LBs were found in the MP in two of three PD patients suffering from dysphagia. In contrast, no GI tract LBs were identified in PD patients without dysphagia or in controls. A subsequent case report showed the presence of LBs in the colonic submucosal and myenteric neurons of a patient with PD and colon motility disorders (Kupsky *et al.*, 1987), further supporting the assumption that LBs are present in the ENS of PD patients with GI symptoms.

These first observations led to further systematic assessment of the presence of LBs in the ENS of PD patients. Wakabayashi *et al.* (1988) found LBs in the GI tracts of seven consecutive autopsied PD patients. The LBs were distributed widely in both the MP and SMP, from the upper esophagus to the rectum. They occurred in neuronal cell bodies and processes, and were most frequent and numerous in the MP of the lower esophagus. Interestingly, LBs were also present in eight of 24 age-matched controls, although they were fewer in number. The same group performed additional immunohistochemical analyses of specimens from three autopsied patients with PD in an attempt to find the subtypes of enteric neurons that contain LBs (Wakabayashi *et al.*, 1992). Most LBs were found in the VIP-immunoreactive neuronal cell bodies and processes in the three patients. They were mostly encountered in the MP of the lower esophagus in two patients, and they were uniformly distributed along the whole digestive tract and the

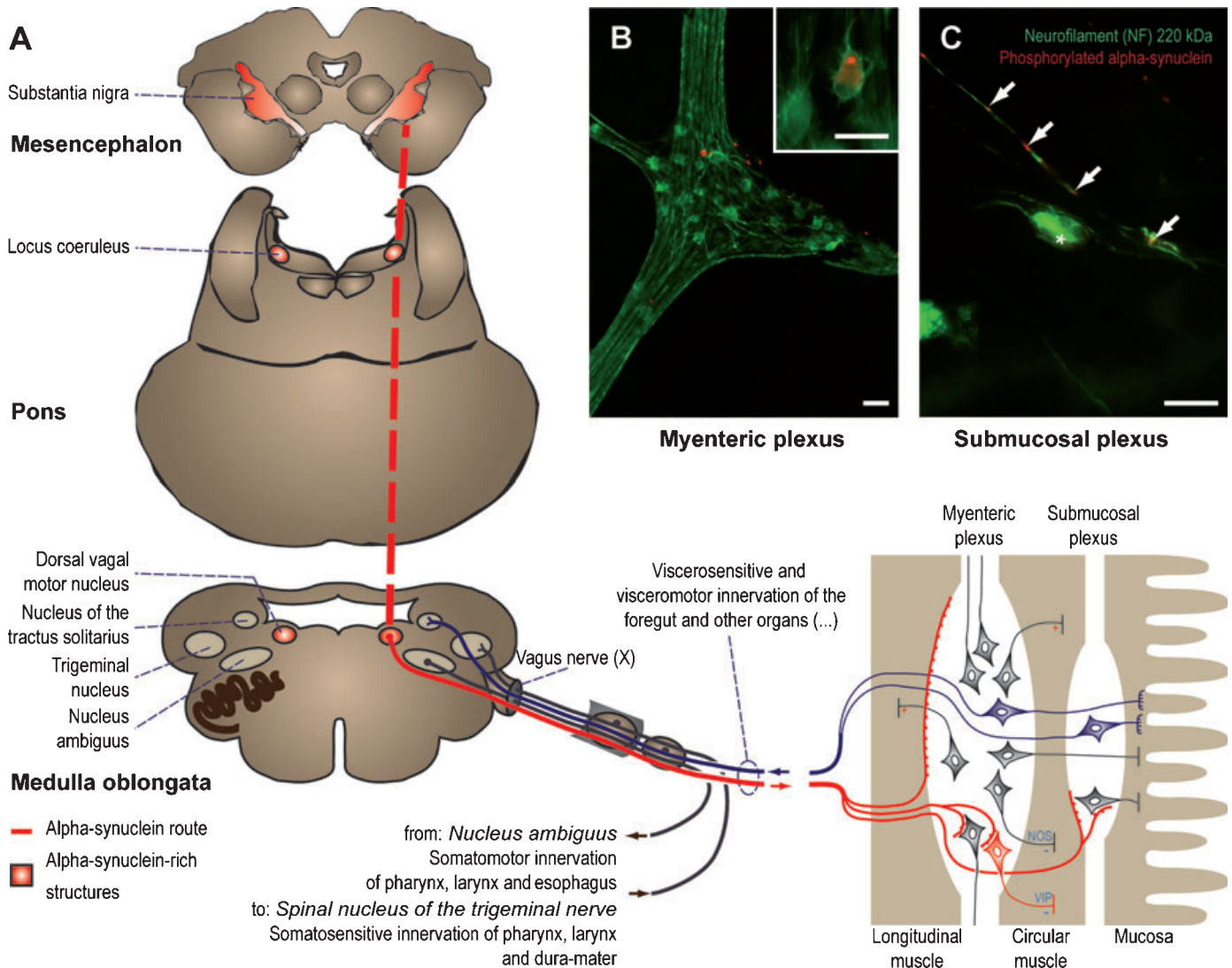


FIG. 1. (A) α -Synuclein pathway. A high endogenous content of α -synuclein seems to predispose the neural structures to the degenerative changes observed in Parkinson's disease (PD). Within the brainstem, the dorsal motor nucleus of the vagus nerve, locus coeruleus and substantia nigra (shaded red) are intrinsically rich in α -synuclein. Interestingly, vagal efferent axons (red), which are the only ones to degenerate in PD, are differentiated from the afferent fibers (blue) by selective α -synuclein expression. Finally, preliminary data show that α -synuclein expression is heterogeneous within enteric neurons. Although the phenotype of α -synuclein-rich neurons remains to be determined, it is tempting to speculate that they are the ones prone to form inclusions [here, a presumably α -synuclein-rich VIPergic neuron is depicted in red in the myenteric plexus (MP)]. Hence, a putative retrograde and ascending pathway following α -synuclein-rich structures can be drawn, from the ENS towards the CNS. (B) Whole mount of colonic MP from an end-stage PD patient (autopsy sample). Double labeling with antibodies against neurofilament and phosphorylated α -synuclein reveals some Lewy neurites (arrow) in most of the myenteric ganglia, and occasional LBs (inset). (C) Whole mount of colonic submucosal plexus from a living PD patient (colonoscopic biopsy). Although no intrinsic submucosal neuron seems to be affected, the same immunolabeling shows degenerative changes within presumably extrinsic fibers (arrows). Asterisk: submucosal ganglion. NOS, nitric oxide synthase.

two plexuses in the third. Interestingly, LB-containing TH-immunoreactive neurons were also found in the three patients, but in far lower numbers than LB-containing VIP-immunoreactive neurons. This led to the still widely accepted conclusion that LBs mainly develop in VIPergic enteric neurons during PD.

For almost 20 years, nothing new was published on GI LBs in PD patients. This topic was relaunched following the report of Braak *et al.* (2006). In this postmortem survey, they systematically compared the gastric MP and SMP from five individuals with LB diseases of increasing severity with corresponding samples from five individuals whose brains were devoid of inclusions (Braak *et al.*, 2006). Although the study lacks clinicopathological correlations, four of five individuals were presumed to have developed full-blown PD because their SN was

affected. Remarkably, one patient (who died from chronic pulmonary obstructive disease and was probably free of motor symptoms of PD) met the criteria of incidental LB disease, as inclusions were present in both the ENS and the DMV, but absent in the SN. α -Synuclein-immunoreactive inclusions were found in both the MP and the SMP, as well as in the DMV, of all LB disease individuals, including the incidental case. The inclusions observed in the SMP were reminiscent of LNs, whereas the ones observed in the MP were similar to LBs. This led Braak to make the assumption that the ENS could be targeted by the pathological process at a very early stage of the disease. Although attractive, this hypothesis has been debated extensively since then, for two reasons: (i) the paucity of cases and the lack of clinical data limit the impact of the study; and (ii) the DMV, which appears to be a

mandatory link between the ENS and CNS, was proven to be spared in a minority of otherwise proven cases of PD (Jellinger, 2008). The controversy about Braak's hypothesis is mainly due to the lack of accessibility of the ENS in living parkinsonian patients. This prompted us to develop a method aimed at the analysis of the SMP using routine biopsies obtained during colonoscopy. We showed that a single biopsy displayed a substantial number of ganglia and neurons and that it could be reliably used to perform morphometric and neurochemical analysis of the SMP (Lebouvier *et al.*, 2009). Immunohistochemical staining with an antibody against phosphorylated α -synuclein revealed that four of five PD patients had phospho- α -synuclein-immunoreactive neurites, a pattern that was absent in all eight control patients (Lebouvier *et al.*, 2008).

Is there any evidence for neuronal loss in the ENS of PD patients?

Until recently, the only study that addressed this issue was published 15 years ago by Singaram *et al.* (1995). The authors compared colonic tissue from 11 patients with advanced PD to that from 22 controls (17 patients with adenocarcinoma, and five who underwent colectomy for severe constipation). Using anti-dopamine antibodies, they showed that nine of 11 PD patients had fewer myenteric dopaminergic neurons than the controls. This was associated with a reduction in submucosal dopaminergic neurons in PD patients, but this difference did not reach statistical significance. Remarkably, in contrast with the results obtained using dopamine antibodies, there was very little difference between the groups in numbers of TH-immunoreactive neurons in either the MP or the SMP. Such a discrepancy between the number of neurons immunoreactive for TH and dopamine is quite surprising, as it has been rarely reported in the context of PD. One such example is found in the particular context of experimental parkinsonism. In mice acutely treated with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), the numbers of both TH-immunoreactive and dopamine-immunoreactive neurons in the SN were dramatically reduced at day 4 after MPTP, whereas only dopamine-immunoreactive neurons were markedly reduced in number at day 25, the number of TH-immunoreactive neurons having almost returned to normal (Mori *et al.*, 1988). This discrepancy was explained by the fact that the main effect of MPTP on the dopaminergic neurons is transient neurotoxicity, and that the TH content improves more promptly than that of dopamine in this animal model. However, such a scenario is unlikely to occur in PD, which, in contrast to experimental parkinsonism induced by acute MPTP injection, is a chronic progressive neurodegenerative disorder. This implies that the dramatic drop in the amount of dopaminergic neurons described in PD patients should be interpreted cautiously and requires further confirmation.

We have shown that routine colonic biopsies constitute a useful tool with which to study the neurochemical phenotype and the neuronal loss in the SMP. In contrast to the results of the aforementioned autopsy survey, we did not find any neuronal loss and, especially, no dopaminergic neuronal loss in the SMP of PD patients (Lebouvier *et al.*, 2008). However, the main limitation of our study is the lack of access to myenteric ganglia, which, as stated above, is likely to be primarily affected by the pathological process during PD.

Taken as a whole, these results underscore the fact that data on neuronal loss or changes in the neuronal phenotype of the ENS during PD are only scarce and preliminary. A thorough and detailed assessment of the changes in neuronal phenotype and of the neuronal loss in the ENS in PD is badly needed, not only to confirm or refute the presence of dopaminergic neuronal loss, but also to study in detail the putative changes in other subtypes of enteric neurons.

What are the consequences of the lesions of the ENS in PD?

In terms of pathophysiology, the presence of the lesions in the ENS during PD can be considered in two different ways: first, as these lesions occur at an early stage of the disease, they could play a central role in the pathophysiology of the disease *per se*, namely, in the spread of the pathological process from the gut to the brain; and second, these lesions could explain, at least in part, the GI dysfunction frequently encountered by PD patients.

Regarding the pathophysiology of PD, its precise etiology remains unknown, but it is suggested that, besides genetic factors, or in combination with them, environmental factors could be critically involved (Baldereschi *et al.*, 2008). Some recent findings suggest that, along with the ENS, the pathological process of PD also affects the olfactory bulb at a very early stage of the disease. Remarkably, the neurons of these two regions are directly in contact with the environment, leading to the postulate that they could represent a route of entry for a putative environmental factor to initiate the pathological process (Hawkes *et al.*, 2007).

Braak *et al.* (2003) determined that the appearance of α -synuclein-positive Lewy pathology initially occurs, in the earliest stage of PD, in both the ENS and DMV. This led Braak to put forth the general proposal that PD may be produced by an environmental pathogen that breaches the mucosal barrier of the GI tract and that the pathological process further spreads to the CNS via the vagal preganglionic innervation of the gut (Braak *et al.*, 2006; Hawkes *et al.*, 2007), as this has already been demonstrated for prion (McBride *et al.*, 2001) and neural tracers (Powley *et al.*, 1987). If Braak's theory is true, an uninterrupted pathway that expresses α -synuclein throughout its trajectory should allow the retrograde transport of the pathological process from the GI mucosa to the CNS. A very elegant study has recently demonstrated that such a pathway indeed exists. Phillips *et al.* (2008) have performed an in-depth characterization of α -synuclein-immunoreactive neurons in the ENS of rats. They have shown that vagal efferent axons and terminals, which originate from the DMV, are positive for α -synuclein and that some of these preganglionic efferent neurons synapse on α -synuclein-positive intrinsic neurons in the MP of both the stomach and duodenum (Phillips *et al.*, 2008). Further reinforcing the role of these neurons in the spread of the pathological process is the occurrence of α -synuclein inclusions in the DMV neurons of rats that received intragastric injections of a proteasome inhibitor (Miwa *et al.*, 2006). The identification of such a pathway provides support for the development and spread of Lewy pathology in PD (Fig. 1).

Several recent reports strongly support the idea that α -synuclein could indeed be a key element in the spread of the pathological process during PD. α -Synuclein has been shown to be secreted by neuronal cells *in vitro*, and this secreted α -synuclein is prone to aggregate (Lee *et al.*, 2005). These aggregates of α -synuclein can be taken up from the extracellular space by neurons (Sung *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2009), and induce cell death in human neuroblastoma cells (Sung *et al.*, 2001), suggesting that α -synuclein secreted into or present in the extracellular space may exert its cytotoxic effect on neighboring neuronal cells. It could then be postulated that when the excessive amounts of α -synuclein accumulate inside neurons, which eventually die, its aggregates leak out of the dead neurons and spread its cytotoxic effect to the neighboring cells. Such a hypothesis is further reinforced by the recent description of LBs in grafted neurons in PD patients. Three patients who had long-term survival of transplanted fetal mesencephalic dopaminergic neurons, for more than 10 years, developed LBs in grafted neurons (Kordower *et al.*,

2008; Li *et al.*, 2008). Taken together, these results support a prion disease-like mechanism in the spread of the Lewy pathology, relying on α -synuclein misfolding and post-translational changes, which may account for the transmission of the pathological process from the ENS to the CNS (Haik *et al.*, 2004). In this context, a cellular approach is critical to decipher the mechanisms and signaling pathways involved in the effects of α -synuclein. We have recently developed primary cultures of ENS (Chevalier *et al.*, 2008) whose enteric neurons express α -synuclein (S. Paillusson, T. Lebouvier, M. Neunlist and P. Derkinderen, unpublished data), and which are therefore likely to be useful in such experiments.

Regarding the pathophysiology of GI dysfunction in PD, the lesions of the ENS are commonly considered as being responsible for these debilitating digestive symptoms (Pfeiffer, 2003). Nothing is less certain. As stated above, the available data on the structural and neurochemical alterations of myenteric neurons are poor, and it can be suggested that the lesions of the medullar, spinal and peripheral autonomic nervous system, which are also present in PD patients, are sufficient to induce GI dysfunction (Wakabayashi & Takahashi, 1997; Benarroch *et al.*, 2005). It is likely that the respective roles of intrinsic and extrinsic innervation in GI dysfunction during PD will be difficult to solve. As pointed out recently in a comprehensive review (Probst *et al.*, 2008), there is hitherto no reported case of an enteric synucleinopathy without lesions in the DMV.

In this regard, multiple system atrophy, a neurodegenerative disorder belonging to the atypical parkinsonian syndromes, provides some interesting clues concerning the respective roles of extrinsic and intrinsic innervations in the pathophysiology of GI dysfunction. Multiple system atrophy is characterized by an early and severe pansystemic degeneration, due to the massive degeneration of the autonomic nucleus of the brainstem and spinal cord (Benarroch *et al.*, 2005, 2006). In contrast to PD, where postsynaptic peripheral neurons degenerate first (including those from the ENS), multiple system atrophy can be considered as a paradigmatic extrinsic dysautonomia. In this disorder, the postsynaptic intrinsic neurons are indeed spared or affected later, in a centrifugal pattern (Sone *et al.*, 2005). Interestingly, GI dysfunction in general and constipation in particular have the same prevalence and severity in multiple system atrophy and PD, suggesting that extrinsic lesions prevail in causing digestive symptoms (Wenning *et al.*, 1994; Stocchi *et al.*, 2000).

What can animal models tell us about the ENS in PD?

Animal models of PD are essential tools with which to identify novel therapeutic targets and test potential therapies. As the loss of nigrostriatal dopaminergic neurons has been identified as the main pathological feature of PD, the field has been dominated by toxin-based models, in which a neurotoxin is administered either peripherally or locally to destroy nigrostriatal neurons (Dauer & Przedborski, 2003). For instance, classical animal models of PD have utilized dopaminergic neurotoxins such as 6-hydroxydopamine and MPTP. More recently, human genetic linkage studies have identified several genes responsible for familial forms of PD, and prompted the development of transgenic models to explore the function of these genes (e.g. α -synuclein, *DJ-1*, *LRRK2*, *Parkin*, and *PINK1*) (Chesselet, 2008).

In contrast to the body of literature devoted to MPTP effects in the CNS, there have been few reports focusing on the effects of this toxin on the ENS. Immunohistochemically characterizing the MP of mice acutely treated with MPTP, Anderson *et al.* (2007) found a 40% decrease in the proportion of enteric dopaminergic neurons as compared with controls, but no differences in the density of

cholinergic or nitrergic neurons. The functional characterization of these mice revealed that MPTP induced a transient increase in colon motility, but no changes in gastric emptying or small intestine transit, in contrast to the decrease in GI motility seen in PD patients. The toxicity of MPTP for enteric dopaminergic neurons in mice was further confirmed in a subsequent study (Natale *et al.*, 2008a). The presence of α -synuclein aggregates has not been assessed or reported in these two models, probably because most MPTP models, with few exceptions (Kowall *et al.*, 2000; McCormack *et al.*, 2008), do not reproduce the pathological hallmark of PD, namely LBs and LNs (Dauer & Przedborski, 2003).

In order to more closely mimic the progressive neurodegenerative process of PD, a chronic regimen administration of MPTP has been developed in primates (Bezard *et al.*, 2001). We have recently undertaken an in-depth characterization of changes in the colonic neuronal and glial phenotype in such a model (Chaumette *et al.*, 2009). In the MP of monkeys treated with chronic MPTP, we observed a significant increase in the number of neurons per ganglia, especially nitric oxide-immunoreactive neurons. This was associated with a concomitant 75% decrease in the number of TH-immunoreactive neurons. We have hypothesized that this increase in the number of nitrergic neurons could represent an adaptive response to the drop in the number of dopaminergic neurons, as both subsets of neurons exert an inhibitory effect on GI motility. In parallel with the changes observed in the MP, a significant 50% decrease was observed in the proportion of TH-immunoreactive neurons in the SMP of MPTP monkeys. This reinforces the fact that the two structures are affected during the course of PD and that they should be systematically assessed in studies performed in PD patients and animal models of the disease.

Among the numerous genetic animal models of PD that have been generated over the last 10 years, only one study addressed the 'ENS issue'. This research was conducted in mice that overexpressed α -synuclein under the control of a pan-neuronal promoter, Thy-1 (Wang *et al.*, 2008). These mice displayed alterations in propulsive colonic motor activity reminiscent of colonic dysmotility encountered by PD patients. A further and complementary study showed that these mice also displayed olfactory dysfunction associated with the presence of α -synuclein aggregates in olfactory neurons (Fleming *et al.*, 2008). In a subsequent review on transgenic animal models of PD, the authors stated that this model could be relevant as a 'presymptomatic' or 'early stage' model of PD by recapitulating two of the main early features of the disease, namely GI and olfactory dysfunction (Chesselet, 2008). Nevertheless, regarding the ENS, an immunohistochemical characterization is lacking, and further experiments need to be performed to search for evidence of enteric intraneuronal inclusions and/or changes in the neurochemical phenotype in this model.

Following this brief overview, one question remains: among the animal models of PD used to study the pathological changes in the CNS, which one(s) is (are) likely to be the best candidate(s) to study, in parallel, those in the ENS? Taking into consideration what we know (and do not know) about the ENS in parkinsonian patients, it is obvious that LBs and LNs are present in both the SMP and the MP of PD patients, and that these lesions affect not only TH-immunoreactive neurons but also other subtypes of enteric neurons, such as VIPergic neurons. In contrast, as already mentioned, data on the changes in the neurochemical phenotype and neuronal loss, as well as their functional significance in PD patients, are still speculative and preliminary. Thus, it can be postulated that the main feature required for an animal model of PD to be considered as relevant to the ENS would be the presence of widespread α -synuclein aggregates in enteric neurons. To date, such pathological changes have not been described, and further studies

using other animal models in which all types of enteric neurons can be targeted by the pathological process are required. Regarding the toxic models of the disease, the pesticide rotenone (Betarbet *et al.*, 2000) has been shown to induce parkinsonism in rodents and Lewy pathology in both dopaminergic and non-dopaminergic neurons of the CNS, suggesting that it could also be relevant to study the ENS in such a model. Indeed, during the preparation of the present article, Greene *et al.* (2009) reported that systemic administration with rotenone induced decreases in both gastric emptying and stool frequency in rats. Nevertheless, and quite surprisingly, no alterations in the number of enteric neurons or in their phenotype, in particular no intracellular aggregates, were found in the rats treated with rotenone (Greene *et al.*, 2009). This implies that the route of administration of the toxin may be critical for the development of Lewy pathology in enteric neurons. Logically, oral administration is more likely to target primarily enteric neurons and to mimic the pesticide exposure that occurs in normal life. Of particular interest in this context is the recent development of a reproducible mouse model of synucleinopathy following chronic oral ingestion of rotenone (Inden *et al.*, 2007). The assessment of neurodegenerative changes in this model was restricted to the CNS, but it may be a useful tool with which to reproduce the enteric neuropathy of PD. Eventually, another tempting strategy to elicit diffuse enteric Lewy pathology would be to use a toxic approach in a genetic model of PD, for example rotenone intoxication in mice transgenic for α -synuclein.

Conclusion

Thanks to a few pathological and experimental investigations, the long-forgotten ENS has recently become once more of interest in PD. Despite this revival, further studies are needed in order to clarify the alterations of the ENS in PD, and especially to assess in detail the changes in the neurochemical phenotype and putative neurochemical loss in parkinsonian patients. These studies are a mandatory first step for the further development of relevant animal models of PD that will recapitulate the lesions of the ENS seen in humans.

Acknowledgements

Research in our group is supported by grants from Fondation de France, CECAP and ADPLA (association des parkinsoniens de Loire Atlantique), Groupement de Parkinsoniens de Vendée, France Parkinson and Inserm/DHOS (to P. Derkinderen and M. Neunlist). P. Derkinderen and M. Neunlist are recipients of a Contrat d'Interface Inserm. T. Lebouvier is a recipient of poste d'accueil INSERM.

Abbreviations

CNS, central nervous system; DMV, dorsal motor nucleus of the vagus; EGC, enteric glial cell; ENS, enteric nervous system; GI, gastrointestinal; LB, Lewy body; LN, Lewy neurite; MP, myenteric plexus; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; PD, Parkinson's disease; SMP, submucosal plexus; SN, substantia nigra; TH, tyrosine hydroxylase; VIP, vasoactive intestinal peptide.

References

Anderson, G., Noorian, A.R., Taylor, G., Anitha, M., Bernhard, D., Srinivasan, S. & Greene, J.G. (2007) Loss of enteric dopaminergic neurons and associated changes in colon motility in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.*, **207**, 4–12.

Anlauf, M., Schafer, M.K., Eiden, L. & Weihe, E. (2003) Chemical coding of the human gastrointestinal nervous system: cholinergic, VIPergic, and catecholaminergic phenotypes. *J. Comp. Neurol.*, **459**, 90–111.

Baldereschi, M., Inzitari, M., Vanni, P., Di Carlo, A. & Inzitari, D. (2008) Pesticide exposure might be a strong risk factor for Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, **63**, 128.

Bassotti, G., Villanacci, V., Maurer, C.A., Fisogni, S., Di Fabio, F., Cadei, M., Morelli, A., Panagiotis, T., Cathomas, G. & Salerni, B. (2006) The role of glial cells and apoptosis of enteric neurones in the neuropathology of intractable slow transit constipation. *Gut*, **55**, 41–46.

Benarroch, E.E. (2007) Enteric nervous system: functional organization and neurologic implications. *Neurology*, **69**, 1953–1957.

Benarroch, E.E., Schmeichel, A.M., Low, P.A., Boeve, B.F., Sandroni, P. & Parisi, J.E. (2005) Involvement of medullary regions controlling sympathetic output in Lewy body disease. *Brain*, **128**, 338–344.

Benarroch, E.E., Schmeichel, A.M., Sandroni, P., Low, P.A. & Parisi, J.E. (2006) Involvement of vagal autonomic nuclei in multiple system atrophy and Lewy body disease. *Neurology*, **66**, 378–383.

Berthoud, H.R. & Neuhuber, W.L. (2000) Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Auton. Neurosci.*, **85**, 1–17.

Betarbet, R., Sherer, T.B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A.V. & Greenamyre, J.T. (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.*, **3**, 1301–1306.

Bezard, E., Dovero, S., Prunier, C., Ravenscroft, P., Chalon, S., Guilloteau, D., Crossman, A.R., Bioulac, B., Brotchie, J.M. & Gross, C.E. (2001) Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.*, **21**, 6853–6861.

Braak, H. & Del Tredici, K. (2008) Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. *Neurology*, **70**, 1916–1925.

Braak, H. & Del Tredici, K. (2009) Neuroanatomy and pathology of sporadic Parkinson's disease. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.*, **201**, 1–119.

Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R.A., Jansen Steur, E.N. & Braak, E. (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging*, **24**, 197–211.

Braak, H., de Vos, R.A., Bohl, J. & Del Tredici, K. (2006) Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci. Lett.*, **396**, 67–72.

Chaumette, T., Lebouvier, T., Aubert, P., Lardeux, B., Qin, C., Li, Q., Accary, D., Bezard, E., Bruley des Varannes, S., Derkinderen, P. & Neunlist, M. (2009) Neurochemical plasticity in the enteric nervous system of a primate animal model of experimental Parkinsonism. *Neurogastroenterol. Motil.*, **21**, 215–222.

Chesselet, M.F. (2008) In vivo alpha-synuclein overexpression in rodents: a useful model of Parkinson's disease? *Exp. Neurol.*, **209**, 22–27.

Chevalier, J., Derkinderen, P., Gomes, P., Thinard, R., Naveilhan, P., Vanden Berghe, P. & Neunlist, M. (2008) Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system. *J. Physiol.*, **586**, 1963–1975.

Dauer, W.T. & Przedborski, S. (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, **39**, 889–909.

Duyckaerts, C. (2000) [Lewy bodies.] *Rev. Neurol.*, **156**, 800–801.

Ferri, G.L., Probert, L., Cocchia, D., Michetti, F., Marangos, P.J. & Polak, J.M. (1982) Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system. *Nature*, **297**, 409–410.

Fleming, S.M., Tetreault, N.A., Mulligan, C.K., Hutson, C.B., Masliah, E. & Chesselet, M.F. (2008) Olfactory deficits in mice overexpressing human wildtype alpha-synuclein. *Eur. J. Neurosci.*, **28**, 247–256.

Gabella, G. (1981) Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: the enteric glial cells. *Neuroscience*, **6**, 425–436.

Goyal, R.K. & Hirano, I. (1996) The enteric nervous system. *N. Engl. J. Med.*, **334**, 1106–1115.

Greene, J.G., Noorian, A.R. & Srinivasan, S. (2009) Delayed gastric emptying and enteric nervous system dysfunction in the rotenone model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.*, **218**, 154–161.

Haik, S., Faucheux, B.A. & Hauw, J.J. (2004) Brain targeting through the autonomous nervous system: lessons from prion diseases. *Trends. Mol. Med.*, **10**, 107–112.

Hawkes, C.H., Del Tredici, K. & Braak, H. (2007) Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **33**, 599–614.

Hopkins, D.A., Bieger, D., deVente, J. & Steinbusch, W.M. (1996) Vagal efferent projections: viscerotopy, neurochemistry and effects of vagotomy. *Prog. Brain Res.*, **107**, 79–96.

Inden, M., Kitamura, Y., Takeuchi, H., Yanagida, T., Takata, K., Kobayashi, Y., Taniguchi, T., Yoshimoto, K., Kaneko, M., Okuma, Y., Taira, T., Ariga, H. & Shimohama, S. (2007) Neurodegeneration of mouse nigrostriatal dopami-

- nergic system induced by repeated oral administration of rotenone is prevented by 4-phenylbutyrate, a chemical chaperone. *J. Neurochem.*, **101**, 1491–1504.
- Irizarry, M.C., Growdon, W., Gomez-Isla, T., Newell, K., George, J.M., Clayton, D.F. & Hyman, B.T. (1998) Nigral and cortical Lewy bodies and dystrophic nigral neurites in Parkinson's disease and cortical Lewy body disease contain alpha-synuclein immunoreactivity. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **57**, 334–337.
- Jellinger, K.A. (2008) A critical evaluation of current staging of alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Biochim. Biophys. Acta*, **1792**, 730–740.
- Jessen, K.R. & Mirsky, R. (1980) Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature*, **286**, 736–737.
- Kirchgessner, A.L. & Gershon, M.D. (1989) Identification of vagal efferent fibers and putative target neurons in the enteric nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.*, **285**, 38–53.
- Kordower, J.H., Chu, Y., Hauser, R.A., Freeman, T.B. & Olanow, C.W. (2008) Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat. Med.*, **14**, 504–506.
- Kowall, N.W., Hantraye, P., Brouillet, E., Beal, M.F., McKee, A.C. & Ferrante, R.J. (2000) MPTP induces alpha-synuclein aggregation in the substantia nigra of baboons. *Neuroreport*, **11**, 211–213.
- Kupsky, W.J., Grimes, M.M., Sweeting, J., Bertsch, R. & Cote, L.J. (1987) Parkinson's disease and megacolon: concentric hyaline inclusions (Lewy bodies) in enteric ganglion cells. *Neurology*, **37**, 1253–1255.
- Lebouvier, T., Chaumette, T., Damier, P., Coron, E., Touchefeu, Y., Vignaud, S., Naveilhan, P., Galmiche, J.P., Bruley des Varannes, S., Derkinderen, P. & Neunlist, M. (2008) Pathological lesions in colonic biopsies during Parkinson's disease. *Gut*, **57**, 1741–1743.
- Lebouvier, T., Coron, E., Chaumette, T., Paillusson, S., Bruley des Varannes, S., Neunlist, M. & Derkinderen, P. (2009) Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients. *Neurogastroenterol. Motil.*, (in press).
- Lee, H.J., Patel, S. & Lee, S.J. (2005) Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *J. Neurosci.*, **25**, 6016–6024.
- Li, Z.S., Pham, T.D., Tamir, H., Chen, J.J. & Gershon, M.D. (2004) Enteric dopaminergic neurons: definition, developmental lineage, and effects of extrinsic denervation. *J. Neurosci.*, **24**, 1330–1339.
- Li, Z.S., Schmauss, C., Cuenca, A., Ratcliffe, E. & Gershon, M.D. (2006) Physiological modulation of intestinal motility by enteric dopaminergic neurons and the D2 receptor: analysis of dopamine receptor expression, location, development, and function in wild-type and knock-out mice. *J. Neurosci.*, **26**, 2798–2807.
- Li, J.Y., Englund, E., Holton, J.L., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A.J., Lashley, T., Quinn, N.P., Rehncrona, S., Bjorklund, A., Widner, H., Revesz, T., Lindvall, O. & Brundin, P. (2008) Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat. Med.*, **14**, 501–503.
- Liu, J., Zhang, J.P., Shi, M., Quinn, T., Bradner, J., Beyer, R., Chen, S. & Zhang, J. (2009) Rab11a and HSP90 regulate recycling of extracellular alpha-synuclein. *J. Neurosci.*, **29**, 1480–1485.
- McBride, P.A., Schulz-Schaeffer, W.J., Donaldson, M., Bruce, M., Diringer, H., Kretschmar, H.A. & Beekes, M. (2001) Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. *J. Virol.*, **75**, 9320–9327.
- McCormack, A.L., Mak, S.K., Shenasa, M., Langston, W.J., Forno, L.S. & Di Monte, D.A. (2008) Pathologic modifications of alpha-synuclein in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated squirrel monkeys. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **67**, 793–802.
- Mei, N. (1985) Intestinal chemosensitivity. *Physiol. Rev.*, **65**, 211–237.
- Miwa, H., Kubo, T., Suzuki, A. & Kondo, T. (2006) Intragastric proteasome inhibition induces alpha-synuclein-immunopositive aggregations in neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus in rats. *Neurosci. Lett.*, **401**, 146–149.
- Mori, S., Fujitake, J., Kuno, S. & Sano, Y. (1988) Immunohistochemical evaluation of the neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on dopaminergic nigrostriatal neurons of young adult mice using dopamine and tyrosine hydroxylase antibodies. *Neurosci. Lett.*, **90**, 57–62.
- Natale, G., Kastsichenko, O., Pasquali, L., Ruggieri, S., Paparelli, A. & Fornai, F. (2008a) MPTP- but not methamphetamine-induced parkinsonism extends to catecholamine neurons in the gut. *Ann. NY Acad. Sci.*, **1139**, 345–349.
- Natale, G., Pasquali, L., Ruggieri, S., Paparelli, A. & Fornai, F. (2008b) Parkinson's disease and the gut: a well known clinical association in need of an effective cure and explanation. *Neurogastroenterol. Motil.*, **20**, 741–749.
- Neunlist, M., Aubert, P., Bonnaud, S., Van Landeghem, L., Coron, E., Wedel, T., Naveilhan, P., Ruhl, A., Lardeux, B., Savidge, T., Paris, F. & 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**, G231–241.
- Pfeiffer, R.F. (2003) Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.*, **2**, 107–116.
- Phillips, R.J., Walter, G.C., Wilder, S.L., Baronowsky, E.A. & Powley, T.L. (2008) Alpha-synuclein-immunopositive myenteric neurons and vagal preganglionic terminals: autonomic pathway implicated in Parkinson's disease? *Neuroscience*, **153**, 733–750.
- Powley, T.L., Fox, E.A. & Berthoud, H.R. (1987) Retrograde tracer technique for assessment of selective and total subdiaphragmatic vagotomies. *Am. J. Physiol.*, **253**, R361–370.
- Probst, A., Bloch, A. & Tolnay, M. (2008) New insights into the pathology of Parkinson's disease: does the peripheral autonomic system become central? *Eur. J. Neurol.*, **15**(Suppl 1), 1–4.
- Qualman, S.J., Haupt, H.M., Yang, P. & Hamilton, S.R. (1984) Esophageal Lewy bodies associated with ganglion cell loss in achalasia. Similarity to Parkinson's disease. *Gastroenterology*, **87**, 848–856.
- Ruhl, A. (2005) Glial cells in the gut. *Neurogastroenterol. Motil.*, **17**, 777–790.
- Savidge, T.C., Newman, P., Pothoulakis, C., Ruhl, A., Neunlist, M., Bourreille, A., Hurst, R. & Sofroniew, M.V. (2007) Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology*, **132**, 1344–1358.
- Schemann, M. & Neunlist, M. (2004) The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol. Motil.*, **16**(Suppl 1), 55–59.
- Shults, C.W. (2006) Lewy bodies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 1661–1668.
- Singaram, C., Ashraf, W., Gaumnitz, E.A., Torbey, C., Sengupta, A., Pfeiffer, R. & Quigley, E.M. (1995) Dopaminergic defect of enteric nervous system in Parkinson's disease patients with chronic constipation. *Lancet*, **346**, 861–864.
- Sone, M., Yoshida, M., Hashizume, Y., Hishikawa, N. & Sobue, G. (2005) alpha-Synuclein-immunoreactive structure formation is enhanced in sympathetic ganglia of patients with multiple system atrophy. *Acta Neuropathol.*, **110**, 19–26.
- Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R. & Goedert, M. (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, **388**, 839–840.
- Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M. & Goedert, M. (1998) alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 6469–6473.
- Stocchi, F., Badiali, D., Vacca, L., D'Alba, L., Bracci, F., Ruggieri, S., Torti, M., Berardelli, A. & Corazzini, E. (2000) Anorectal function in multiple system atrophy and Parkinson's disease. *Mov. Disord.*, **15**, 71–76.
- Sung, J.Y., Kim, J., Paik, S.R., Park, J.H., Ahn, Y.S. & Chung, K.C. (2001) Induction of neuronal cell death by Rab5A-dependent endocytosis of alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.*, **276**, 27441–27448.
- Thobois, S., Delamare-Damier, F. & Derkinderen, P. (2005) Treatment of motor dysfunction in Parkinson's disease: an overview. *Clin. Neurol. Neurosurg.*, **107**, 269–281.
- Wakabayashi, K. & Takahashi, H. (1997) Neuropathology of autonomic nervous system in Parkinson's disease. *Eur. Neurol.*, **38**(Suppl 2), 2–7.
- Wakabayashi, K., Takahashi, H., Takeda, S., Ohama, E. & Ikuta, F. (1988) Parkinson's disease: the presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses. *Acta Neuropathol.*, **76**, 217–221.
- Wakabayashi, K., Takahashi, H., Obata, K. & Ikuta, F. (1992) Immunocytochemical localization of synaptic vesicle-specific protein in Lewy body-containing neurons in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.*, **138**, 237–240.
- Wakabayashi, K., Hayashi, S., Kakita, A., Yamada, M., Toyoshima, Y., Yoshimoto, M. & Takahashi, H. (1998) Accumulation of alpha-synuclein/NACP is a cytopathological feature common to Lewy body disease and multiple system atrophy. *Acta Neuropathol.*, **96**, 445–452.
- Walker, J.K., Gainetdinov, R.R., Mangel, A.W., Caron, M.G. & Shetzline, M.A. (2000) Mice lacking the dopamine transporter display altered regulation of distal colonic motility. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **279**, G311–318.
- Walter, G.C., Phillips, R.J., Baronowsky, E.A. & Powley, T.L. (2009) Versatile, high-resolution anterograde labeling of vagal efferent projections with dextran amines. *J. Neurosci. Methods*, **178**, 1–9.
- Wang, L., Fleming, S.M., Chesselet, M.F. & Tache, Y. (2008) Abnormal colonic motility in mice overexpressing human wild-type alpha-synuclein. *Neuroreport*, **19**, 873–876.
- Wenning, G.K., Ben Shlomo, Y., Magalhaes, M., Daniel, S.E. & Quinn, N.P. (1994) Clinical features and natural history of multiple system atrophy. An analysis of 100 cases. *Brain*, **117**(Pt 4), 835–845.

Article 8 : Biopsable neural tissues: toward new biomarkers for Parkinson's disease?

Lebouvier T, Tasselli M, Paillusson S, Pouclet H, Neunlist M, Derkinderen P. *Biopsable neural tissues: toward new biomarkers for Parkinson's disease?* Front Psychiatry. 2010 Sep 3;1:128.

Il s'agit une revue de littérature consacrée aux biomarqueurs histologiques potentiels de la MP. Après une introduction sur la nécessité et l'intérêt de biomarqueurs fiables de la MP, les différentes approches testées à ce jour sont successivement présentées.



Biopsable neural tissues: toward new biomarkers for Parkinson's disease?

Thibaud Lebouvier^{1,2,3}, Maddalena Tasselli¹, Sébastien Paillusson^{1,2}, Hélène Pouclet^{1,3}, Michel Neunlist^{1,2} and Pascal Derkinderen^{1,2,3}*

¹ Inserm, U913, Nantes, France

² University Nantes, Nantes, France

³ Department of Neurology, CHU Nantes, France

Edited by:

Ritchie Williamson, University of Dundee, UK

Reviewed by:

Wendy Noble, King's College London, UK

Ritchie Williamson, University of Dundee, UK

Patrick A. Lewis, University College London, UK

*Correspondence:

Pascal Derkinderen, Inserm, U913, 1, Place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes Cedex 1, France.

e-mail: derkinderenp@yahoo.fr, pascal.derkinderen@chu-nantes.fr

Biomarkers for Parkinson's disease (PD) are mainly intended for the early diagnosis of the disease and to monitor its progression, two aspects insufficiently covered by clinical evaluation. In the last 20 years, the search for biomarkers has been supported by technological advances in the fields of molecular genetics and neuroimaging. Nevertheless, no fully validated biomarker is yet available, and there is still a need for biomarkers that will complement those already available. Development of biomarkers for PD has been hampered by the fact that the core pathology lies in the brainstem, hidden from direct study in living patients. In this context, the recent observations that clearly demonstrated the presence of PD pathology in peripheral neural tissues provide new opportunities to develop original histopathological markers of the disease. Some of these peripheral tissues, especially the enteric nervous system, by being assessable using routine biopsies, could represent a window to assess *in vivo* the neuropathological processes occurring in PD.

Keywords: Parkinson's disease, biomarker, alpha-synuclein, autonomic nervous system, enteric nervous system, skin, salivary glands, colonic biopsies

Development of biomarkers for PD has been hampered by the fact that the core pathology lies in the brainstem, hidden from direct study in living patients. However the traditional assumption of PD as a primary disorder of the dopaminergic neurons of the substantia nigra has been reconsidered in the recent years. Recent studies have indeed implicated that the presence of Lewy pathology is much more extensive and affects not only the central nervous system but also peripheral autonomic neuronal circuits. This provides new opportunities for the development of original biomarkers that will directly assess the pathological process in peripheral tissues accessible by biopsy.

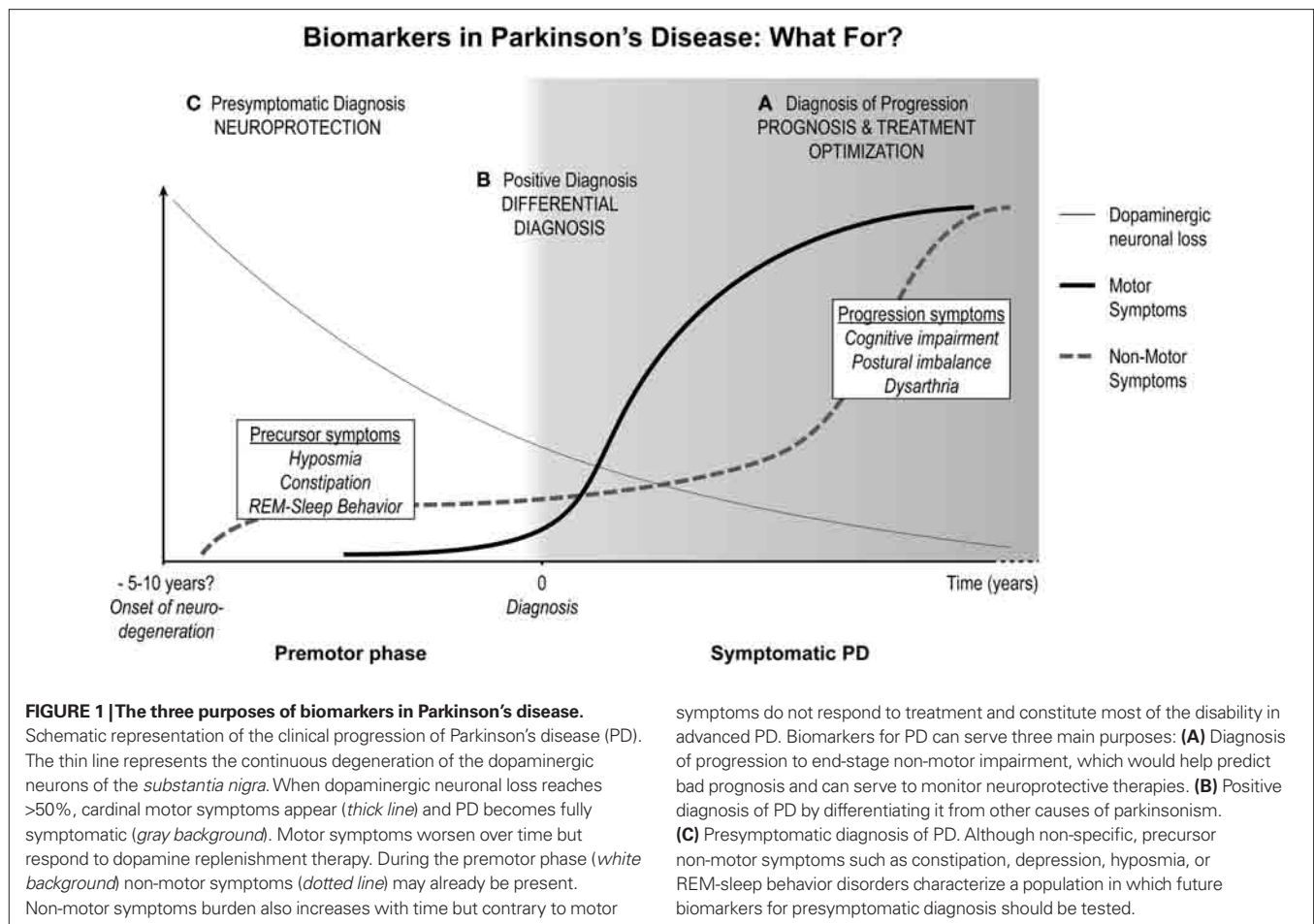
IN SEARCH OF BIOMARKERS FOR PD

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative condition characterized and diagnosed by the presence of motor and non-motor symptoms (Lees et al., 2009). From a pathological point of view, the two hallmarks of PD are a loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra and the presence in the surviving neurons of inclusions termed Lewy bodies (LB) and Lewy neurites (LN), whose main component is phosphorylated alpha-synuclein (Fujiwara et al., 2002; Anderson et al., 2006).

Parkinson's disease follows a slowly chronic progressive course, and the motor cardinal symptoms of the disease appear only when the degenerative process has progressed for a long time, in most cases probably for more than 10 years (Hawkes et al., 2009). This long premotor phase is nevertheless not clinically silent since non-motor symptoms such as hyposmia (Ponsen et al., 2004), REM-sleep behavior disorder (Postuma et al., 2009), and constipation (Abbott et al., 2001; Savica et al., 2009) can antedate the occurrence of tremor and/or akinesia. In contrast, other non-motor

symptoms, especially dementia, are known to occur lately in the evolution of the disease and to reflect disease progression and severity (Chaudhuri et al., 2006).

Currently, diagnosis and progression of PD is based mainly on clinical criteria. Diagnosis of PD relies on the presence of two out of three of major motor signs, namely tremor, bradykinesia, and hypertonias, implying that the diagnosis is made only many years after the real onset of the neurodegenerative process (Hughes et al., 2002). PD can be difficult to diagnose in its early stages, and may be mimicked by other diseases, such as essential tremor, multiple system atrophy and progressive supranuclear palsy (Hughes et al., 2002). Treatment strategies for PD are mostly aimed at relieving motor symptoms and not at modifying the disease process (Thobois et al., 2005). Therefore, a key goal in PD research is the development of drugs capable of preventing or at least slowing the disease progression. Compounding this problem is the difficulty to readily assess PD progression and/or severity. To date, most of the neuroprotective trials in PD used changes in the clinical UPDRS scale as a primary endpoint (Schapira and Olanow, 2004; Olanow et al., 2009). Such an approach is confounding since many of the drugs proposed to slow progression also improve dopaminergic neurotransmission and treat PD symptoms (Ahlskog, 2007). Consequently, there is a critical need to develop biomarkers that correlate either with the presence or the severity of the disease, for a more precise and early diagnosis of the disease as well as for the assessment of new therapeutic strategies (Figure 1). Technological advances in the field of molecular genetics and in *in vivo* imaging have allowed the development of some reliable biomarkers either for early diagnosis or to assess disease progression. For instance, transcranial ultrasound (Berg and Becker, 2002), high-field MRI



symptoms do not respond to treatment and constitute most of the disability in advanced PD. Biomarkers for PD can serve three main purposes: **(A)** Diagnosis of progression to end-stage non-motor impairment, which would help predict bad prognosis and can serve to monitor neuroprotective therapies. **(B)** Positive diagnosis of PD by differentiating it from other causes of parkinsonism. **(C)** Presymptomatic diagnosis of PD. Although non-specific, precursor non-motor symptoms such as constipation, depression, hyposmia, or REM-sleep behavior disorders characterize a population in which future biomarkers for presymptomatic diagnosis should be tested.

(Martin et al., 2008) and dosage of neuronal protein involved in the pathogenesis of the disease in the cerebrospinal fluid (Hong et al., 2010) are new tools that are likely to help in the diagnosis and management of PD patients in the near future. Nevertheless, as stated in a recent review, no fully validated biomarker for PD is available yet (Marek et al., 2008) and there is still a need for new biomarkers that will complement the ones already available.

PD PATHOLOGY EXTENDS WELL BEYOND THE SUBSTANTIA NIGRA

The traditional assumption of PD as a primary disorder of the dopaminergic neurons of the SN has been reconsidered in recent years. The SN is neither the earliest nor the most severely affected region since more caudal brainstem structures as well as the olfactory bulb are involved earlier and more severely in most cases (Del Tredici et al., 2002; Braak et al., 2003). Nuclei such as the dorsal motor nucleus of the vagus nerve display early and massive degenerative changes that worsen as the disease progresses, until a total neuronal loss is reached (Braak et al., 2002). The density of LB and LN in brainstem nuclei is thought to follow an inverted U-shaped curve, with a progressive disappearance in end-stages where no vulnerable neurons are left.

Furthermore, recent studies have demonstrated that the presence of Lewy pathology is much more extensive and affects not only the central nervous system (CNS) but also peripheral autonomic

neuronal circuits (Wakabayashi et al., 1988, 1993; Wakabayashi and Takahashi, 1997; Braak et al., 2006, 2007; Braak and Del Tredici, 2008). Interestingly, the same temporal pattern of degeneration has been demonstrated in peripheral structures such as sympathetic ganglia (Orimo et al., 2008).

Lewy pathology has been reported to be present in the olfactory bulbs of subjects with PD as well as a subset of asymptomatic subjects. The presence of Lewy inclusions in neurologically unimpaired patients is called incidental Lewy body disease (ILBD; DelleDonne et al., 2008), since it is thought to represent premotor PD (Del Tredici et al., 2002; Braak et al., 2003; Beach et al., 2010). A recent comprehensive survey has shown that LB were readily retrieved in the olfactory bulbs of 55 out of 58 autopsied patients with PD (Beach et al., 2010). The involvement of the olfactory bulb in most ILBD patients suggests that it occurs at the earliest stage of disease (Bloch et al., 2006; Beach et al., 2009).

The autonomic nervous system (ANS), composed of parasympathetic and sympathetic division, is distributed to the peripheral tissues and organs by way of autonomic ganglia. Control centers of the diencephalon and brainstem send fibers to synapse on pre-ganglionic neurons located in the brainstem or in the spinal cord. From these neurons, pre-ganglionic fibers project out of the CNS to synapse on neurons in the autonomic ganglia. Post-ganglionic fibers emerge and form terminal networks on the target tissue. The enteric nervous system (ENS) could be considered part of

the ANS and be regarded as a complex postganglionic neuronal network. The ENS contains as many neurons as the spinal cord (approximately 80–100 million neurons) and the functional and chemical diversity of enteric neurons closely resembles that of the CNS (Benarroch, 2007; Cersosimo and Benarroch, 2008). This integrated neuronal network is organized in two ganglionated plexuses, myenteric and submucosal, composed of neurons and enteric glial cells (Benarroch, 2007; Lebouvier et al., 2009a). Neurons of the myenteric plexus (or Auerbach's) control the activity of the smooth muscle of the gut whereas those in the submucosal plexus (or Meissner's) regulate mucosal secretion and blood flow (Schemmann and Neunlist, 2004).

Lewy pathology has been described in the autonomic nuclei of the brainstem and spinal cord and in the sympathetic ganglia of PD patients (Wakabayashi et al., 1988, 1993; Wakabayashi and Takahashi, 1997; Braak et al., 2006, 2007; Braak and Del Tredici, 2008) and ILBD subjects (Bloch et al., 2006; Minguez-Castellanos et al., 2007). Remarkably, LB and LN are also present in postganglionic structures. Using sampled skin from the chest and forearm of autopsied patients, Ikemura et al. (2008) demonstrated LN in the sympathetic nerve fascicles of the dermis and subcutaneous tissue in 10 out of 14 PD patients and in one of two ILBD. The autonomic innervation of the submandibular gland also displays LN with a high sensitivity in two autopsy surveys, with lesions in 14 out of 15 PD patients (Beach et al., 2010) and 9 of 9 PD patients respectively (Del Tredici et al., 2010). Moreover, LN were present in the submandibular glands of two out of three ILBD subjects (Del Tredici et al., 2010). Regarding the ENS, the presence of Lewy pathology in the gastrointestinal tract was described more than 20 years ago in two seminal reports (Qualman et al., 1984; Kupsky et al., 1987). Wakabayashi et al. (1988) found LB in the gastrointestinal tract of seven consecutive autopsies performed in PD patients and more recently Beach et al. (2010) reported LB and LN in the gut of 11 of 17 PD patients. In both studies, the Lewy pathology was distributed in the MP and SMP from the upper esophagus to the rectum following a rostrocaudal gradient, the upper esophagus being more severely affected than the colon and the rectum (Wakabayashi et al., 1988; Beach et al., 2010). Remarkably, when specific histochemical procedures were used (analysis of multiple slides of thick sections of the lower esophagus), Lewy inclusions were found in 14 out of 15 PD patients, suggesting that the pathology is scattered but nearly constant in the ENS (Beach et al., 2010). Among ILBD patients, the rate of enteric pathology varies depending on the sampling and techniques used to assess the synucleinopathy, from 1/7 to 14/17 (Bloch et al., 2006). A thorough assessment of the ENS in ILBD is still needed to test the hypothesis of its prime involvement during PD (Braak et al., 2006).

The histopathological features observed in the olfactory bulb and in the peripheral nervous system of PD patients are likely to be specific for this neurodegenerative condition. Indeed, although the olfactory bulb is constantly affected by the pathological process in multiple system atrophy, the inclusions of alpha-synuclein are mainly glial (Kovacs et al., 2003). The Lewy pathology in the peripheral nervous system of multiple system atrophy patients is primarily preganglionic and, in contrast to PD, the postganglionic network is almost completely spared (Ikemura et al., 2008; Orimo et al., 2008; Del Tredici et al., 2010). Regarding PSP, tau pathology

is minimal or absent in the olfactory bulb and no specific involvement of the peripheral nervous system has been reported yet (Rub et al., 2002).

Altogether, these results demonstrate that PD pathology extends well beyond the substantia nigra and that the peripheral autonomic neuronal circuits are affected early, and specifically in a large proportion of patients.

BIOPSABLE NEURAL TISSUES AS A NEW SOURCE OF BIOMARKER OF PD

Remarkably, some of the extranigral structures affected by Lewy pathology are accessible to biopsies, making them a putative original source of biomarkers. As the only component of the olfactory system accessible to biopsy, olfactory epithelium was logically screened for Lewy pathology. In a pilot study, there was no evidence of disease-specific pathology in seven hypo/anosmic PD patients (Witt et al., 2009). This is probably explained by the fact that the pathology in the olfactory system is restricted to the olfactory bulb, a structure that is not accessible to routine biopsies (Parkkinen et al., 2009).

Quite logically, from the results obtained in autopsy specimens, a Japanese team attempted to retrieve Lewy pathology using routine skin biopsies from chest and leg. The results were disappointing as only two patients were positive in a series of 20 parkinsonian patients (Miki et al., 2010). The discrepancy between the results of the autopsy-based study and the *in vivo* study may be explained by the differences of the sites for tissue samples, the size of skin tissue examined, and the numbers of examined sections. In any event, this does not make the skin a source of biomarker for the premortem diagnosis of PD.

The two autopsy studies of the submandibular gland in LB disorders raised a recent interest for the salivary glands (Beach et al., 2010; Del Tredici et al., 2010). Apart from fine needle aspiration biopsies that only give access to smears of epithelial cells, histological analysis of the submandibular gland can only be achieved through incisional biopsy. The possibility of injury to the marginal mandibular branch of the facial, hypoglossal, and lingual nerves requires the biopsy to be performed in the operating room. Because of the risks and technical difficulties of such a procedure, even higher when it comes to the parotid gland, the analysis of the major salivary glands will probably never become a routine biomarker for PD. Conversely, minor salivary gland biopsy is safe and routinely performed for diagnostic purposes (Caporali et al., 2008). Provided that minor salivary glands recapitulate the alterations of the autonomic innervation observed in the submandibular gland, which requires confirmation, the analysis of labial salivary glands may provide a useful histological biomarker (Cersosimo et al., 2010).

The ENS displays specific features that make it a prime candidate for being a histopathological marker of PD. In contrast to all aforementioned tissues, it does not contain only postganglionic neuronal processes but rather is an integrated neuronal network that contains neurons and enteric glial cells, the counterpart of the astrocytes of the CNS. It is sometimes referred as a "second brain" because of the functional and chemical diversity of the enteric neurons that closely resembles that of the CNS. We have shown recently that whole-mounts of submucosa from routine colonic biopsies allow a morphological and quantitative analysis of the SMP (Lebouvier

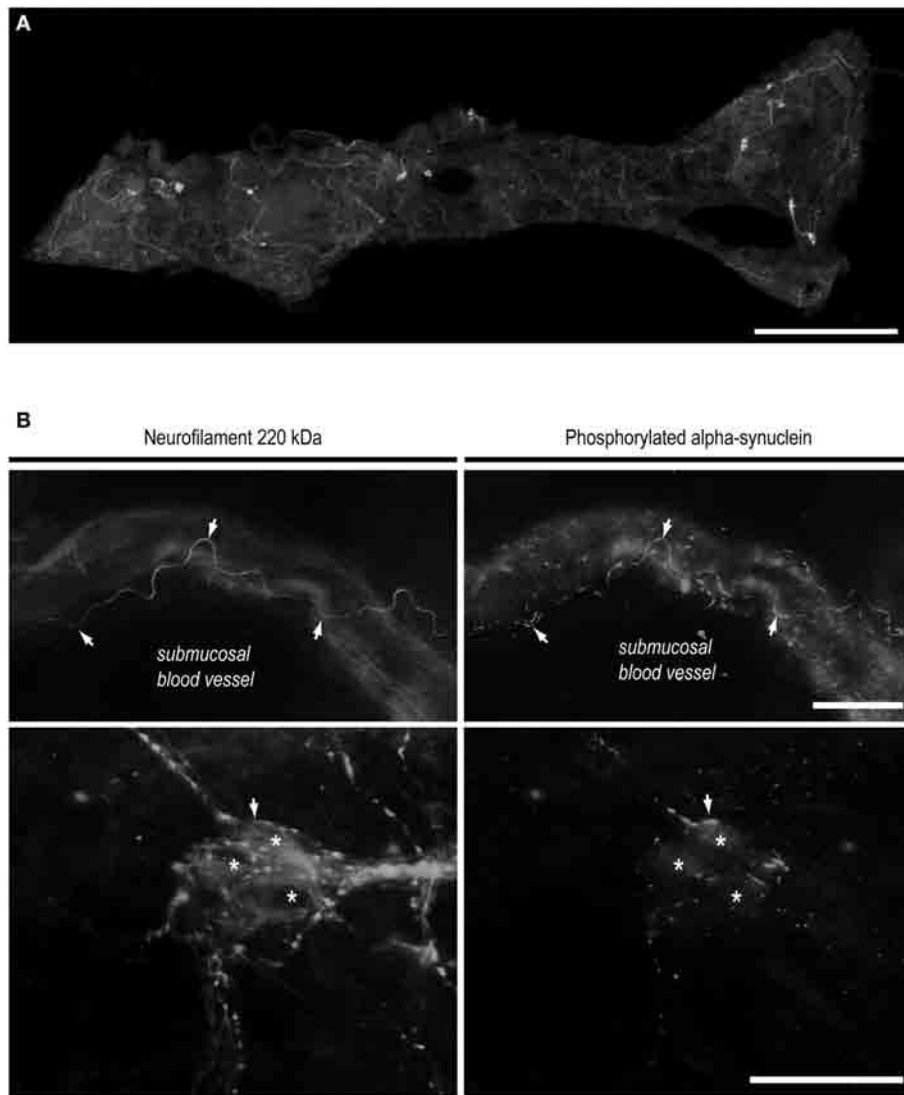


FIGURE 2 | Routine colonoscopy biopsies as a novel biomarker of Parkinson's disease. (A) Whole mount of submucosa microdissected from a standard colonoscopy biopsy and immunostained with anti-neurofilament antibody to unravel the neural network. Colonic submucosal (Meissner's) plexus, formed by ganglia and interganglionic strands, is readily apparent. A single biopsy performed in the ascending or descending colon gives access to a mean of 150

neurons. Scale bar 1 mm. **(B)** After magnification, double labeling with antibodies against neurofilament (left) and phosphorylated alpha-synuclein (right) in a Parkinson's disease patient reveals the presence of Lewy neurites. Up: a perivascular Lewy neurite. Down: a fragmented Lewy neurite inside a submucosal ganglion. Arrows: neurites immunoreactive for phosphorylated alpha-synuclein and neurofilament. Asterisks: submucosal neurons. Scale bar: 30 μ m.

et al., 2009b). A single standard colonic biopsy contains an average of 35 ganglia, thus allowing the analysis of approximately 150 neurons (**Figure 2A**). Using this approach, LN were identified in the SMP of four out of five PD patients (Lebouvier et al., 2008) in a preliminary report (**Figure 2B**). We have therefore undertaken a large-scale survey to correlate the amount of enteric pathology with clinical PD symptoms. A total of 10 control and 30 PD patients were enrolled. Four routine colonic biopsies were taken from the ascending and descending colon during the course of a total colonoscopy. Lewy pathology was apparent in the colonic biopsies from 21 patients (72%) and in none of the controls. In favor of the pathogenicity of enteric pathology, pathological burden was correlated with an apparent neuronal loss within the submucosal

plexus. The clinical relevance of these findings was supported by a correlation between pathological burden and constipation as well as the amount of axial and dopa-unresponsive symptoms, which reflect disease progression (Lebouvier et al., 2010).

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

Although Lewy pathology is absent in a minority of cases of clinical PD, most of which are rare genetic forms of the disease, alpha-synuclein is still considered to be a key player of the pathophysiology of PD. In the era of functional neuroimaging and molecular biology, histological biomarkers may still be of great interest for the diagnosis and management of PD because they are the only to directly assess the synucleinopathy *in vivo*. By affecting the peripheral ANS

early in the course of the disease, PD provides a nearly unique opportunity to directly apprehend the neuropathological process in biopsable neural tissues. Apart from PD, comparable approaches have been used only in variant Creutzfeldt–Jakob Disease. Though analysis is performed in non-neural lymphoid tissue, histochemical (Ironsides et al., 2000) and biochemical (Wadsworth et al., 2001) methods can identify the pathological form of the prion protein in tonsil biopsies from affected individuals.

To date, the search for sensitive histological biomarkers in PD has been hindered by the scattered pattern of inclusions in the peripheral ANS. Among routinely accessible tissues, the extraordinary neuronal density of the ENS accounts for the higher, yet imperfect, sensitivity of gut biopsies to detect the pathology. The good correlation between pathology burden and disease severity makes the technique a readily available biomarker to assess disease progression (Figure 1A).

Yet future work is needed to test the specificity of these peripheral inclusions in larger series and to improve the sensitivity of the technique. Possible strategies include an increased number of colonic samples or the use of upper digestive tract biopsies, which add the potential risk of inhalation during the endoscopy. Other biopsable tissues such as minor salivary glands may solve the safety issues if they demonstrate an equal or superior sensitivity to evidence Lewy inclusions. Once the sensitivity is improved, the primary goal will be to use such biomarkers for the positive diagnosis of PD and differential diagnosis with other forms of parkinsonism (Figure 1B).

A new conception of the neuropathology of PD supports a centripetal pattern of degeneration from postganglionic and peripheral autonomic neurons to their central and preganglionic counter-

part, and then a cranial spreading within the brainstem until the substantia nigra is finally reached (Orimo et al., 2008; Hawkes et al., 2009). Suitable histological biomarkers utilize the postganglionic neurons, which are supposed to herald the degenerative process. Hence beyond positive diagnosis, the next step is to use them for the premotor diagnosis of PD (Figure 1C). Routinely accessible biomarkers would allow the screening of vulnerable populations for Lewy inclusions before the advent of the motor symptoms. Delineation of the spectrum of Parkinson's at risk patients is currently under work (Stern and Siderowf, 2010), but surely includes patients with REM-sleep behavior disorder. Patients above 50 years presenting with abnormalities in olfaction or gastrointestinal function, particularly if justifying an endoscopy, could as well be systematically assessed.

Until imaging probes for *in vivo* detection of alpha-synuclein deposition become available (Kikuchi et al., 2010), we believe there is a time-window for histological biomarkers in LB diseases. Accumulating data suggest that they should contribute to the early diagnosis of PD, and thus facilitate earlier diagnosis to evaluate neuroprotective treatments.

ACKNOWLEDGMENTS

Work in our lab is supported by the Michael J Fox Foundation, France Parkinson, CECAP (Comité d'Entente et de Coordination des Associations de Parkinsoniens), ADPLA (Association des Parkinsoniens de Loire Atlantique), FPPG (Fédération française des groupements parkinsoniens) and Parkinsoniens de Vendée. TL is a recipient of poste d'accueil Inserm. MN and PDe are both recipients of contrats d'Interface Inserm.

REFERENCES

- Abbott, R. D., Petrovitch, H., White, L. R., Masaki, K. H., Tanner, C. M., Curb, J. D., Grandinetti, A., Blanchette, P. L., Popper, J. S., and Ross, G. W. (2001). Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson's disease. *Neurology* 57, 456–462.
- Ahlskog, J. E. (2007). Beating a dead horse: dopamine and Parkinson disease. *Neurology* 69, 1701–1711.
- Anderson, J. P., Walker, D. E., Goldstein, J. M., de Laat, R., Banducci, K., Caccavello, R. J., Barbour, R., Huang, J., Kling, K., Lee, M., Diep, L., Keim, P. S., Shen, X., Chataway, T., Schlossmacher, M. G., Seubert, P., Schenk, D., Sinha, S., Gai, W. P., and Chilcote, T. J. (2006). Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. *J. Biol. Chem.* 281, 29739–29752.
- Beach, T. G., Adler, C. H., Sue, L. I., Vedders, L., Lue, L., White, L., C. L., Akiyama, H., Caviness, J. N., Shill, H. A., Sabbagh, M. N., and Walker, D. G. (2010). Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol.* 119, 689–702.
- Beach, T. G., White, C. L., III, Hladik, C. L., Sabbagh, M. N., Connor, D. J., Shill, H. A., Sue, L. I., Sasse, J., Bachalakuri, J., Henry-Watson, J., Akiyama, H., and Adler, C. H. (2009). Olfactory bulb alpha-synucleinopathy has high specificity and sensitivity for Lewy body disorders. *Acta Neuropathol.* 117, 169–174.
- Benarroch, E. E. (2007). Enteric nervous system: functional organization and neurologic implications. *Neurology* 69, 1953–1957.
- Berg, D., and Becker, G. (2002). Perspectives of B-mode transcranial ultrasound. *Neuroimage* 15, 463–473.
- Bloch, A., Probst, A., Bissig, H., Adams, H., and Tolnay, M. (2006). Alpha-synuclein pathology of the spinal and peripheral autonomic nervous system in neurologically unimpaired elderly subjects. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 32, 284–295.
- Braak, H., and Del Tredici, K. (2008). Invited article: nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. *Neurology* 70, 1916–1925.
- Braak, H., Del Tredici, K., Bratzke, H., Hamm-Clement, J., Sandmann-Keil, D., and Rub, U. (2002). Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *J. Neurol.* 249(Suppl. 3), III/1–III/5.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R. A., Jansen Steur, E. N., and Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 24, 197–211.
- Braak, H., de Vos, R. A., Bohl, J., and Del Tredici, K. (2006). Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci. Lett.* 396, 67–72.
- Braak, H., Sastre, M., Bohl, J. R., de Vos, R. A., and Del Tredici, K. (2007). Parkinson's disease: lesions in dorsal horn layer I, involvement of parasympathetic and sympathetic pre- and postganglionic neurons. *Acta Neuropathol.* 113, 421–429.
- Caporali, R., Bonacci, E., Epis, O., Bobbio-Pallavicini, F., Morbini, P., and Montecucco, C. (2008). Safety and usefulness of minor salivary gland biopsy: retrospective analysis of 502 procedures performed at a single center. *Arthritis Rheum.* 59, 714–720.
- Cersosimo, M. G., and Benarroch, E. E. (2008). Neural control of the gastrointestinal tract: implications for Parkinson disease. *Mov. Disord.* 23, 1065–1075.
- Cersosimo, M. G., Perandones, C., Micheli, F. E., Raina, G. B., Beron, A. M., Nasswetter, G. M. R., and Benarroch, E. E. (2010). "Alpha-synuclein immunoreactivity in minor salivary glands: a potential pathological biomarker for Parkinson's disease?" in *14th International Congress on Parkinson's Disease and Movement Disorders*, Buenos Aires, Argentina.
- Chaudhuri, K. R., Healy, D. G., and Schapira, A. H. (2006). Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol.* 5, 235–245.
- DelleDonne, A., Klos, K. J., Fujishiro, H., Ahmed, Z., Parisi, J. E., Josephs, K. A., Frigerio, R., Burnett, M., Wszolek, Z. K., Uitti, R. J., Ahlskog, J. E., and Dickson, D. W. (2008). Incidental Lewy body disease and preclinical Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 65, 1074–1080.
- Del Tredici, K., Hawkes, C. H., Ghebremedhin, E., and Braak, H. (2010). Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 119, 703–713.

- Del Tredici, K., Rub, U., De Vos, R. A., Bohl, J. R., and Braak, H. (2002). Where does Parkinson disease pathology begin in the brain? *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 61, 413–426.
- Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M. S., Shen, J., Takio, K., and Iwatsubo, T. (2002). α -Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat. Cell Biol.* 4, 160–164.
- Hawkes, C. H., Del Tredici, K., and Braak, H. (2009). Parkinson's disease: the dual hit theory revisited. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1170, 615–622.
- Hong, Z., Shi, M., Chung, K. A., Quinn, J. F., Peskind, E. R., Galasko, D., Jankovic, J., Zabetian, C. P., Leverenz, J. B., Baird, G., Montine, T. J., Hancock, A. M., Hwang, H., Pan, C., Bradner, J., Kang, U. J., Jensen, P. H., and Zhang, J. (2010). DJ-1 and α -synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease. *Brain* 133, 713–726.
- Hughes, A. J., Daniel, S. E., Ben-Shlomo, Y., and Lees, A. J. (2002). The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. *Brain* 125, 861–870.
- Ikemura, M., Saito, Y., Sengoku, R., Sakiyama, Y., Hatsuta, H., Kanemaru, K., Sawabe, M., Arai, T., Ito, G., Iwatsubo, T., Fukayama, M., and Murayama, S. (2008). Lewy body pathology involves cutaneous nerves. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67, 945–953.
- Ironside, J. W., Hilton, D. A., Ghani, A., Johnston, N. J., Conyers, L., McCordle, L. M., and Best, D. (2000). Retrospective study of prion-protein accumulation in tonsil and appendix tissues. *Lancet* 355, 1693–1694.
- Kikuchi, A., Takeda, A., Okamura, N., Tashiro, M., Hasegawa, T., Furumoto, S., Kobayashi, M., Sugeno, N., Baba, T., Miki, Y., Mori, F., Wakabayashi, K., Funaki, Y., Iwata, R., Takahashi, S., Fukuda, H., Arai, H., Kudo, Y., Yanai, K., and Itoyama, Y. (2010). In vivo visualization of α -synuclein deposition by carbon-11-labelled 2-[2-(2-dimethylaminothiazol-5-yl)ethenyl]-6-[2-(fluoro)ethoxy]benzoxazole positron emission tomography in multiple system atrophy. *Brain* 133, 1772–1778.
- Kovacs, T., Papp, M. I., Cairns, N. J., Khan, M. N., and Lantos, P. L. (2003). Olfactory bulb in multiple system atrophy. *Mov. Disord.* 18, 938–942.
- Kupsky, W. J., Grimes, M. M., Sweeting, J., Bertsch, R., and Cote, L. J. (1987). Parkinson's disease and megacolon: concentric hyaline inclusions (Lewy bodies) in enteric ganglion cells. *Neurology* 37, 1253–1255.
- Lebouvier, T., Chaumette, T., Damier, P., Coron, E., Touchefeu, Y., Vignaud, S., Naveilhan, P., Galmiche, J. P., Bruley des Varannes, S., Derkinderen, P., and Neunlist, M. (2008). Pathological lesions in colonic biopsies during Parkinson's disease. *Gut* 57, 1741–1743.
- Lebouvier, T., Chaumette, T., Paillusson, S., Duyckaerts, C., Bruley des Varannes, S., Neunlist, M., and Derkinderen, P. (2009a). The second brain and Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* 30, 735–741.
- Lebouvier, T., Coron, E., Chaumette, T., Paillusson, S., Bruley des Varannes, S., Neunlist, M., and Derkinderen, P. (2009b). Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients. *Neurogastroenterol. Motil.* 22, e11–e14.
- Lebouvier, T., Neunlist, M., Bruley Des Varannes, S., Coron, E., Drouard, A., Nguyen, J. P., Chaumette, T., Tasselli, M., Paillusson, S., Flamand, M., Galmiche, J. P., Damier, P., and Derkinderen, P. (2010). Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PLoS ONE* (in press).
- Lees, A. J., Hardy, J., and Revesz, T. (2009). Parkinson's disease. *Lancet* 373, 2055–2066.
- Marek, K., Jennings, D., Tamagnan, G., and Seibyl, J. (2008). Biomarkers for Parkinson's [corrected] disease: tools to assess Parkinson's disease onset and progression. *Ann. Neurol.* 64(Suppl. 2), S111–S121.
- Martin, W. R., Wieler, M., and Gee, M. (2008). Midbrain iron content in early Parkinson disease: a potential biomarker of disease status. *Neurology* 70, 1411–1417.
- Miki, Y., Tomiyama, M., Ueno, T., Haga, R., Nishijima, H., Suzuki, C., Mori, F., Kaimori, M., Baba, M., and Wakabayashi, K. (2010). Clinical availability of skin biopsy in the diagnosis of Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 469, 357–359.
- Minguez-Castellanos, A., Chamorro, C. E., Escamilla-Sevilla, F., Ortega-Moreno, A., Rebollo, A. C., Gomez-Rio, M., Concha, A., and Munoz, D. G. (2007). Do α -synuclein aggregates in autonomic plexuses predate Lewy body disorders? a cohort study. *Neurology* 68, 2012–2018.
- Olanow, C. W., Rascol, O., Hauser, R., Feigin, P. D., Jankovic, J., Lang, A., Langston, W., Melamed, E., Poewe, W., Stocchi, F., and Tolosa, E. (2009). A double-blind, delayed-start trial of rasagiline in Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 361, 1268–1278.
- Orimo, S., Uchiyama, T., Nakamura, A., Mori, F., Kakita, A., Wakabayashi, K., and Takahashi, H. (2008). Axonal α -synuclein aggregates herald centripetal degeneration of cardiac sympathetic nerve in Parkinson's disease. *Brain* 131, 642–650.
- Parkkinen, L., Silveira-Moriyama, L., Holton, J. L., Lees, A. J., and Revesz, T. (2009). Can olfactory bulb biopsy be justified for the diagnosis of Parkinson's disease? Comments on "olfactory bulb α -synucleinopathy has high specificity and sensitivity for Lewy body disorders". *Acta Neuropathol.* 117, 213–214; author reply 217–218.
- Ponsen, M. M., Stoffers, D., Booij, J., van Eck-Smit, B. L., Wolters, E., and Berendse, H. W. (2004). Idiopathic hyposmia as a preclinical sign of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 56, 173–181.
- Postuma, R. B., Gagnon, J. F., Vendette, M., Fantini, M. L., Massicotte-Marquez, J., and Montplaisir, J. (2009). Quantifying the risk of neurodegenerative disease in idiopathic REM sleep behavior disorder. *Neurology* 72, 1296–1300.
- Qualman, S. J., Haupt, H. M., Yang, P., and Hamilton, S. R. (1984). Esophageal Lewy bodies associated with ganglion cell loss in achalasia. Similarity to Parkinson's disease. *Gastroenterology* 87, 848–856.
- Rub, U., Del Tredici, K., Schultz, C., de Vos, R. A., Jansen Steur, E. N., Arai, K., and Braak, H. (2002). Progressive supranuclear palsy: neuronal and glial cytoskeletal pathology in the higher order processing autonomic nuclei of the lower brainstem. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 28, 12–22.
- Savica, R., Carlin, J. M., Grossardt, B. R., Bower, J. H., Ahlskog, J. E., Maraganore, D. M., Bharucha, A. E., and Rocca, W. A. (2009). Medical records documentation of constipation preceding Parkinson disease: a case-control study. *Neurology* 73, 1752–1758.
- Schapira, A. H., and Olanow, C. W. (2004). Neuroprotection in Parkinson disease: mysteries, myths, and misconceptions. *JAMA* 291, 358–364.
- Schemann, M., and Neunlist, M. (2004). The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol. Motil.* 16(Suppl. 1), 55–59.
- Stern, M. B., and Siderowf, A. (2010). Parkinson's at risk syndrome: can Parkinson's disease be predicted? *Mov. Disord.* 25(Suppl. 1), S89–S93.
- Thobois, S., Delamarre-Damier, F., and Derkinderen, P. (2005). Treatment of motor dysfunction in Parkinson's disease: an overview. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 107, 269–281.
- Wadsworth, J. D., Joiner, S., Hill, A. F., Campbell, T. A., Desbruslais, M., Luthert, P. J., and Collinge, J. (2001). Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* 358, 171–180.
- Wakabayashi, K., and Takahashi, H. (1997). Neuropathology of autonomic nervous system in Parkinson's disease. *Eur. Neurol.* 38(Suppl. 2), 2–7.
- Wakabayashi, K., Takahashi, H., Ohama, E., Takeda, S., and Ikuta, F. (1993). Lewy bodies in the visceral autonomic nervous system in Parkinson's disease. *Adv. Neurol.* 60, 609–612.
- Wakabayashi, K., Takahashi, H., Takeda, S., Ohama, E., and Ikuta, F. (1988). Parkinson's disease: the presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses. *Acta Neuropathol.* 76, 217–221.
- Witt, M., Bormann, K., Gudziol, V., Pehlke, K., Barth, K., Minovi, A., Hahner, A., Reichmann, H., and Hummel, T. (2009). Biopsies of olfactory epithelium in patients with Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 24, 906–914.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 25 June 2010; paper pending published: 16 July 2010; accepted: 11 August 2010; published online: 03 September 2010.

Citation: Lebouvier T, Tasselli M, Paillusson S, Pouclet H, Neunlist M and Derkinderen P (2010) Biopsable neural tissues: toward new biomarkers for Parkinson's disease? *Front. Psychiatry* 1:128. doi: 10.3389/fpsy.2010.00128

This article was submitted to *Frontiers in Neurodegenerative Diseases*, a specialty of *Frontiers in Psychiatry*.

Copyright © 2010 Lebouvier, Tasselli, Paillusson, Pouclet, Neunlist and Derkinderen. This is an open-access article subject to an exclusive license agreement between the authors and the Frontiers Research Foundation, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original authors and source are credited.

Article 9 : Parkinson's disease: the enteric nervous system spills its guts.

Derkinderen P, Rouaud T, Lebouvier T, Bruley des Varannes S, Neunlist M, De Giorgio R. *Parkinson's disease: the enteric nervous system spills its guts*. **Review**. Neurology. Nov 8;77(19):1761-7.

Cet article, cosigné par Pascal Derkinderen et Tiphaine Rouaud, constitue une revue aussi exhaustive que possible en 2011 sur le sujet du SNE dans la MP. Après une introduction sur la physiologie et l'anatomie du SNE, une revue de la littérature consacrée à la pathologie de Lewy dans le SNE mène à une discussion présentant son intérêt comme biomarqueur.

Parkinson disease

The enteric nervous system spills its guts

P. Derkinderen, MD,
PhD*
T. Rouaud, MD*
T. Lebouvier, MD
S. Bruley des Varannes,
MD, PhD
M. Neunlist, PhD
R. De Giorgio, MD,
PhD

Address correspondence and reprint requests to Dr. Pascal Derkinderen, Inserm U913, 1 place Alexis Ricordeau, CHU Nantes, 44093 Nantes Cedex 1, France
pascal.derkinderen@chu-nantes.fr

ABSTRACT

Lewy pathology in Parkinson disease (PD) extends well beyond the CNS, also affecting peripheral autonomic neuronal circuits, especially the enteric nervous system (ENS). The ENS is an integrative neuronal network also referred to as “the brain in the gut” because of its similarities to the CNS. We have recently shown that the ENS can be readily analyzed using routine colonic biopsies. This led us to propose that the ENS could represent a unique window to assess the neuropathology in living patients with PD. In this perspective, we discuss current evidence which indicates that the presence of ENS pathology may be exploited to improve our understanding and management of PD and likely other neurodegenerative disorders. *Neurology*® 2011;77:1761-1767

GLOSSARY

ENS = enteric nervous system; **MP** = myenteric plexus; **PD** = Parkinson disease; **RBD** = REM sleep behavior disorder; **SMP** = submucosal plexus; **TH** = tyrosine hydroxylase; **UPDRS-III** = Unified Parkinson's Disease Rating Scale part III; **VIP** = vasoactive intestinal peptide.

The traditional view of Parkinson disease (PD) as a primary disorder of dopaminergic neurons in the substantia nigra has been reconsidered in recent years.¹ Lewy pathology is much more extensive and affects not only the central but also the peripheral nervous system.^{2–8} Among these peripheral autonomic neuronal circuits, the enteric nervous system (ENS) has received great attention. A recent autopsy survey has shown that almost all patients with PD display Lewy pathology within their ENS.⁸ Furthermore, Braak suggested that these lesions in enteric neurons develop early in the course of disease, prior to the appearance of pathology in substantia nigra neurons, and therefore that the ENS could be critically involved in the pathophysiology of the disease.^{2,9} Importantly, the ENS, which shares several characteristics of the CNS, is accessible and analyzable through routine colonic biopsies.¹⁰ Taken together, these features indicate that the ENS is a prime candidate for investigating novel histopathologic markers in living patients with PD. The present review is intended to put into perspective the ENS as a window through which neurodegenerative disorders of the CNS, such as PD, can be assessed.

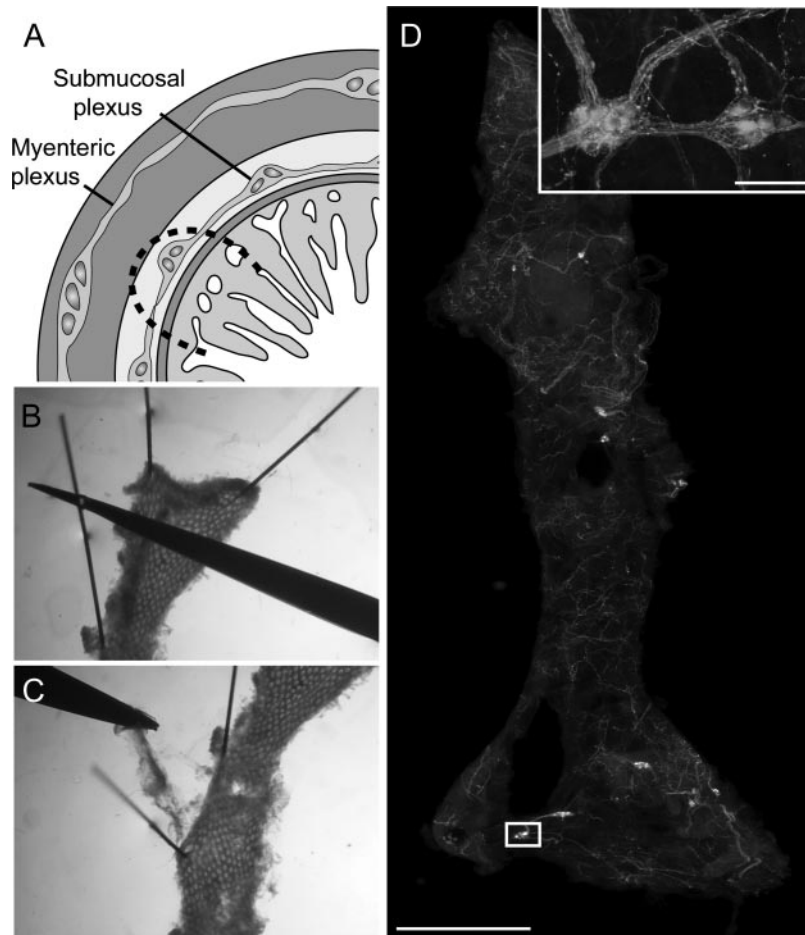
THE ENS IS A SECOND BRAIN READILY ACCESSIBLE FOR BIOPSIES More than 100 years ago, Langley^{11,12} recognized that intrinsic innervation of the gastrointestinal tract, the ENS, was an independent division of the autonomic nervous system. Knowledge gained over the last 30 years has helped, at least in part, to decipher the complexity and function of the ENS, demonstrating its peculiar position within the autonomic nervous system.^{13,14} Indeed, compared to other sections of the peripheral nervous system, the ENS shows some unique features that closely resemble those of the CNS: 1) it contains approximately 80–100 million neurons, as many as the spinal cord, embedded in the wall of the alimentary tract^{13,14}; 2) it contains a variety of functionally distinct enteric neurons, along with a vast repertoire of neurotransmitters and intercellular messengers which are the basis for enteric neurotransmission^{13,14}; 3) the ENS harbors a prominent

*These authors contributed equally.

From Inserm, U913 (P.D., T.R., T.L., S.B.d.V., M.N.), Nantes; Inserm, CIC-04 (P.D., T.R., T.L., S.B.d.V.), Nantes; University Nantes (P.D., T.R., T.L., S.B.d.V., M.N.), Nantes; Department of Neurology (P.D., T.R., T.L., M.N.) and Institut des Maladies de l'Appareil Digestif (P.D., T.L., S.B.d.V., M.N.), CHU Nantes, Nantes, France; and Department of Clinical Medicine (R.D.G.), University of Bologna, Bologna, Italy.

Study funding: Work in Michel Neunlist's laboratory is supported by the Michael J Fox Foundation for Parkinson's disease, Nantes University Hospital (Direction de la Recherche Clinique), France Parkinson, Fondation de France, Aramise, FFPG (Fédération française des groupements parkinsoniens), and Parkinsoniens de Vendée. Dr. De Giorgio is supported by the Italian Ministry of University and Research (COFIN projects), the University of Bologna (RFO funds), and “Fondazione Del Monte di Bologna e Ravenna,” Bologna, Italy.

Disclosure: Author disclosures are provided at the end of the article.



(A) The SMP is accessible to routine colonic biopsies (dotted lines). (B) Biopsies are collected using standard biopsy forceps without needles, then stretched and pinned flat under a stereomicroscope. (C) The submucosa is separated from the mucosa with watchmaker's forceps. (D) Submucosa whole mounts are stained using neurofilament heavy chain (NF220) antibodies; scale bar: 1,000 μ m. The area highlighted in white allows a qualitative and quantitative analysis of NF220 labeled enteric neurons; scale bar: 30 μ m.

component of glial cells which, like astrocytes in the CNS, contribute to support, and protect and maintain the neural networks¹⁵; 4) similar to the CNS, the ENS can also be affected by a vast array of congenital and acquired disorders, termed enteric neuropathies.¹⁶ Indeed, because of its similarities with the CNS, the ENS is often referred to as the brain in the gut¹⁷ or the second brain.^{9,13,18}

The ENS is organized into 2 major ganglionated plexuses: the myenteric or Auerbach plexus and the submucosal plexus (SMP).^{13,14,19} The SMP itself is further subdivided into 3 separate plexuses: the inner SMP (Meissner plexus) directly below the muscularis mucosae, the outer SMP (Schabadasch or Henle plexus) directly adjacent to the circular muscle layer, and an intermediate plexus located between the two.²⁰ The myenteric plexus primarily controls the activity of the smooth muscle of the gut and thus intestinal motility, whereas the SMP is involved in

the regulation of mucosal functions such as secretion and blood flow (figure 1A).¹⁹ However, these functions are not exclusive, since some neurons of the outer SMP innervate the circular muscle²¹ and some neurons of the myenteric plexus project to the mucosa.²²

Gut motility and secretion is regulated by the release of specific neurotransmitters or intercellular messengers that are synthesized by functionally defined enteric neurons. For instance, among the most common neurotransmitters in the ENS, vasoactive intestinal peptide (VIP) and nitric oxide are often found in inhibitory motoneurons while acetylcholine and substance P are found in excitatory motoneurons.^{13,19} There are relatively few dopaminergic neurons in the human ENS when compared to the CNS, and these are distributed along an oral-aboral gradient. Dopaminergic neurons are, however, relatively abundant in both plexuses of the upper gastrointestinal tract, accounting for 15% to 20% of total enteric

neuron number, while their proportion dwindles to 2%–4% in the large intestine.²³ Although the ENS can function independently from the CNS, the control of gastrointestinal motility and secretion also depends on both extrinsic parasympathetic and sympathetic innervations.¹⁸ Extrinsic parasympathetic inputs originate in the dorsal motor nucleus of the vagus and in the sacral parasympathetic nucleus, and these control motility of the upper gastrointestinal tract and the distal colon and rectum, respectively.²⁴ In contrast, inputs from the prevertebral sympathetic ganglia inhibit motility of the gut.²⁵

Until recently, analysis of the ENS in humans was mainly performed using full-thickness specimens of the gut obtained during surgery or autopsy. However, the accessibility of the gastrointestinal tract for assessment by endoscopy procedures prompted us to investigate whether or not the ENS can be assessed in patients using such a relatively simple approach. Combining routine colonic biopsies and microdissection techniques (figure 1, B and C), we have shown that collecting whole-mounts of submucosa enables a comprehensive assessment of the SMP,¹⁰ in particular the inner SMP, which can be used as a possible surrogate for the whole ENS (figure 1D). In such whole-mount preparations, immunohistochemical analysis revealed that a single standard colonic biopsy contains an average of 35 ganglia containing 3 to 5 neurons per ganglion, thus allowing the evaluation of approximately 150 neurons.¹⁰ Biopsies can also be processed by Western blot, which can be used to measure quantitative differences in proteins, such as neuronal or glial markers.¹⁰ This methodologic approach was originally designed using biopsies of the ascending colon taken during colonoscopy, a diagnostic procedure with a low risk of adverse effects, and has now been fully validated in this system.^{10,26} Furthermore, biopsies taken from the descending colon provide comparable results to that of the ascending colon.²⁷

THE ENS RECAPITULATES THE NEUROPATHOLOGY OF PD AND SERVES AS A MARKER OF DISEASE SEVERITY

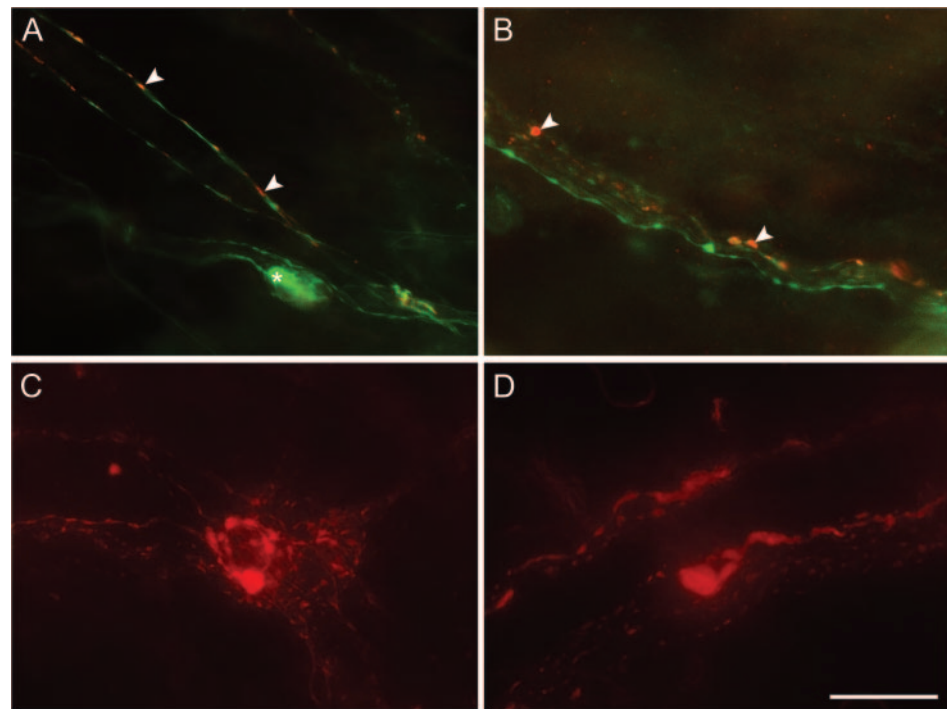
The occurrence of Lewy pathology in the gut of patients with PD was first reported in an autopsy survey in which Qualman et al.²⁸ found myenteric Lewy bodies in the colon of one patient and in the esophagus of another. A subsequent case report demonstrated the presence of Lewy bodies in both the myenteric plexus (MP) and the SMP of the surgically resected colon of a patient with PD.²⁹ These primary observations led Wakabayashi et al.⁷ to perform a systematic assessment of Lewy pathology in the ENS in PD cases. Lewy bodies were found in the gastrointestinal tract of 7 consecutive autopsies performed on patients with PD, and

these were distributed widely in both the MP and SMP from the upper esophagus to the rectum. In a follow-up study performed in a further 3 patients with PD, the same team reported that most of the Lewy bodies observed within the gastrointestinal tract occurred in VIPergic neurons, and to a lesser extent in neurons immunoreactive for tyrosine hydroxylase (TH).³⁰ It was mentioned that few Lewy bodies were found in neurons that were negative for either VIP or TH. Despite the lack of quantitation in these reports, to date these have been the only studies that have suggested that a specific subset of enteric neurons bear Lewy pathology.³⁰

For almost 20 years, there were no further publications regarding gastrointestinal Lewy pathology in patients with PD, until Braak and collaborators² brought this topic to the forefront in 2006. In a post-mortem survey, they studied the gastric MP and SMP from 5 individuals with Lewy body disease. Although the clinical data were scarce, 3 out of the 5 patients with Lewy body pathology had displayed motor signs of PD, while the other 2 patients were reported to be free of motor symptoms. However, Lewy pathology was present in both the MP and the SMP of all 5 patients, including the 2 asymptomatic individuals. This led Braak et al.² to postulate that the ENS develops pathology at a very early stage of disease progression, before the CNS is affected. Despite being a potentially important finding, this hypothesis has not been generally accepted, mainly because of the paucity of cases and the lack of associated clinical data, both of which factors have acted to limit the impact of this study.³¹ More recently, a comprehensive survey on the occurrence of Lewy pathology in the peripheral nervous systems, and especially in the ENS, has been published by the Arizona Parkinson's Disease Consortium.⁸ One of the most striking results of this latter study was the identification of Lewy inclusions in the esophagus of 14 out of 15 patients with PD, suggesting that enteric pathology is present in the vast majority of PD cases.⁸

Enteric pathology in PD is commonly considered to be responsible for the gastrointestinal dysfunction that is so often encountered by patients with PD.³² Symptoms such as dysphagia, nausea, and distension as a result of impaired gastric emptying, and bowel dysfunction, including both reduced bowel movement frequency and difficulty defecating, are among the most common nonmotor symptoms of PD.^{32,33} Nevertheless, the pathophysiologic mechanisms underlying these manifestations are likely to be multifaceted, reflecting not only the involvement of the intrinsic innervation of the gut, but also its extrinsic inputs since Lewy pathology has been demonstrated in the dorsal motor nucleus of the vagus, sacral para-

Figure 2 Analysis of the submucosal plexus (SMP) by immunohistochemistry in patients with Parkinson disease (PD)



(A, B) Double labeling with antibodies against neurofilament heavy chain (green) and phosphorylated α -synuclein (red) revealed some colocalization of these proteins in neuritic structures (white arrowheads); a submucosal ganglia composed of 3 neuronal cell bodies is observed in A (white asterisk). (C, D) Tyrosine hydroxylase-immunolabeling revealed dystrophic features such as cluster-like aggregates in ganglia (C) and interganglionic bundles (D) that were present in some patients with PD. This pathologic feature was lacking in controls. Scale bar: 40 μ m.

sympathetic nuclei, and sympathetic ganglia.^{5,8,34} Interestingly, a recently developed animal model of PD provides some clues on the role of ENS alterations in gastrointestinal dysfunction. These transgenic mice displayed α -synuclein aggregates within their enteric ganglia, which was associated with a prolonged whole gut total transit time and reduced colonic motility. However, there was no evidence of pathologic changes in the dorsal motor nucleus of the vagus or autonomic cardiovascular dysfunction. These findings strongly suggest that ENS dysfunction in these mice is intrinsic in origin, being caused by α -synuclein aggregation in enteric neurons, rather than being extrinsic, as a consequence of abnormal central innervation of the gut. By extrapolating these results to humans, it is reasonable to suggest that at least some of the gastrointestinal symptoms of patients with PD are due to enteric neuropathy. It should be pointed out, however, that studies on gastrointestinal symptoms in PD have mainly focused on motility disorders and therefore the role of the myenteric plexus, whereas the consequence of Lewy pathology in the SMP has, to our knowledge, not been addressed either in patients or in experimental models of parkinsonism.

The aforementioned studies of the ENS in patients with PD were performed using either autopsy or colectomy specimens. To extend this work by analyzing enteric neuropathology in living patients with PD, we took advantage of our microdissection technique. Twenty-nine patients with an established diagnosis of PD were enrolled together with 10 control subjects who had undergone colonoscopy for colorectal cancer screening.²⁷ Biopsies from 21 out of the 29 patients with PD (72%) showed Lewy neurites in their SMP, whereas no Lewy pathology was observed in any of the controls (figure 2). This finding is in line with 2 recent articles on PD enteric pathology which showed that besides Lewy bodies, Lewy neurites were also observed in the ENS, in particular in the SMP, of patients with PD.^{2,8} Using dopamine β -hydroxylase immunostaining, we also demonstrated that approximately half of the Lewy neurites observed in the SMP belonged to postganglionic sympathetic neurons, thus implying their extrinsic origin. The origin of the remaining Lewy neurites remains to be determined, but it is possible that they could originate both from submucosal neurons, in particular from other layers of the SMP, and also from myenteric neurons, which have been

shown to project to the SMP as well as to the submucosal blood vessels.³⁵

In order to correlate the presence of ENS Lewy pathology with clinical features, we stratified patients according to Lewy pathology burden, and performed neurologic assessments.²⁷ Motor symptoms were evaluated using the Unified Parkinson's Disease Rating Scale part III (UPDRS-III)³⁶ in both OFF and ON state. The UPDRS-III in ON state was further subdivided to provide an axial score (sum of items 18, 19, 22, and 27–30), which was used to indicate levodopa-resistant axial symptoms such as dysarthria or postural instability.³⁷ We determined that the total burden of Lewy pathology did not correlate with the total UPDRS-III score in OFF state, which reflects global motor disability associated with the disease (Lebouvier and Derkinderen, unpublished results, 2010). In contrast, the burden of Lewy neurites positively correlated with both total UPDRS-III score in ON state and with the axial score, which reflects levodopa-unresponsive features and thus disease severity.³⁷ The appearance of such axial symptoms during the course of PD is predictive of disease progression toward dementia³⁸ and is associated with significant autonomic dysfunction.³⁹ Therefore, it is postulated that these symptoms reflect the spreading of Lewy pathology to nondopaminergic structures of the autonomic nervous system, brainstem, forebrain, and cortex.³⁹ In line with these observations, our results strongly suggest that the severity of enteric pathology is indicative of disease progression and severity. Taken together, the available data on ENS Lewy pathology in PD supports the idea that the ENS represents a window to allow in vivo assessment of neuropathologic processes in PD.⁴⁰

THE ENS IS PREFERABLE TO OTHER NEURAL TISSUES ACCESSIBLE TO BIOPSIES

The ENS is not the only peripheral neuronal network affected by Lewy pathology that is accessible to biopsies.⁴⁰ For example, autopsy-based studies of patients with PD have revealed that α -synuclein is deposited in peripheral autonomic nervous systems that innervate the skin and the submandibular glands.^{8,41,42} For example, Ikemura et al.⁴² reported α -synuclein aggregates in the abdominal wall and flexor surface of the upper arm in 10 out of 14 patients with full-blown PD. This study prompted a Japanese team to investigate whether or not Lewy pathology could be assessed in living patients using routine skin biopsies from chest and leg. The results of the latter study were disappointing, since only 2 out of 20 patients with PD displayed Lewy pathology in these biopsies.⁴³ The discrepancy between these 2 studies may be explained by differences in the sites which were

used for tissue sampling, the size of the collected biopsies, and the number of examined sections. Two further autopsy studies examined Lewy pathology in the submandibular glands, showing lesions in 22 out of 23 and 9 out of 9 patients with PD, respectively.^{8,41} However, histologic analysis of the submandibular gland can only be achieved following incisional biopsy, a risky and difficult procedure that cannot be used routinely. Although yet to be confirmed, minor salivary glands may recapitulate the alterations in autonomic innervation that are observed in the submandibular gland, and if so, it is possible that analysis of labial salivary glands could be used in the future for the premortem diagnosis of PD.⁴⁴

Therefore, although both salivary glands and the skin may hold promise for the diagnosis of PD in living patients, we believe that the ENS displays several specific features that make it the best candidate tissue for examining peripheral histopathologic markers of PD. As stated above, and in contrast to all other aforementioned tissues, the ENS not only contains postganglionic neuronal processes, but is also an integrated neuronal network.¹³ Therefore, biopsies of the ENS allow the detection of Lewy pathology and also morphologic and quantitative analysis of the enteric neuronal network.¹⁰ Indeed, we have shown that the burden of Lewy pathology in the SMP of patients with PD correlated with a decrease in the number of neurons immunoreactive for neurofilament heavy chain, which likely represents the loss of submucosal neurons.²⁷

PERSPECTIVES The data we have acquired using routine colonic biopsies in patients with PD strongly supports additional future studies aimed at expanding our knowledge of peripheral pathology in this neurodegenerative disorder. For example, colonic biopsies could be used to differentiate between the 2 main synucleinopathies, namely PD and multiple system atrophy. In contrast to PD, the postganglionic autonomic neurons are usually spared in multiple system atrophy,⁴⁵ implying that enteric Lewy pathology is likely to be absent in this condition. This may be indeed the case, since our preliminary data confirmed that the SMP of 3 patients with multiple system atrophy were devoid of pathologic changes (Poucllet, Lebouvier, Neunlist and Derkinderen, unpublished results, 2011). Furthermore, it is tempting to speculate that SMP abnormalities from colonic biopsies may help to detect PD at a prodromal stage. Epidemiologic studies have shown that some nonmotor symptoms such as constipation, REM sleep behavior disorder (RBD), and olfactory impairment can antedate motor symptoms by at least

20 years.⁴⁶ The presence of Lewy pathology outside of the substantia nigra is considered to be the pathologic substrate of these prodromal nonmotor symptoms.⁴⁷ Regarding constipation, it has been suggested that Lewy pathology in the dorsal motor nucleus of the vagus and in the ENS could provide the anatomic basis for gastrointestinal dysfunction.^{9,18} If, as suggested by Braak et al.,^{2,48} the ENS is affected at a very early stage of PD, colonic biopsies could therefore be useful to neurologists for early detection of the disease. However, screening for premotor PD in a large sample of constipated patients seems unrealistic. In contrast, the criteria for screening using colonic biopsies could be extended to include additional markers of premotor PD, for example RBD or hyposmia. Recent prospective studies have indeed demonstrated that approximately one-third of patients displaying isolated RBD developed PD, with a mean interval of 9 to 12 years.⁴⁹ In addition, the risk of developing PD in the ensuing 2 to 4 years is about 7% to 10% in patients with idiopathic hyposmia.⁵⁰ Thus, performing colonic biopsies in patients with gastrointestinal dysfunction, RBD, or hyposmia could increase the identification of patients at risk of developing PD and therefore identify candidates for neuroprotective trials in PD.

Although our method for assessing Lewy pathology in the ENS shows promise, additional studies are required to address some unanswered questions. For example, the extent to which a sole SMP is representative of the whole ENS remains to be determined. In addition, it would be of interest to determine whether the MP, which is also a target of the disease, shows comparable abnormalities to those reported in the SMP. It is likely that the refinement of new endoscopic procedures, such as “no hole” full-thickness biopsies which provide access to myenteric and submucosal ganglia in both stomach and colon, may help to address these critical questions.^{51,52}

The assessment of PD pathology in the ENS of living patients has increased our understanding of the pathophysiology of the disease. This approach opens new avenues for the early diagnosis of PD, and may also hold promise for the investigation of other neurodegenerative disorders.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Dr. Rouaud, Dr. Derkinderen, Dr. Lebouvier, and Dr. De Giorgio wrote the first draft of the manuscript. Dr. Lebouvier and Dr. Derkinderen prepared the figures. Dr. Bruley des Varannes, Dr. De Giorgio, Dr. Neunlist, and Dr. Derkinderen revised the manuscript.

DISCLOSURE

Dr. Derkinderen receives research support from the Michael J Fox Foundation for Parkinson's disease, France Parkinson, Aramisé Fédération française des groupements parkinsoniens, and Fondation de France Parkinsoniens de Vendée. Dr. Rouaud, Dr. Lebouvier, and Dr. Bruley des

Varannes report no disclosures. Dr. Neunlist serves on the editorial board of *Neurogastroenterology & Motility*. Dr. De Giorgio served on the editorial board of *Digestive and Liver Disease* and serves on the editorial boards of the *World Journal of Gastroenterology*, *Neurogastroenterology & Motility*, and *Frontiers in Enteric Neuroscience*; and receives research support from the Ministry of Science Research and Education of Italy, the Ministry of Public Health of Italy, and the Fondazione Del Monte di Bologna e Ravenna.

Received April 28, 2011. Accepted in final form July 7, 2011.

REFERENCES

- Ahlskog JE. Beating a dead horse: dopamine and Parkinson disease. *Neurology* 2007;69:1701–1711.
- Braak H, de Vos RA, Bohl J, Del Tredici K. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett* 2006;396:67–72.
- Braak H, Del Tredici K. Invited article: nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. *Neurology* 2008;70:1916–1925.
- Braak H, Sastre M, Bohl JR, de Vos RA, Del Tredici K. Parkinson's disease: lesions in dorsal horn layer I, involvement of parasympathetic and sympathetic pre- and postganglionic neurons. *Acta Neuropathol* 2007;113:421–429.
- Wakabayashi K, Takahashi H. Neuropathology of autonomic nervous system in Parkinson's disease. *Eur Neurol* 1997;38(suppl 2):2–7.
- Wakabayashi K, Takahashi H, Ohama E, Takeda S, Ikuta F. Lewy bodies in the visceral autonomic nervous system in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 1993;60:609–612.
- Wakabayashi K, Takahashi H, Takeda S, Ohama E, Ikuta F. Parkinson's disease: the presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses. *Acta Neuropathol* 1988;76:217–221.
- Beach TG, Adler CH, Sue LI, et al. Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol* 2009;119:689–702.
- Lebouvier T, Chaumette T, Paillusson S, et al. The second brain and Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 2009;30:735–741.
- Lebouvier T, Coron E, Chaumette T, et al. Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients. *Neurogastroenterol Motil* 2010;22:e11–e14.
- Langley JN. The autonomic nervous system. *Brain* 1901;26:1–26.
- Langley JN, Magnus R. Some observations of the movements of the intestine before and after degenerative section of the mesenteric nerves. *J Physiol* 1905;33:34–51.
- Benarroch EE. Enteric nervous system: functional organization and neurologic implications. *Neurology* 2007;69:1953–1957.
- Goyal RK, Hirano I. The enteric nervous system. *N Engl J Med* 1996;334:1106–1115.
- Neunlist M, Van Landeghem L, Bourreille A, Savidge T. Neuro-glial crosstalk in inflammatory bowel disease. *J Intern Med* 2008;263:577–583.
- De Giorgio R, Camilleri M. Human enteric neuropathies: morphology and molecular pathology. *Neurogastroenterol Motil* 2004;16:515–531.

17. Wood JD. Enteric nervous system: reflexes, pattern generators and motility. *Curr Opin Gastroenterol* 2008;24:149–158.
18. Cersosimo MG, Benarroch EE. Neural control of the gastrointestinal tract: implications for Parkinson disease. *Mov Disord* 2008;23:1065–1075.
19. Schemann M, Neunlist M. The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 2004;16 (suppl 1):55–59.
20. Hoyle CH, Burnstock G. Neuronal populations in the submucous plexus of the human colon. *J Anat* 1989;166:7–22.
21. Domoto T, Bishop AE, Oki M, Polak JM. An in vitro study of the projections of enteric vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive neurons in the human colon. *Gastroenterology* 1990;98:819–827.
22. Hens J, Vanderwinden JM, De Laet MH, Scheuermann DW, Timmermans JP. Morphological and neurochemical identification of enteric neurones with mucosal projections in the human small intestine. *J Neurochem* 2001;76:464–471.
23. Anlauf M, Schafer MK, Eiden L, Weihe E. Chemical coding of the human gastrointestinal nervous system: cholinergic, VIPergic, and catecholaminergic phenotypes. *J Comp Neurol* 2003;459:90–111.
24. Kirchgeßner AL, Gershon MD. Identification of vagal efferent fibers and putative target neurons in the enteric nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 1989;285:38–53.
25. Burnstock G, Costa M. Inhibitory innervation of the gut. *Gastroenterology* 1973;64:141–144.
26. Dafnis G, Ekblom A, Pahlman L, Blomqvist P. Complications of diagnostic and therapeutic colonoscopy within a defined population in Sweden. *Gastrointest Endosc* 2001;54:302–309.
27. Lebourvier T, Neunlist M, Bruley des Varannes S, et al. Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PLoS One* 2010;5:e12728.
28. Qualman SJ, Haupt HM, Yang P, Hamilton SR. Esophageal Lewy bodies associated with ganglion cell loss in achalasia: similarity to Parkinson's disease. *Gastroenterology* 1984;87:848–856.
29. Kupsky WJ, Grimes MM, Sweeting J, Bertsch R, Cote LJ. Parkinson's disease and megacolon: concentric hyaline inclusions (Lewy bodies) in enteric ganglion cells. *Neurology* 1987;37:1253–1255.
30. Wakabayashi K, Takahashi H, Ohama E, Ikuta F. Parkinson's disease: an immunohistochemical study of Lewy body-containing neurons in the enteric nervous system. *Acta Neuropathol* 1990;79:581–583.
31. Jellinger KA. A critical evaluation of current staging of alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Biochim Biophys Acta Epub* 2008.
32. Pfeiffer RF. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2011;17:10–15.
33. Gallagher DA, Lees AJ, Schrag A. What are the most important nonmotor symptoms in patients with Parkinson's disease and are we missing them? *Mov Disord* 2010;25:2493–2500.
34. Benarroch EE, Schmeichel AM, Sandroni P, Low PA, Parisi JE. Involvement of vagal autonomic nuclei in multiple system atrophy and Lewy body disease. *Neurology* 2006;66:378–383.
35. Reed DE, Vanner SJ. Long vasodilator reflexes projecting through the myenteric plexus in guinea-pig ileum. *J Physiol* 2003;553:911–924.
36. Fahn S, Elton R, Members of the UPDRS Development Committee. Unified Parkinson's Disease Rating Scale. In: Fahn S, Marsden C, Calne D, Lieberman A, eds. *Recent Developments in Parkinson's Disease*. New York: Macmillan; 1987:153–163.
37. Espay AJ, Li JY, Johnston L, Chen R, Lang AE. Mirror movements in parkinsonism: evaluation of a new clinical sign. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;76:1355–1358.
38. Aarsland D, Andersen K, Larsen JP, et al. The rate of cognitive decline in Parkinson disease. *Arch Neurol* 2004;61:1906–1911.
39. Alves G, Larsen JP, Emre M, Wentzel-Larsen T, Aarsland D. Changes in motor subtype and risk for incident dementia in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2006;21:1123–1130.
40. Lebourvier T, Tasselli M, Paillusson S, Pouclet H, Neunlist M, Derkinderen P. Biopsable neural tissues: toward new biomarkers for Parkinson's disease? *Front Psychiatry* 2010;1:128.
41. Del Tredici K, Hawkes CH, Ghebremedhin E, Braak H. Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 2009;119:703–713.
42. Ikemura M, Saito Y, Sengoku R, et al. Lewy body pathology involves cutaneous nerves. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008;67:945–953.
43. Miki Y, Tomiyama M, Ueno T, et al. Clinical availability of skin biopsy in the diagnosis of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2009;469:357–359.
44. Cersosimo MG, Perandones C, Micheli FE, et al. Alpha-synuclein immunoreactivity in minor salivary gland biopsies of Parkinson's disease patients. *Mov Disord Epub* 2010.
45. Orimo S, Uchiyama T, Nakamura A, et al. Axonal alpha-synuclein aggregates herald centripetal degeneration of cardiac sympathetic nerve in Parkinson's disease. *Brain* 2008;131:642–650.
46. Savica R, Rocca WA, Ahlskog JE. When does Parkinson disease start? *Arch Neurol* 2010;67:798–801.
47. Dickson DW, Fujishiro H, Orr C, et al. Neuropathology of non-motor features of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2009;15(suppl 3):S1–S5.
48. Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H. A timeline for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2009;16:79–84.
49. Postuma RB, Gagnon JF, Vendette M, Fantini ML, Massicotte-Marquez J, Montplaisir J. Quantifying the risk of neurodegenerative disease in idiopathic REM sleep behavior disorder. *Neurology* 2009;72:1296–1300.
50. Haehner A, Hummel T, Hummel C, Sommer U, Jungs H, Reichmann H. Olfactory loss may be a first sign of idiopathic Parkinson's disease. *Mov Disord* 2007;22:839–842.
51. Neunlist M, Coquenlorge S, Aubert P, et al. Colonic endoscopic full-thickness biopsies: from the neuropathological analysis of the myenteric plexus to the functional study of neuromuscular transmission. *Gastrointest Endosc* 2011;73:1029–1034.
52. Rajan E, Gostout CJ, Lurken MS, et al. Endoscopic “no hole” full-thickness biopsy of the stomach to detect myenteric ganglia. *Gastrointest Endosc* 2008;68:301–307.

Article 10 : Braak a-t-il tort ?

Lebouvier T, Paillusson S, Derkinderen P, Damier P. [*Is Braak Wrong ?*] *Mouvements* 2009, vol 10, n°1. French.

Cet article prend position contre l'hypothèse de Braak. Il passe en revue les arguments s'opposant à l'origine digestive de la maladie de Parkinson et à l'implication d'un pathogène digestif.

faits et opinions

POURQUOI BRAAK A T'IL TORT ? CONTROVERSE SUR L'HYPOTHÈSE DE BRAAK

T. LEBOUVIER, S. PAILLUSSON, P. DERKINDEREN, P. DAMIER

DE BRAAK À BRAAK

Peu de scientifiques peuvent se vanter avoir laissé dans leur discipline une empreinte aussi profonde que celle laissée par Heiko Braak, anatomiste à Francfort, dans le domaine de la neuropathologie. On lui doit notamment la classification éponyme détaillant la progression de la pathologie neurofibrillaire dans la maladie d'Alzheimer (1). Les corrélations anatomocliniques montrent la pertinence de cette classification, qui reste à ce jour indispensable au diagnostic neuropathologique des démences (2). Au cours des dernières années, Braak et collaborateurs se sont focalisés sur les maladies à corps de Lewy (3-10). Leurs publications, avec d'autres, ont remis en cause une vision classique de la maladie de Parkinson centrée sur la substance noire. Cependant, contrairement au large consensus qui accompagnait ses travaux sur la maladie d'Alzheimer, la progression temporospatiale des corps de Lewy proposée par Braak (la seconde « classification de Braak ») est plus controversée. L'utilisation des inclusions d' α -synucléine comme marqueur neuropathologique principal a sans doute moins de

pertinence que celle des agrégats de protéine tau, et les arguments pointant le système nerveux entérique comme origine potentielle de la maladie sont largement débattus.

AUX ORIGINES DE LA MALADIE DE PARKINSON

Les corps et prolongements de Lewy sont les lésions histopathologiques caractéristiques de la MP dans le système nerveux central. Ils abondent dans les noyaux du tronc cérébral présentant une perte neuronale intense : noyau dorsal du vague, complexe du locus coeruleus/subcoeruleus, et substance noire. Ces inclusions neuronales cytoplasmiques sont formées en grande partie par l'agrégation d'une protéine nucléaire et cytoplasmique dont la fonction semble liée à sa capacité de fixation aux membranes, l' α -synucléine (11). L'implication directe de cette protéine dans la pathogénie de la MP est confirmée par l'existence de formes génétiques de la maladie, indistinctes de la forme sporadique, liées à une mutation (12) ou à une multiplication (13) du gène de l' α -

synucléine. La présence d'inclusions de Lewy dans une certaine proportion de sujets sans atteinte neurologique identifiée est connue de longue date. Partant du postulat que ces lésions *incidentes* représentent les stades présymptomatiques de maladie à corps de Lewy, Braak initie en 2002 une vaste étude neuropathologique portant sur 41 patients parkinsoniens et 69 cas de *maladies à corps de Lewy incidentes* (patients indemnes de signes neurologiques au moment du décès malgré la présence d'inclusions d' α -synucléine). L'objectif est d'identifier les premières structures atteintes et le mode de progression de la pathologie.

RETOUR SUR BRAAK

En faisant le constat que certaines structures sont toujours épargnées quand d'autres sont atteintes, et qu'à l'inverse l'atteinte de certaines structures dépend de la présence d'inclusions dans d'autres, Braak élucide la

progression temporo-spatiale des inclusions. Grossièrement ascendante, elle est classée en 6 stades (tableau) (5) : les premières lésions encéphaliques sont observées dans le noyau dorsal du vague, le bulbe olfactif et les noyaux olfactifs antérieurs au *stade 1*. Des agrégats d' α -synucléine sont alors déjà présents dans les centres sympathiques médullaire (9), dans les axones des efférences vagales et au niveau du système nerveux entérique (7). Au *stade 2*, les lésions gagnent les noyaux du raphé et le locus coeruleus. C'est à partir du *stade 3* que le mésencéphale et la substance noire sont touchés conjointement à certains noyaux de la base (noyau basal de Meynert) et à l'amygdale. L'atteinte de l'amygdale est massive au *stade 4*, et s'accompagne de lésions du mésocortex temporal et de la corne d'Ammon. Puis l'atteinte corticale gagne l'insula, le cortex cingulaire (*stade 5*) et le néocortex dans son ensemble (*stade 6*).

Tableau (d'après (8), adapté)

Stades de Braak	Région anatomique	Corrélation clinique putative
1	Bulbe olfactif, noyaux olfactifs antérieurs Noyau dorsal du vague, système nerveux entérique Neurones sympathiques pré et post ganglionnaires Corne dorsale de la moelle épinière	Hyposmie, anosmie Constipation, gastroparésie Troubles génito-urinaires, hypotension orthostatique Douleurs
2	Complexe coeruleus/subcoeruleus, noyaux réticulaires	Troubles du sommeil paradoxal, dépression
3	Substance noire Amygdale (noyau central), noyau pédiculopontin, aire tegmentale ventrale, noyaux cholinergiques du diencéphale	Akinésie, bradykinésie, rigidité Dysautonomie, syndrome dysexécutif
4	Mésocortex temporal Amygdale (noyau basolatéral)	Syndrome dysexécutif, apathie, troubles mnésiques Troubles émotionnels
5	Néocortex associatif multimodal (préfrontal notamment)	Agnosie, apraxie
6	Isocortex associatif unimodal, isocortex primaire	Dysfonctions sensorimotrices

Ce modèle de progression séquentielle et prédictible est conforté par des arguments cliniques et anatomiques. Des études épidémiologiques prospectives montrent d'une part que l'anosmie (14), la constipation (15) et les troubles du sommeil paradoxal (16) constituent des signes précurseurs de la maladie de Parkinson. L'atteinte des centres autonomes et olfactifs au stade 1 et du locus subcoeruleus au stade 2 pourraient rendre compte, respectivement, de ces signes cliniques. D'autre part, Braak témoigne de son érudition d'anatomiste en montrant que cette atteinte séquentielle correspond à des voies anatomiques mettant en jeu des neurones de projection non ou faiblement myélinisés (9). Prenant exemple sur la transmission du prion (17), Braak pose l'hypothèse *d'un pathogène neurotoxique* véhiculé par transport axonal rétrograde. Ce pathogène pourrait être indifféremment inhalé ou ingéré, expliquant l'atteinte primordiale des structures nerveuses olfactives et entériques (18). Dix ans après une approche similaire sur la maladie d'Alzheimer, Braak identifie donc les noyaux olfactifs et les voies autonomes issues du système nerveux entériques comme le siège des premières lésions dans les maladies à corps de Lewy. Un agent pathogène (virus neurotrope, neurotoxique) pourrait rendre compte de la diffusion des lésions par voie axonale et transsynaptique, de proche en proche, au sein du système nerveux. Dans ce modèle, la substance noire n'est en définitive que l'un des maillons de cette chaîne d'évènements neurodégénératifs.

UNE SÉQUENCE CONTESTÉE

Le modèle de progression temporo-spatiale proposé par Braak pose d'évidentes questions méthodologiques. Dédurre une chronologie d'une étude autopsique transversale,

dont la vocation est d'être uniquement descriptive, revient à étudier le vieillissement en étudiant les photographies de passants d'âges différents prises un jour donné. Si de grandes lois peuvent être dégagées (avec le temps, les hommes tendent à perdre leurs cheveux et des rides apparaissent sur le visage), il devient aventureux de prédire la chronologie de chaque phénomène pour un passant donné... C'est pourtant l'esprit de la classification de Braak. De l'organisation spatiale des lésions, l'auteur déduit une séquence temporelle d'évènements. Et de celle-ci naît l'hypothèse d'un neurotoxique progressant par contiguïté. La fragilité de cette hypothèse est qu'elle n'admet pas d'exception : en l'absence d'atteinte du noyau dorsal du vague, pas d'inclusions possibles dans le tronc cérébral, puisque ce noyau viscéromoteur connecté au système nerveux entérique est sensé inaugurer l'atteinte du système nerveux central. Or précisément, les exceptions existent. Si Braak et collaborateurs admettent eux-même de rares cas déviants, des séries neuropathologiques postérieures montrent que de 18,3 % (19), à 47 % (20) des cas ne correspondent à aucun des 6 stades de Braak. Dans ces deux séries le noyau dorsal du vague est épargné respectivement dans 8,3 et 7 % des cas. Plus troublant, dans une série neuropathologique récente, signée par Zaccai et coll, 51 % des cas présentaient des inclusions d' α -synucléine dans une région quelconque du cerveau en l'absence d'atteinte du noyau dorsal du vague (21)... Comment rendre compte d'une telle divergence ? La réponse se trouve sans doute dans les caractéristiques de la population, qui dans l'étude de Zaccai est beaucoup plus âgée que dans les autres séries (75 % ont plus de 80 ans), et dont 50 % des patients étaient déments au moment du décès.

LA DÉMENCE À CORPS DE LEWY, GRANDE OUBLIÉE

L'étude princeps de Braak comporte deux biais de sélection, reconnus en partie par l'auteur. Le premier porte sur les maladies à corps de Lewy incidents : dans la sélection des cas, les lésions incidentes sont surtout recherchées au niveau du tronc cérébral, au détriment des régions limbiques et de l'amygdale (5). Le second est *l'absence de cas de démence à corps de Lewy*. Le continuum clinique et histopathologique avec la maladie de Parkinson incite pourtant à ne pas séparer arbitrairement ces deux pathologies (22). A l'examen neuropathologique, les cas de démence parkinsonienne, évolution ultime de la maladie, sont virtuellement semblables à ceux de démence à corps de Lewy, à d'infimes différences près (23, 24). De même, à la phase d'état, les observations de démence à corps de Lewy dénuées d'atteinte mésencéphalique et du tronc cérébral sont exceptionnelles (24). Il semble donc acquis que quel que soit le mode de révélation, cognitif ou moteur, la pathologie diffuse avec le temps à l'ensemble des structures de prédilection des maladies à corps de Lewy. Aux stades plus précoces cependant, le phénotype cognitif ou moteur des maladies à corps de Lewy pourrait refléter une susceptibilité différente des structures limbiques ou du tronc cérébral, respectivement. Dans la démence à corps de Lewy, l'hypothèse d'une atteinte primitivement amygdalienne, diffusant au cortex limbique puis au néocortex, est envisagée dès 2003 (25). L'étude de Zaccai renforce ce point de vue. Sur 208 patients, parmi 9 régions stratégiques étudiées, la structure la plus fréquemment atteinte de façon élective (c'est-à-dire en l'absence d'inclusions dans les 8 autres) est l'amygdale, loin devant le noyau dorsal du vague, remettant totale-

ment en cause la progression caudo-rostrale imaginée par Braak. Il existerait donc une deuxième chaîne de progression à point de départ amygdalien dans la démence à corps de Lewy, « manquée » par Braak qui avait négligé l'amygdale dans la sélection des cas incidents, et écarté les patients déments de son étude. L'amygdale a d'abondantes connexions avec le cortex limbique, lequel est étroitement relié à l'ensemble du néocortex. L'hypothèse d'un neurotoxique transmis de proche en proche reste plausible, mais l'existence de cas inclassables incite à considérer d'autres hypothèses physiopathologiques.

PROGRESSION PAR CONTIGÜITÉ OU VULNÉRABILITÉ DIFFÉRENTIELLE ?

Plutôt que la cascade de dominos imaginée par Braak, impliquant la transmission de proche en proche d'un pathogène, la progression caudo-crâniale observée dans le tronc cérébral pourrait s'expliquer par des variabilités de vulnérabilité des différents structures au processus pathogénique (26). Le noyau dorsal du vague pourrait être, dans certaines circonstances étiopathogéniques, la première structure atteinte car conjuguant le plus de facteurs de vulnérabilité, le locus coeruleus la deuxième, la substance noire la troisième... Dans d'autres circonstances, les facteurs de vulnérabilité prédomineraient dans l'amygdale, déterminant un mode d'entrée cognitif dans la maladie. Ces facteurs de vulnérabilité sont partiellement connus, et relèvent en partie de susceptibilités génétiques. Parmi ceux-ci les capacités de clairance des agrégats (dépendant de l'intégrité du protéasome), l'environnement cellulaire plus ou moins permissif à l'agrégation de l' α -synucléine et le phénotype des neurones jouent certainement un rôle. Le niveau d'ex-

pression de l' α -synucléine, constitutionnellement élevé dans le noyau dorsal du vague, le locus coeruleus et la substance noire (27), est le plus évident de ces facteurs de vulnérabilité. L' α -synucléine est fortement exprimée dans les efférences du nerf vague et dans certains neurones du système nerveux entérique (28). Cette constatation peut suffire à expliquer l'atteinte périphérique de la maladie de Parkinson, qui concerne électivement les efférences du nerf vague et épargne ses afférences, sans avoir à invoquer un pathogène digestif. De plus, l'atteinte du système nerveux entérique et du nerf vague ne sont qu'un cas particulier de l'atteinte globale du système nerveux végétatif (29), ce qui rend l'hypothèse entérique improbable.

Les observations de Braak peuvent donc être interprétées autrement. A la cascade imaginée en 2003, on peut opposer l'hypothèse d'une susceptibilité différentielle, qui a l'avantage d'expliquer les exceptions (notamment les cas où le noyau dorsal du vague est épargné), et l'atteinte de structures non liées de façon claire aux voies entériques et olfactives.

DES SIGNES PRÉCURSEURS NI SENSIBLES, NI SPÉCIFIQUES

La mise en évidence de signes précurseurs de la maladie de Parkinson (au premier plan desquels les troubles digestifs et de l'olfaction et les troubles du sommeil paradoxal) constitue l'un des arguments phare en faveur de la progression caudo-crâniale de Braak à la phase « prémotrice ». A chacune des structures touchées aux stades 1 et 2 correspond un signe précurseur potentiel (tableau).

Le substratum anatomique de ces signes précurseurs n'est probablement pas uniciste. Dans la physiopathologie des troubles du transit, sensés résulter de la dénervation vagale, le rôle respectif de l'atteinte intrin-

sèque (du système nerveux entérique lui-même) et extrinsèque (des afférences autonomes le connectant au système nerveux) est mal compris. Les facteurs confondants sont nombreux : la constipation du parkinsonien peut aussi résulter d'une atteinte de la motricité volontaire (dystonie du muscle puborectal) ou être iatrogène. Les mêmes approximations sont retrouvées en ce qui concerne l'implication du complexe coeruleus/subcoeruleus dans les troubles du sommeil paradoxal, puisque dans les cas avérés de troubles du sommeil paradoxal résultant d'une synucléinopathie, l'atteinte de cette région n'a jamais été observée indépendamment de celle de la substance noire (30). Si diverses études prospectives établissent de façon indiscutable que constipation, troubles du sommeil paradoxal et atteinte olfactive sont des signes précurseurs de la maladie, les rares données rétrospectives montrent que ***leur présence est plus une exception qu'une règle*** : moins de 40 % des patients parkinsoniens souffrent de constipation avant les premiers signes moteurs (31), qui apparaît le plus souvent avec la progression de la maladie. La proportion de maladies de Parkinson précédées par des troubles du sommeil paradoxal n'a jamais été estimée, ce qui s'explique volontiers par les difficultés du diagnostic rétrospectif. Il est vraisemblable qu'elle se situe plutôt à la limite inférieure de leur prévalence à la phase d'état, estimée entre 15 et 40 % selon les études (32, 33). Les troubles du sommeil paradoxal comme l'atteinte olfactive soulèvent enfin le problème de leur absence de spécificité pour la maladie de Parkinson. Les premiers peuvent annoncer une atrophie multisystématisée ; l'anosmie, quasi-constante dans la maladie de Parkinson et signe précurseur fidèle (34), peut révéler une maladie d'Alzheimer (35).

L'analyse critique montre que les corrélations anatomo-cliniques restent purement spéculatives, et que ces symptômes dont la spécificité est imparfaite concernent une minorité de patients. L'étude de la combinaison de symptômes pré moteurs devrait définir des profils de patients « Braak-compatibles » (36). Le suivi longitudinal de ces patients établira la valeur prédictive de maladie de Parkinson dans cette minorité de patients, sans doute élevée.

LES CORPS DE LEWY, MARQUEURS INCONSTANTS OU ACTEURS OBLIGATOIRES ?

En pathologie dégénérative, la dégénérescence synaptique et neuronale, directement responsable des symptômes, contribue très peu au diagnostic neuropathologique, qui repose essentiellement sur des signes indirects. Ce paradoxe tient à la difficulté de montrer la perte neuronale en anatomie pathologique (la prouver requiert des techniques de comptage stéréologique fastidieuses). Découvertes au début du siècle dernier (37, 38), les inclusions neuronales constituent les signes indirects les plus couramment utilisés. L'immunohistochimie permet d'appréhender facilement leur composition protéique (protéine tau, α -synucléine), ce qui permet d'envisager une classification « protéique » des pathologies neurodégénératives (taupathies, synucléinopathies, etc.). Dans des taupathies comme la maladie d'Alzheimer, la présence de dégénérescences neurofibrillaires est assez bien corrélée à la perte neuronale et aux signes cliniques (39). Témoins immuables du processus dégénératif, ces agrégats de protéine tau persistent après la mort neuronale sans induire de réaction inflammatoire (dégénérescences neurofibrillaires « fantômes ») (40). Depuis l'identification

de l' α -synucléine comme constituant principal des inclusions de Lewy en 1997 (11), les séries anatomopathologiques montrent que ces agrégats sont beaucoup moins bien corrélés à la perte neuronale et aux symptômes. Dans la démence à corps de Lewy par exemple, le phénotype est beaucoup mieux corrélé à la pathologie neurofibrillaire associée qu'aux corps de Lewy corticaux (41). L'une des explications tient probablement à leur caractère éphémère (la durée de vie d'un corps de Lewy a pu être estimée à 6,2 mois (42) : on suppose que la densité des inclusions de Lewy suit une courbe en cloche, décroissant finalement avec la perte neuronale. Plus troublant encore, dans les formes familiales de maladie de Parkinson, par mutation sur le gène de la parkine ou de la leucine rich repeat kinase 2 (LRRK2), les corps de Lewy sont présents de façon variable, indépendamment du phénotype et de la perte neuronale ; le plus souvent, la destruction de la substance noire ne s'accompagne d'aucune caractéristique histologique distinctive (43, 44). A l'inverse, la présence de corps de Lewy chez des sujets non parkinsoniens, définie comme maladie à corps de Lewy incidents, est une découverte autopsique fréquente : 17% des cas dans une série récente (45), avec parfois une densité importante dans le néocortex ou la substance noire sans traduction clinique. Leur prévalence augmente encore avec l'âge et la présence d'une pathologie neurofibrillaire : jusqu'à 60% des cas de démence d'Alzheimer s'accompagnent d'une pathologie de Lewy concomitante (46). Dans ces cas, les inclusions apparaissent comme des signes de dégénérescence neuronale non spécifique. Dans le contexte, une classification basée exclusivement sur la présence d'inclusions et négligeant la perte neuronale apparaît dis-

cutable. L'absence d'inclusions ne témoigne pas de l'absence de neurodégénérescence, et leur présence n'a pas obligatoirement de traduction clinique.

RENDRE À BRAAK CE QUI LUI APPARTIENT

« En sciences, nul besoin d'être poli, il suffit d'avoir raison. » C'est par cette citation de Winston Churchill que Braak répondait élégamment à l'un de ses contradicteurs les plus virulents (47, 48). Façon de signifier que seule une étude neuropathologique sur une large série de cas parfaitement définis cliniquement trancherait la controverse, et que le reste n'est que littérature. Nous pensons pour notre part que les impressionnants travaux d'Heiko Braak, malgré des imperfections souvent inhérentes à la neuropathologie, ont le mérite d'exister. Il a su focaliser l'attention sur les lésions extra-

dopaminergiques de la maladie de Parkinson, notamment aux stades précoces. Dans son sillage, de nombreuses études ont été menées sur les troubles du sommeil paradoxal, le système nerveux entérique ou l'olfaction. Et les controverses telles que celle dont nous nous faisons le relais sont souvent passionnantes et stimulantes. Mais s'il fallait prendre parti, nous pensons que les développements récents rendent très incertaine l'hypothèse du neurotoxique, et improbable en tous cas son origine entérique. Nous sommes convaincus que nombre de patients répondent à son modèle de progression temporo-spatiale, mais que ce modèle ne saurait s'appliquer à l'ensemble des cas. Les neurologues font quotidiennement l'expérience de la diversité symptomatique des maladies de Parkinson : rien d'étonnant dès lors qu'un modèle unique et figé ne suffise pas à en rendre compte.

RÉFÉRENCES :

1. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991;82:239-59.
2. Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer's disease. The National Institute on Aging, and Reagan Institute Working Group on Diagnostic Criteria for the Neuropathological Assessment of Alzheimer's Disease. *Neurobiol Aging* 1997;18:S1-2.
3. Braak E, Sandmann-Keil D, Rub U *et al.* alpha-synuclein immunopositive Parkinson's disease-related inclusion bodies in lower brain stem nuclei. *Acta Neuropathol* 2001;101:195-201.
4. Del Tredici K, Rub U, De Vos RA, Bohl JR, Braak H. Where does parkinson disease pathology begin in the brain? *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61:413-26.
5. Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003;24:197-211.

6. Braak H, Bohl JR, Muller CM, Rub U, de Vos RA, Del Tredici K. Stanley Fahn Lecture 2005: The staging procedure for the inclusion body pathology associated with sporadic Parkinson's disease reconsidered. *Mov Disord* 2006;21:2042-51.
7. Braak H, de Vos RA, Bohl J, Del Tredici K. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett* 2006;396:67-72.
8. Wolters E, Braak H. Parkinson's disease: premotor clinico-pathological correlations. *J Neural Transm Suppl* 2006;309-19.
9. Braak H, Sastre M, Bohl JR, de Vos RA, Del Tredici K. Parkinson's disease: lesions in dorsal horn layer I, involvement of parasympathetic and sympathetic pre- and postganglionic neurons. *Acta Neuropathol* 2007;113:421-9.
10. Braak H, Del Tredici K. Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. *Neurology* 2008;70:1916-25.
11. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alphasynuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997;388:839-40.
12. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, *et al.* Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997;276:2045-7.
13. Singleton A, Gwinn-Hardy K, Sharabi Y, *et al.* Association between cardiac denervation and parkinsonism caused by alpha-synuclein gene triplication. *Brain* 2004;127:768-72.
14. Ponsen MM, Stoffers D, Booij J, van Eck-Smit BL, Wolters E, Berendse HW. Idiopathic hyposmia as a preclinical sign of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2004;56:173-81.
15. Abbott RD, Petrovitch H, White LR, *et al.* Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson's disease. *Neurology* 2001;57:456-62.
16. Postuma RB, Gagnon JF, Vendette M, Fantini ML, Massicotte-Marquez J, Montplaisir J. Quantifying the risk of neurodegenerative disease in idiopathic REM sleep behavior disorder. *Neurology* 2009;72:1296-300.
17. Haik S, Faucheux BA, Hauw JJ. Brain targeting through the autonomous nervous system: lessons from prion diseases. *Trends Mol Med* 2004;10:107-12.
18. Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2007;33:599-614.
19. Attems J, Jellinger KA. The dorsal motor nucleus of the vagus is not an obligatory trigger site of Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2008;34:466-7.
20. Kalaitzakis ME, Graeber MB, Gentleman SM, Pearce RK. The dorsal motor nucleus of the vagus is not an obligatory trigger site of Parkinson's disease: a critical analysis of alphasynuclein staging. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2008;34:284-95.
21. Zaccai J, Brayne C, McKeith I, Matthews F, Ince PG. Patterns and stages of alphasynucleinopathy : relevance in a population-based cohort. *Neurology* 2008;70:1042-8.
22. McKeith I, Mintzer J, Aarsland D, *et al.* Dementia with Lewy bodies. *Lancet Neurol* 2004;3:19-28.
23. Tsuboi Y, Dickson DW. Dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease with dementia: are they different? *Parkinsonism Relat Disord* 2005;11 Suppl 1:S47-51.
24. Ballard C, Ziabreva I, Perry R, *et al.* Differences in neuropathologic characteristics across the Lewy body dementia spectrum. *Neurology* 2006;67:1931-4.

25. Katsuse O, Iseki E, Marui W, Kosaka K. Developmental stages of cortical Lewy bodies and their relation to axonal transport blockage in brains of patients with dementia with Lewy bodies. *J Neurol Sci* 2003;211:29-35.
26. Burke RE, Dauer WT, Vonsattel JP. A critical evaluation of the Braak staging scheme for Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2008;64:485-91.
27. Solano SM, Miller DW, Augood SJ, Young AB, Penney JB, Jr. Expression of alphasynuclein, parkin, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 mRNA in human brain: genes associated with familial Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2000;47:201-10.
28. Phillips RJ, Walter GC, Wilder SL, Baronowsky EA, Powley TL. Alpha-synucleinimmunopositive myenteric neurons and vagal preganglionic terminals: Autonomic pathway implicated in Parkinson's disease ? *Neuroscience* 2008 ;153 :733-50.
29. Lebouvier T, Chaumette T, Damier P, Neunlist M, Derkinderen P. Second cerveau et maladie de Parkinson. *Mouvements* 2008;9:93-8.
30. Gagnon JF, Postuma RB, Mazza S, Doyon J, Montplaisir J. Rapid-eye-movement sleep behaviour disorder and neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol* 2006;5:424-32.
31. Korczyn AD. Autonomic nervous system disturbances in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 1990;53:463-8.
32. Poewe W. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 2008;15 Suppl 1:14-20.
33. Scaglione C, Vignatelli L, Plazzi G, *et al.* REM sleep behaviour disorder in Parkinson's disease: a questionnaire-based study. *Neurol Sci* 2005;25:316-21.
34. Doty RL. Olfaction in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2007;13 Suppl 3:S225-8.
35. Demarquay G, Ryvlin P, Royet JP. Olfaction and neurological diseases: a review of the literature. *Rev Neurol (Paris)* 2007;163:155-67.
36. Stiasny-Kolster K, Doerr Y, Moller JC, *et al.* Combination of 'idiopathic' REM sleep behaviour disorder and olfactory dysfunction as possible indicator for alpha-synucleinopathy demonstrated by dopamine transporter FP-CIT-SPECT. *Brain* 2005;128:126-37.
37. Alzheimer A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschr Psychiatr Gerichtlisch Med* 1907; 64:146-8.
38. Tretiakoff C. Contribution a l'etude de l'anatomie pathologique du locus niger de Soemmering avec quelques deductions relatives a la pathogenie des troubles du tonus musculaire et de la maladie de Parkinson. Paris, 1919.
39. Petersen RC, Parisi JE, Dickson DW, *et al.* Neuropathologic features of amnesic mild cognitive impairment. *Arch Neurol* 2006;63:665-72.
40. Dickson D. Neurodegeneration : the molecular pathology of dementia and movement disorders. Basel, Switz.: International Society of Neuropathology, 2003.
41. Weisman D, Cho M, Taylor C, Adame A, Thal LJ, Hansen LA. In dementia with Lewy bodies, Braak stage determines phenotype, not Lewy body distribution. *Neurology* 2007;69:356-9.
42. Greffard S, Verny M, Bonnet AM, Seilhean D, Hauw JJ, Duyckaerts C. A stable proportion of Lewy body bearing neurons in the substantia nigra suggests a model in which the Lewy body causes neuronal death. *Neurobiol Aging* 2008;May 3 (ahead of print)
43. Sasaki S, Shirata A, Yamane K, Iwata M. Parkin-positive autosomal recessive juvenile Parkinsonism with alpha-synuclein-positive inclusions. *Neurology* 2004;63:678-82.

44. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, *et al.* Mutations in LRRK2 cause autosomaldominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 2004;44:601-7.
45. Bloch A, Probst A, Bissig H, Adams H, Tolnay M. Alpha-synuclein pathology of the spinal and peripheral autonomic nervous system in neurologically unimpaired elderly subjects. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2006;32:284-95.
46. Hamilton RL. Lewy bodies in Alzheimer's disease: a neuropathological review of 145 cases using alpha-synuclein immunohistochemistry. *Brain Pathol* 2000;10:378-84.
47. Kalaitzakis ME, Graeber MB, Gentleman SM, Pearce RK. Evidence against a reliable staging system of alpha-synuclein pathology in Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2009;35:125-6.
48. Kalaitzakis ME, Graeber MB, Gentleman SM, Pearce RK. Controversies over the staging of alpha-synuclein pathology in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 2008;116:125-8; author reply 129-131.

ADRESSE POUR CORRESPONDANCE :

T. LÉBOUVIER, S. PAILLUSSON, P. DERKINDEREN, P. DAMIER – Service de Neurologie et CIC 00041 – INSERM UMR913 et UMR643 – CHU de Nantes - BP 1050 – F/44032 Nantes Cedex – E-mail : thibaud.lebouvier@univ-nantes.fr

Appendices : participation à des travaux tiers

Article 11 : Neurochemical plasticity in the enteric nervous system of a primate animal model of experimental parkinsonism

Chaumette T, Lebouvier T, Aubert P, Lardeux B, Qin C, Li Q, Accary D, Bézard E, Bruley des Varannes S, Derkinderen P and Neunlist M. *Neurochemical plasticity in the enteric nervous system of a primate animal model of experimental parkinsonism*. *Neurogastroenterol Motil*. 2009 Feb;21(2):215-22.

Ce travail auquel j'ai collaboré en arrivant au laboratoire, signé par Tanguy Chaumette, effectue une caractérisation histologique exhaustive du SNE dans le modèle animal pharmacologique principal de la MP. L'intérêt de l'étude est remis en question par la conception actuelle de la MP, qui s'affranchit du rôle autrefois central attribué au neurone dopaminergique. Le MPTP est un poison spécifique des neurones dopaminergiques. Or les structures les plus précocement atteintes dans la maladie ne sont pas dopaminergiques, et les rares neurones dopaminergiques du SNE ne souffrent pas de façon élective.

L'étude est néanmoins intéressante d'un point de vue conceptuel car elle montre l'effet toxique parallèle du MPTP sur les neurones dopaminergiques du SNE et du SNC, et renforce l'idée du SNE comme miroir du SNC.

Neurochemical plasticity in the enteric nervous system of a primate animal model of experimental Parkinsonism

T. CHAUMETTE,*,†,‡ T. LEBOUVIER,*,†,§ P. AUBERT,*,†,‡ B. LARDEUX,*,†,‡ C. QIN,¶ Q. LI,¶ D. ACCARY,** E. BÉZARD,** S. BRULEY DES VARANNES,*,†,‡ P. DERKINDEREN*,†,‡,§ & M. NEUNLIST*,†,‡

*Inserm, U913, Nantes, France

†University Nantes, Nantes, France

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

§Department of Neurology, CHU Nantes, Nantes, France

¶Institute of Lab Animal Sciences, China Academy of Medical Sciences, Beijing, China

**CNRS, UMR 5527, Université Victor Segalen-Bordeaux 2, Bordeaux, France

Abstract Emerging evidences suggest that the enteric nervous system (ENS) is affected by the degenerative process in Parkinson's disease (PD). In addition lesions in the ENS could be associated with gastrointestinal (GI) dysfunctions, in particular constipation, observed in PD. However, the precise alterations of the ENS and especially the changes in the neurochemical phenotype remain largely unknown both in PD and experimental Parkinsonism. The aim of our study was thus to characterize the neurochemical coding of the ENS in the colon of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated monkeys, a well-characterized model of PD. In the myenteric plexus, there was a significant increase in the number of neurons per ganglia (identified with Hu), especially nitric oxide synthase immunoreactives (IR) neurons in MPTP-treated monkeys compared to controls. A concomitant 72% decrease in the number of tyrosine hydroxylase-IR neurons was observed in MPTP-treated monkeys compared to controls. In contrast no change in the cholinergic or vasoactive intestinal peptide-IR population was observed. In addition, the density of enteric glial cells was not modified in MPTP-treated monkeys. Our results demonstrate that MPTP induces major changes in the myenteric plexus and to a lesser extent in the submucosal plexus of monkeys. They further reinforce the observation that lesions of the ENS occur

in the course of PD that might be related to the GI dysfunction observed in this pathology.

Keywords 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, colon, enteric nervous system, Parkinson's disease, tyrosine hydroxylase.

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease. The core of the neuronal lesions in PD is the progressive degeneration of dopaminergic neurons in the *substantia nigra*, which is responsible for the major motor symptoms of the disease.¹ Nevertheless, it has become increasingly evident that non-motor symptoms, which can occur early in the course of the disease, are frequent and disabling.² Gastrointestinal (GI) impairment, consisting mainly in gastroparesis, transit constipation and defecatory dysfunction, is one of the prominent non-motor feature of PD for which therapeutic options are of limited efficiency.^{3,4} Constipation, mainly related to altered colonic motility, appears to be the most common GI symptom in PD patients.⁵ However, the precise mechanisms of this colonic dysmotility in PD remain largely unknown.^{6,7}

Neural regulation of GI functions is largely mediated by the enteric nervous system (ENS), which is a neuronal network organized in two major ganglionated plexuses, the myenteric plexus (MP) and submucosal plexus (SMP).⁸ Enteric neurons and enteric glial cells (EGC) of the MP are mainly involved in the control of motor functions while that of the SMP are involved in the control of intestinal barrier functions.⁸ Neuronal regulation of GI functions is due to the liberation of

Address for correspondence

Michel Neunlist, Inserm U913, 1 place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes, France.

Tel: +33(0)240087515; fax: +33(0)240087506;

e-mail: michel.neunlist@univ-nantes.fr

Received: 1 August 2008

Accepted for publication: 9 October 2008

specific neuromediators synthesized by functionally defined neurons. In particular, vasoactive intestinal peptide (VIP) or nitric oxide is found in inhibitory muscle motoneurons while acetylcholine is found in excitatory motoneurons.⁹ Dopamine has also been identified as an enteric inhibitory neuromediator of GI motility.¹⁰

Alterations of the neurochemical coding of enteric neurons and/or changes in the phenotype of EGC have been described in several GI pathologies such as inflammatory bowel disease, achalasia and constipation.^{11–14} Lewy bodies, the pathological hallmark of PD in the central nervous system, have been also identified in the ENS of PD patients, presumably in VIPergic neurons.¹⁵ However, the precise neurochemical alterations of the ENS during PD remain largely unknown, except a decrease in the number of dopamine-immunoreactive (IR) neurons in the colon of PD patients.¹⁶ This paucity of data is due in large part to the limited access of whole mount preparations of the ENS in colonic tissues from PD patients, as the majority of the studies were performed using autopsy material.^{17–19} Therefore to overcome the poor availability of human tissue, validated animal models of PD could prove themselves a valuable tool to characterize the lesions in the ENS during the disease.

The neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) has been widely used to study PD in primates and rodents.²⁰ Repetitive administration of MPTP over time in monkeys initiates a process of neurodegeneration reminiscent of that seen in humans during PD.²¹ A recent study in mice has shown that a single injection of MPTP leads to a rapid 40% decrease in the proportion of tyrosine hydroxylase (TH)-IR neurons in the ileum.²² Nevertheless, whether chronic administration of MPTP also alters the colonic neuronal and glial phenotype is currently unknown.

Therefore, the aim of this study was to characterize the neurochemical phenotype of submucosal and myenteric neurons as well as EGC in monkeys chronically treated with MPTP.

MATERIALS AND METHODS

Animal study

All animal studies were carried out in accordance with European Communities Council Directive for the care of laboratory animals (86/609/EEC). Experiments were conducted according to previously published procedures and methods on 12 male rhesus

monkeys (*Macaca mulatta*; SAH/Xierxin, Beijing, China). Six monkeys received once daily i.v. injections of MPTP hydrochloride (0.2 mg kg^{-1}) until they displayed parkinsonian symptoms including rigidity and bradykinesia (mean cumulative dose of 3.7 mg kg^{-1}).²¹ The remaining six animals received vehicle only (control group). Animals were then kept without dopaminergic supplementation for 5 months before killing. All MPTP-treated animals displayed a severe decrease in striatal DA transporter binding ($4.3 \pm 2.7 \text{ fmol mg}^{-1}$ of equivalent tissue) compared to control animals ($142.3 \pm 9.1 \text{ fmol mg}^{-1}$ of equivalent tissue) in the brain.²³ Stool consistency was monitored using Bristol stool scale²⁴ 1 week before killing. There was no difference in stool consistency between controls and MPTP-treated animals (data not shown).

Tissue collection and immunohistochemistry

Following euthanasia of animals, the ascending colon was removed, stretched and pinned flat on Sylgard-coated Petri dishes, and fixed overnight in 4% phosphate buffer saline (PBS) paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France). The macroscopic aspect of bowel was not different between control and MPTP-treated animals. Layers of tissue containing the MP and the internal SMP (Meissner plexus) were then separated by microdissection.¹³ Samples were permeabilized for 2 h in a 4% horse serum/PBS blocking buffer containing 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), and incubated for 24 h with the following primary antibodies diluted in the blocking buffer: goat anti-choline acetyl transferase (ChAT) (1 : 200; Millipore, St Quentin en Yvelines, France), mouse anti-VIP (1 : 800; Euromedex, Mundolsheim, France), rabbit anti-nNOS (1 : 2000; COGER, Paris, France), rabbit anti-TH (1 : 500; Pel-Freez, Rogers, AR, USA), sheep anti-TH (1 : 500; Pel-Freez, Rogers, AR, USA), mouse anti-Hu C/D (1 : 200; Invitrogen, Cergy Pontoise, France), mouse anti-Sox-10 (1 : 500; M. Wegner, University of Erlangen, Germany), mouse antiactive caspase-3 (1 : 1000; Sigma-aldrich). Samples were washed with PBS and incubated for 3 h with a combination of donkey anti-rabbit IgG conjugated to carboxymethylindocyanine (CY3, 1 : 500; Immunotech, Marseille, France), donkey anti-mouse IgG conjugated to CY3 (1 : 500; Immunotech), donkey anti-sheep IgG conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC, 1 : 500; Immunotech), donkey anti-rabbit IgG conjugated to FITC (1 : 500; Interchim, Montluçon, France) and donkey anti-mouse IgG conjugated to CY5 (1 : 500; Immunotech).

Identification of neuronal cell populations and phenotypic analysis

Immunoreactive neurons for VIP, ChAT, nNOS, TH and Hu C/D were counted in at least 20 ganglia per condition and per animal (mean 757.0 ± 136.7 myenteric neurons per condition and per animal). The relative proportion of ChAT-, VIP-, nNOS- and TH-IR neurons was expressed as a percentage of the total number of neurons determined with the general neuronal marker Hu C/D. For each animal, the mean of the proportion of a given marker within a ganglion was calculated for all ganglia evaluated. Enteric glial cells counting (using anti-Sox-10 antibody) was performed in five ganglia per animal (mean 279.5 ± 59.7 myenteric glial cells per animals).

Statistical analysis

Data are represented as mean $\pm$ standard deviation. Analysis of the distribution was made using the Kolmogorov-Smirnov test, the homogeneity of variances was tested using the Levene's test for equality of variances. For comparison the two-tailed Student's *t*-test was used. *P*-values <0.05 were considered significant. Statistical analysis was performed using SIGMASTAT 3.10 for Windows (Systat Software, Erkrath, Germany).

RESULTS

Neuronal population increases in the myenteric but not in SMP in experimental parkinsonism

The general neuronal and glial populations were first studied in control and MPTP-intoxicated monkeys in both the MP and SMP.

In the MP of MPTP-treated monkeys, there was a significant 20% increase in the number of Hu-IR neurons (44.7 ± 7.2 ; $n = 6$) when compared to control (35.0 ± 4.9 ; $n = 6$; $P = 0.02$; Fig. 1A–C). In contrast, no change in the number of neurons was observed in the SMP between control and MPTP-treated animals (10.9 ± 0.7 Hu-IR neurons and 11.1 ± 0.9 respectively; $n = 5$; $P = 0.87$) (Fig. 1D–F). In addition, no change was observed in the density of myenteric ganglia in MPTP-treated monkeys (98.8 ± 24.7 ganglia cm^{-2} ; $n = 5$) when compared to control (76.1 ± 29.7 ; $n = 5$; $P = 0.23$). No active caspase 3-IR neurons were observed in the MP or SMP of control or MPTP-treated animals (data not shown). Consistently, no degenerative signs such as reduced neuronal cytoplasmic size was observed in MPTP-treated monkeys when compared to control ($412 \pm 153 \mu\text{m}^2$ vs 380 ± 110 ; $n = 5$; $P = 0.72$ respectively).

No significant difference was observed between the number of EGC (identified with Sox10) in the MP of control (262.9 ± 86.6 ; $n = 4$) and MPTP-treated animals (292.7 ± 31.8 ; $n = 5$; $P = 0.49$) (Fig. 1G–I). However, the ratio glia/neurons was significantly reduced in MPTP-treated monkeys when compared to control (5.4 ± 0.6 and 8.1 ± 1.7 respectively; $P = 0.019$).

Neurochemical phenotype of the ENS is affected in experimental Parkinsonism

Myenteric plexus The neurochemical coding of the MP of monkeys was assessed using triple immunohistochemical staining.

In control animals, the majority of colonic neurons were nNOS-IR ($51.0 \pm 4.1\%$ of Hu-IR neurons; $n = 5$) and ChAT-IR ($29.9 \pm 5.8\%$; $n = 5$) (Fig. 2A–C). In addition, $11.2 \pm 1.3\%$ ($n = 5$) of myenteric neurons were TH-IR and $0.8 \pm 0.3\%$ ($n = 5$) VIP-IR (Fig. 2D–F). Analysis of colocalization was performed on the three major populations identified, i.e. nNOS, ChAT and TH. Choline acetyl transferase and nNOS formed neurochemically distinct populations with only $1.0 \pm 0.3\%$ ($n = 5$) of neurons expressing ChAT and nNOS-IR simultaneously. Regarding the TH-IR population, $98.3 \pm 2.5\%$ ($n = 5$) of TH-IR neurons were also nNOS-IR and almost none was ChAT-IR ($0.03 \pm 0.01\%$; $n = 5$) (Fig. 2G–H).

In MPTP-treated animals, significant changes in the phenotype of myenteric neurons were observed. First, there was a significant 25% increase in the number of nNOS-IR neurons per ganglion when compared to control (21.0 ± 3.1 and 17.3 ± 2.0 respectively; $P = 0.049$; Fig. 3A–C), although the proportion of nNOS-IR neurons ($51.9 \pm 5.6\%$; $n = 5$) (normalized to Hu-IR neurons) remained similar to control ($51.0 \pm 4.1\%$; $n = 5$; $P = 0.95$). Secondly in MPTP-treated animals, the number of TH-IR neurons per ganglion was significantly reduced by 64% when compared to control ($n = 5$; $P = 0.008$) (Fig. 3D–F) and the proportion of TH-IR neurons by 72% ($3.1 \pm 0.6\%$ and $11.1 \pm 3.0\%$ respectively; $n = 5$; $P = 0.001$). The number of ChAT-IR neurons per ganglion remained similar in MPTP-treated monkeys when compared to control (10.0 ± 1.7 and 10.8 ± 1.9 respectively; $n = 5$; $P = 0.51$). Furthermore, the proportion of ChAT-IR neurons was not significantly reduced in MPTP treated monkeys when compared to control ($25.9 \pm 2.0\%$ and $29.9 \pm 5.8\%$ respectively; $n = 5$; $P = 0.18$) (Fig. 3C). No significant change in the number per ganglia and proportion of VIP-IR neurons was observed in MPTP-treated monkeys when compared to control (Fig. 3F).

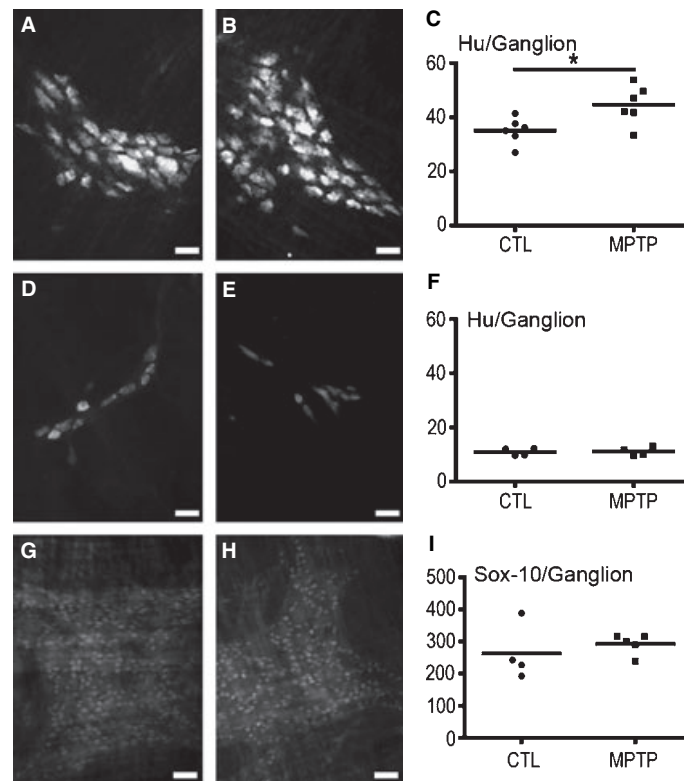


Figure 1 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) increases the number of myenteric but not submucosal neurons and does not change the number of myenteric enteric glial cells (EGC). Hu-immunoreactive (IR) myenteric neurons were identified in the colon of control (A) and MPTP-treated monkeys (B). MPTP treatment induced a significant increase in the number of Hu-IR myenteric neurons per ganglion ($n = 6$ controls and 6 MPTP-treated monkeys; $P = 0.022$) (C). Hu-IR submucosal neurons were identified in the colon of control (D) and MPTP-treated monkeys (E). MPTP treatment did not change the number of Hu-IR submucosal neurons per ganglion ($n = 4$ controls and 4 MPTP-monkeys) (F). Sox-10-IR EGC were identified in the myenteric plexus (MP) of control (G) and MPTP-treated monkeys (H). MPTP treatment did not change the number of Sox-10-IR EGC per ganglion in the MP ($n = 4$ controls and 5 MPTP-monkeys) (I). Each point represents a value from a monkey injected with vehicle (circle) or with MPTP (square). Horizontal bars represent the mean. Scale bar: 40 μ m.

Submucosal plexus The neurochemical coding of the SMP of monkeys was analysed using triple immunohistochemical staining (Fig. 4A–C).

In control animals, $44.0 \pm 2.4\%$ of submucosal neurons was nNOS-IR and $38.1 \pm 6.0\%$ ChAT-IR. Analysis of colocalization was performed on the two major populations identified, i.e. nNOS and ChAT. Simultaneously ChAT- and nNOS-IR neurons formed $33.1 \pm 6.7\%$ of the Hu-IR neurons in control animals. In MPTP-treated animals, there was no significant change in these populations when compared to control. Indeed, nNOS-IR neurons formed $43.7 \pm 1.9\%$ of Hu-IR neurons ($P = 0.85$) and ChAT-IR neurons represented $35.3 \pm 9.9\%$ of Hu-IR neurons ($P = 0.70$) (Fig. 4E). Tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons were fainter in the SMP (Fig. 4D) when compared to the MP (Fig. 3D–E), and they formed $10.5 \pm 1.8\%$ of Hu-IR neurons in control animals (Fig. 4E). This proportion was significantly reduced by 49% in MPTP-treated

animals ($5.1 \pm 1.7\%$; $n = 5$) when compared to control ($P = 0.003$).

DISCUSSION

This study was performed in monkeys chronically treated with MPTP according to a regimen that closely mimics the degeneration pattern of the *substantia nigra* of human PD, thereby producing a progressive parkinsonian state.²¹ We showed profound and differential alterations of the neurochemical coding in the colonic MP when compared to the SMP. The changes in the MP were characterized by a significant decrease in the number of TH-IR neurons and a concomitant increase in the number of nNOS-IR neurons associated with an increase in the total number of neurons per ganglion. In contrast, only a decrease in the proportion of TH-IR neurons was observed in the SMP.

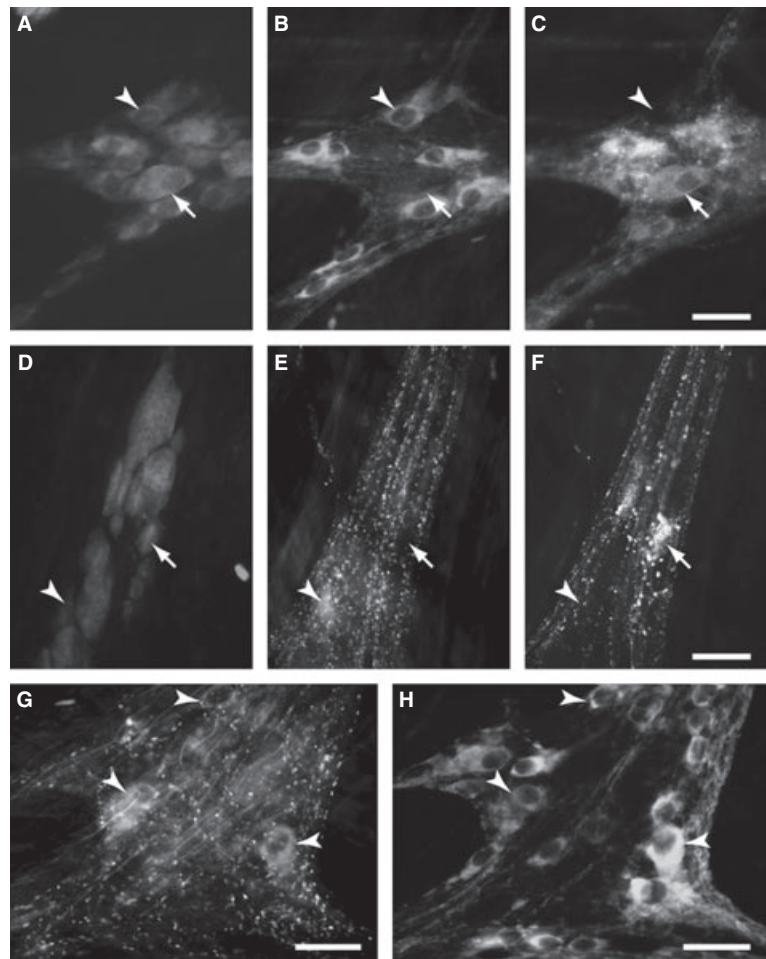


Figure 2 Immunohistochemical detection of transmitter coding of myenteric plexus from control monkeys. Triple labelling with antibodies against Hu (A), nNOS (B) and choline acetyltransferase (ChAT) (C) showed that the majority of neurons are either nNOS-immunoreactive (IR) (arrowhead) or ChAT-IR (arrow). Triple labelling with antibodies against Hu (D), tyrosine hydroxylase (TH) (E) and VIP (F) showed that few neurons are TH-IR (arrowhead) and exceptionally VIP-IR (arrow). Most of TH-IR neurons (arrowhead) (G) co-expressed nNOS (H). Scale bar: 40 μ m.

An important result of this study was the first establishment of the neurochemical coding of the ENS in the colon of monkeys. Due to important interspecies differences in the ENS properties (neurochemical coding, electrophysiological properties), identification of animal species with a neurochemical coding similar to that of the human might be useful, especially for the study of human diseases. The proportions of major neuromediators of the ENS are similar to that observed in the human colon, in particular for NOS-IR (51%)²⁵ and for ChAT-IR neurons (34%).¹³ Furthermore, the proportion of TH-IR neurons in the MP and SMP of monkey (11% and 10% respectively) was similar to that obtained in human colon (12% and 14.7% respectively).¹⁶ Interestingly, all the TH-IR neurons were NOS-IR but not ChAT-IR. This is consistent with a study in human in which TH-IR cell body is found not to be cholinergic.²⁶ Finally, the ratio glia to neurons was also similar both in the colonic MP of the monkey (8) and in the human (5.9–7).²⁷ Taken together these data

suggest a close similarity in the ENS phenotype between humans and this non-human primate model.

Our study characterized the alterations of the neurochemical phenotype induced by MPTP in the colonic ENS. It showed that the number of TH-IR neurons in the MP and SMP of monkeys treated with MPTP was reduced when compared to control. Although TH is a marker of both dopaminergic and noradrenergic neurons, the majority of TH-positive neurons with the cell bodies in the MP are considered to be dopaminergic.²⁸ The decrease of TH-IR neurons observed in our experiments could either represent a change in the neurochemical phenotype (i.e. downregulation of TH) or a loss of dopaminergic neurons. The increase in the total number of neurons per ganglia observed in the MP of MPTP-treated monkeys and the absence of active caspase-3-IR neurons argue against a loss of dopaminergic cells at the time of our experiments. However, one cannot exclude that cell loss of TH-IR neurons occurred earlier in the course of MPTP injection. Further reinforcing this hypothesis is the observation

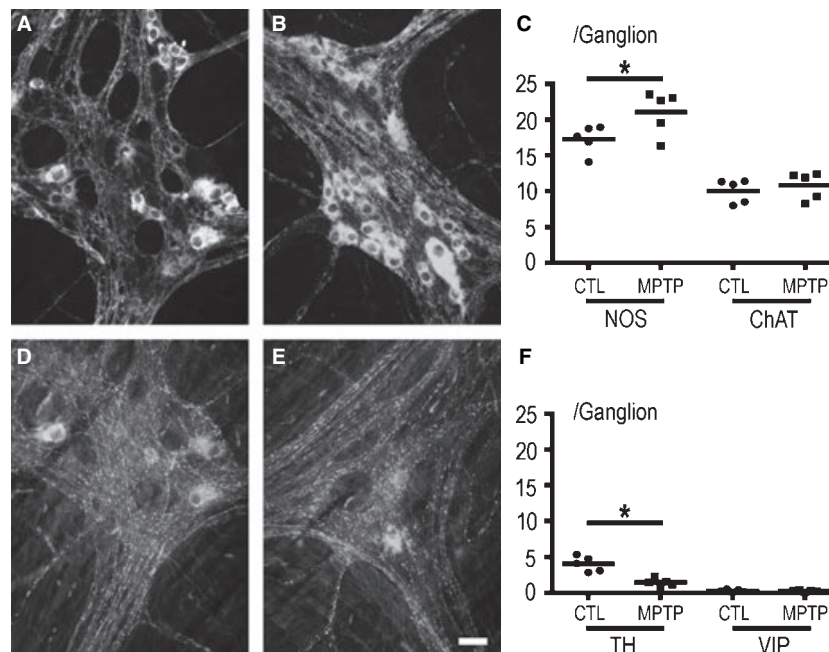


Figure 3 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) changes the neurochemical coding of the myenteric plexus. nNOS-immunoreactive (IR) myenteric neurons were identified in the colon of control (A) and MPTP-treated monkeys (B). MPTP treatment induced a significant increase in the number of nNOS- but not choline acetyl transferase-IR myenteric neurons per ganglion ($n = 5$ controls and 5 MPTP-monkeys; $P = 0.049$) (C). Tyrosine hydroxylase (TH)-IR myenteric neurons were identified in the colon of control (D) and MPTP-treated monkeys (E). MPTP treatment induced a significant decrease in the number of TH- but not VIP-IR myenteric neurons per ganglion ($n = 5$ controls and 5 MPTP-monkeys; $P = 0.008$) (F). Each point represents a value from a monkey injected with vehicle (circle) or with MPTP (square). Horizontal bars represent the mean. Scale bar: 40 μ m.

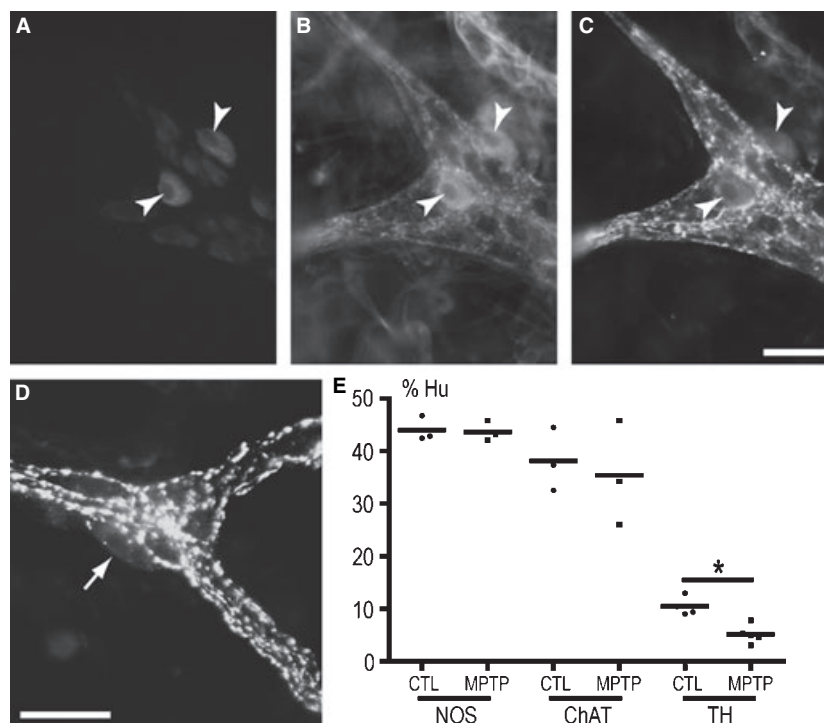


Figure 4 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) reduces the proportion of tyrosine hydroxylase-immunoreactive (TH-IR) submucosal neurons. Triple labelling with antibodies against Hu (A), choline acetyl transferase (ChAT) (B) and nNOS (C) showed that a large proportion of submucosal neurons were ChAT- and nNOS-IR (arrowheads). MPTP treatment induced a significant decrease in the proportion of TH- (arrow) but not of ChAT- and nNOS-IR submucosal neurons ($n = 4$ controls and 5 MPTP-monkeys; $P = 0.003$) (D, E). Each point represents a value from a monkey injected with vehicle (circle) or with MPTP (square). Horizontal bars represent the mean. Scale bar: 40 μ m.

that MPTP can cause a loss in TH without necessarily destroying neurons in murine *substantia nigra*.²⁹ In MPTP-treated mice, Anderson *et al.*²² suggested that the absence of TH-positive cell bodies in the ENS most likely represents a loss of cells rather than a mere downregulation of TH but no assessment of cell death nor cell counting were performed in these mice.

Parallel to the decrease in the number of TH-IR neurons, a significant increase in the number of nNOS-IR neurons was observed in the MP of monkeys treated with MPTP. This contrasts with the results obtained in MPTP-treated mice in which no change in the density of nitrergic neurons was evidenced in the MP.²² These differences between the two studies could result from the fact that a single injection of MPTP was performed in mice while our protocol consisted of multiple injections and longer survival time allowing adaptation. In this context, it is tempting to speculate that the increase in the number of nNOS-IR neurons could represent an adaptive response to the drop in TH as both subsets of neurons exert an inhibitory effect on GI motility.¹⁰

A body of literature supports a critical role for astrocytes in protecting dopaminergic neurons in the CNS.³⁰ Recent experiments have shown *in vivo* that MPTP induced both activation and apoptotic cell death of astrocytes in the *substantia nigra*.³¹ As EGC are likely to represent the ENS counterpart of CNS astrocytes,^{32,33} it was critical to assess whether MPTP was toxic for EGC. Using Sox10 antibodies, a reliable marker for EGC,²⁷ no significant difference was observed in the number or in the phenotype of glial cells in the MP between MPTP-treated and control animals, suggesting that EGC are not a primary target of MPTP in the ENS. However, the ratio of astrocytes to neurons was significantly decreased by MPTP treatment suggesting that, under these conditions, myenteric neurons could be less protected by astrocytes during an insult and making them more sensitive to infectious or oxidative stress.

Our study also suggests that neuropathological processes are more limited to the MP when compared to the SMP. This observation is consistent with earlier descriptions mentioning that Lewy body were only present in the MP and absent or undetectable in the SMP.¹⁸ However, further studies have shown that pathological changes also occur in the SMP, although to a lower extent than in MP.^{17,19,34} In particular, using routine colonic biopsies obtained during the course of colonoscopy, we have identified aggregates of synuclein reminiscent of Lewy neurites in the SMP of PD patients but no change in the number of submucosal neurons, similarly to our observation in the SMP of

MPTP-treated monkeys.³⁵ Although the changes were less pronounced in the SMP, both plexuses were targeted by MPTP in our model, further reinforcing the fact that the two structures are involved during the course of PD and that they should be systematically assessed in studies performed in PD patients and animal models of the disease.^{6,36}

From a functional point of view, the changes of the neurochemical phenotype observed in the MP of PD patients and in animal models of the disease could account for the GI dysfunction, which is frequently encountered by parkinsonian patients.³ Interestingly, increased proportion of NOS-IR neurons and decreased proportion of ChAT-IR neurons have recently been reported in the MP of patients suffering from slow transit constipation, a major GI dysfunction observed in PD patients.²⁵ However, the functional impact of the alterations of the ENS in the monkey could not be determined in this study due to technical constraints.

In summary, MPTP induced pronounced changes in the neurochemical coding in both the MP and the SMP of monkeys. Remarkably, in the MP, these changes were not restricted to dopaminergic neurons but also involved nitrergic enteric neurons. Our results open new insights into the understanding of GI dysmotility in PD and into the pathophysiology of this disease.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from France Parkinson, CECAP Recherche, Groupement de Parkinsoniens de Vendée and Inserm/DHOS (to PDe and MN). PDe and MN are recipients of a Contrat d'Interface Inserm. TL is a recipient of poste d'accueil Inserm.

COMPETING INTERESTS

The authors have no competing interests.

REFERENCES

- 1 Hornykiewicz O. Dopamine (3-hydroxytyramine) in the central nervous system and its relation to the Parkinson syndrome in man. *Dtsch Med Wochenschr* 1962; **87**: 1807–10.
- 2 Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AH. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol* 2006; **5**: 235–45.
- 3 Pfeiffer RF. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2003; **2**: 107–16.
- 4 Sakakibara R, Uchiyama T, Yamanishi T, Shirai K, Hattori T. Bladder and bowel dysfunction in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 2008; **115**: 443–60.

- 5 Kaye J, Gage H, Kimber A, Storey L, Trend P. Excess burden of constipation in Parkinson's disease: a pilot study. *Mov Disord* 2006; **21**: 1270–3.
- 6 Natale G, Pasquali L, Ruggieri S, Paparelli A, Fornai F. Parkinson's disease and the gut: a well known clinical association in need of an effective cure and explanation. *Neurogastroenterol Motil* 2008; **20**: 741–9.
- 7 Cersosimo MG, Benarroch EE. Neural control of the gastrointestinal tract: implications for Parkinson disease. *Mov Disord* 2008; **23**: 1065–75.
- 8 Schemann M, Neunlist M. The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 2004; **16**(Suppl. 1): 55–9.
- 9 Benarroch EE. Enteric nervous system: functional organization and neurologic implications. *Neurology* 2007; **69**: 1953–7.
- 10 Li ZS, Schmauss C, Cuenca A, Ratcliffe E, Gershon MD. Physiological modulation of intestinal motility by enteric dopaminergic neurons and the D2 receptor: analysis of dopamine receptor expression, location, development, and function in wild-type and knock-out mice. *J Neurosci* 2006; **26**: 2798–807.
- 11 Bassotti G, Villanacci V. Slow transit constipation: a functional disorder becomes an enteric neuropathy. *World J Gastroenterol* 2006; **12**: 4609–13.
- 12 Bruley des Varannes S, Chevalier J, Pimont S *et al.* Serum from achalasia patients alters neurochemical coding in the myenteric plexus and nitric oxide mediated motor response in normal human fundus. *Gut* 2006; **55**: 319–26.
- 13 Neunlist M, Aubert P, Toquet C *et al.* Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. *Gut* 2003; **52**: 84–90.
- 14 Savidge TC, Newman P, Pothoulakis C *et al.* Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology* 2007; **132**: 1344–58.
- 15 Wakabayashi K, Takahashi H, Ohama E, Ikuta F. Parkinson's disease: an immunohistochemical study of Lewy body-containing neurons in the enteric nervous system. *Acta Neuropathol* 1990; **79**: 581–3.
- 16 Singaram C, Ashraf W, Gaumnitz EA *et al.* Dopaminergic defect of enteric nervous system in Parkinson's disease patients with chronic constipation. *Lancet* 1995; **346**: 861–4.
- 17 Braak H, de Vos RA, Bohl J, Del Tredici K. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett* 2006; **396**: 67–72.
- 18 Qualman SJ, Haupt HM, Yang P, Hamilton SR. Esophageal Lewy bodies associated with ganglion cell loss in achalasia. Similarity to Parkinson's disease. *Gastroenterology* 1984; **87**: 848–56.
- 19 Wakabayashi K, Takahashi H, Takeda S, Ohama E, Ikuta F. Parkinson's disease: the presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses. *Acta Neuropathol* 1988; **76**: 217–21.
- 20 Smeyne RJ, Jackson-Lewis V. The MPTP model of Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 2005; **134**: 57–66.
- 21 Bezard E, Dovero S, Prunier C *et al.* Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 2001; **21**: 6853–61.
- 22 Anderson G, Noorian AR, Taylor G *et al.* Loss of enteric dopaminergic neurons and associated changes in colon motility in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2007; **207**: 4–12.
- 23 Bezard E, Ferry S, Mach U *et al.* Attenuation of levodopa-induced dyskinesia by normalizing dopamine D3 receptor function. *Nat Med* 2003; **9**: 762–7.
- 24 Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. Functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2006; **130**: 1480–91.
- 25 Wattchow D, Brookes S, Murphy E, Carbone S, de Fontgalland D, Costa M. Regional variation in the neurochemical coding of the myenteric plexus of the human colon and changes in patients with slow transit constipation. *Neurogastroenterol Motil* 2008 [Epub ahead of print].
- 26 Anlauf M, Schafer MK, Eiden L, Weihe E. Chemical coding of the human gastrointestinal nervous system: cholinergic, VIPergic, and catecholaminergic phenotypes. *J Comp Neurol* 2003; **459**: 90–111.
- 27 Hoff S, Zeller F, von Weyhern CW *et al.* Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody. *J Comp Neurol* 2008; **509**: 356–71.
- 28 Li ZS, Pham TD, Tamir H, Chen JJ, Gershon MD. Enteric dopaminergic neurons: definition, developmental lineage, and effects of extrinsic denervation. *J Neurosci* 2004; **24**: 1330–9.
- 29 Jackson-Lewis V, Jakowec M, Burke RE, Przedborski S. Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurodegeneration* 1995; **4**: 257–69.
- 30 Hirsch EC, Hunot S, Damier P *et al.* Glial cell participation in the degeneration of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 1999; **80**: 9–18.
- 31 Serra PA, Sciola L, Delogu MR *et al.* The neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine induces apoptosis in mouse nigrostriatal glia. Relevance to nigral neuronal death and striatal neurochemical changes. *J Biol Chem* 2002; **277**: 34451–61.
- 32 Ferri GL, Probert L, Cocchia D, Michetti F, Marangos PJ, Polak JM. Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system. *Nature* 1982; **297**: 409–10.
- 33 Jessen KR, Mirsky R. Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature* 1980; **286**: 736–7.
- 34 Wakabayashi K, Takahashi H, Takeda S, Ohama E, Ikuta F. Lewy bodies in the enteric nervous system in Parkinson's disease. *Arch Histol Cytol* 1989; **52**: 191–4.
- 35 Lebouvier T, Chaumette T, Damier P *et al.* Pathological lesions in colonic biopsies during Parkinson's disease. *Gut* 2008; in press.
- 36 Braak H, Del Tredici K. Invited article: nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. *Neurology* 2008; **70**: 1916–25.

Article 12 : Alpha-synuclein expression is induced by depolarization and cyclic AMP in enteric neurons

Paillusson S, Tasselli M, Lebouvier T, Mahé M, Chevalier J, Biraud M, Cario-Toumanianz C, Neunlist M, Derkinderen P. *Alpha-synuclein expression is induced by depolarization and cyclic AMP in enteric neurons*. J Neurochem. 2010 Nov;115(3):694-706.

Ces manipulations cellulaires auxquelles j'ai modestement collaboré étudient la régulation de l'expression de l' α -synucléine dans les neurones entériques *in vitro* et *in vivo*. Nous montrons l'induction de l'expression de l' α -synucléine par l'AMP cyclique et la dépolarisation neuronale et le rôle critique d'ERK en aval.

La portée de ce travail signé par Sébastien Paillusson est majeure. L'expression de l' α -synucléine est un facteur de vulnérabilité à la pathologie de Lewy. Déchiffrer les facteurs modulant son expression dans une population cellulaire parmi les premières atteintes par le processus pathologique revêt un intérêt fondamental pour la pathogénie de la MP.

α -Synuclein expression is induced by depolarization and cyclic AMP in enteric neurons

Sébastien Paillusson,^{*,†} Maddalena Tasselli,^{*,†} Thibaud Lebouvier,^{*,†,‡} Maxime Michaël Mahé,^{*,†} Julien Chevalier,^{*} Mandy Biraud,^{*} Chystelle Cario-Toumaniantz,^{†,§} Michel Neunlist^{*,†} and Pascal Derkinderen^{*,†,‡}

^{*}Inserm, U913, Nantes, France

[†]University Nantes, Nantes, France

[‡]CHU Nantes, Department of Neurology, Nantes, France

[§]Inserm, U915, Nantes, France

Abstract

Accumulated evidence emphasizes the importance of α -synuclein expression levels in Parkinson's disease (PD) pathogenesis. PD is a multicentric disorder that affects the enteric nervous system (ENS), whose involvement may herald the degenerative process in the CNS. We therefore undertook the present study to investigate the mechanisms involved in the regulation of expression of α -synuclein in the ENS. The regulation of α -synuclein expression was assessed by qPCR and western blot analysis in rat primary culture of ENS treated with KCl and forskolin. A pharmacological approach was used to decipher the signaling pathways involved. Intraperitoneal injections of Bay K-8644 and forskolin were performed in mice, whose proximal colons were further analyzed for α -synuclein

expression. Depolarization and forskolin increased α -synuclein mRNA and protein expression in primary cultures of ENS, although L-type calcium channel and protein kinase A, respectively. Both stimuli increased α -synuclein expression through a Ras/extracellular signal-regulated kinases pathway. An increase in α -synuclein expression was also observed *in vivo* in the ENS of mice injected with Bay K-8644 or forskolin. In conclusion, we have identified stimuli leading to α -synuclein over-expression in the ENS, which could be critical in the initiation of the pathological process in PD.

Keywords: α -synuclein, cyclic AMP, depolarization, enteric nervous system, extracellular signal-regulated kinases, Parkinson's disease.

J. Neurochem. (2010) **115**, 694–706.

α -Synuclein is a neuronal protein that has been linked both to normal synaptic function and to neurodegeneration. Missense mutations of α -synuclein are responsible for rare autosomal dominant forms of Parkinson's disease (PD) (see Waxman and Giasson 2009 for review) and aggregated α -synuclein has been shown to be the main component of the pathological hallmark of sporadic PD, namely Lewy bodies (Spillantini *et al.* 1997). There is a large body of evidence implicating the expression level of α -synuclein in the pathogenesis of PD. Duplications (Chartier-Harlin *et al.* 2004) and triplications (Singleton *et al.* 2003) of the α -synuclein gene have been identified in familial forms of PD. In animal models, over-expression of α -synuclein reproduces some of the cardinal pathological, neurochemical, and behavioral features of the human disease (Chesseelet 2008). These studies indicate that over-expression of

α -synuclein is sufficient to cause PD, and that its transcriptional regulation may be critically involved in the development of sporadic cases of the disease (Scherzer *et al.* 2008).

The traditional assumption that PD is a primary disorder of the *substantia nigra* has been challenged over the last years. It has indeed become increasingly evident that the

Received April 26, 2010; revised manuscript received August 13, 2010; accepted August 13, 2010.

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

Abbreviations used: DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; ENS, enteric nervous system; ERK, extracellular signal-regulated kinases; PBS, phosphate-buffered saline; PD, Parkinson's disease; PKA, protein kinase A; ROS, reactive oxygen species; TBS, Tris-buffered saline.

pathological process of PD affects several neuronal structures outside the *substantia nigra* (Braak *et al.* 2003), among which is the enteric nervous system (ENS) (Braak *et al.* 2006; Leboviev *et al.* 2008). Remarkably, from analyses of the temporal and spatial patterns of the spread of Lewy aggregates throughout the central and peripheral nervous systems, Braak *et al.* (2006) have determined that the appearance of α -synuclein aggregates occurs in the ENS during the earliest stage of PD, even before the *substantia nigra*. This led Braak to put forth the general proposal that PD pathology may begin in the gastrointestinal tract and that the pathological process further spreads to the CNS via the vagal innervation of the gut (Braak *et al.* 2006). A recent and thorough survey of the expression of α -synuclein in the ENS and in its vagal connections in rats has shown that α -synuclein is expressed in a subset of enteric neurons that are synaptically linked with α -synuclein-positive vagal neurons (Phillips *et al.* 2008). These results, along with the anatomical observations from Braak, offer a mechanism for the development and spread of the Lewy pathology in PD, in which both the ENS and α -synuclein play a crucial role.

Given the importance of the expression levels of α -synuclein for developing PD on one hand and the putative key role of the ENS in the pathophysiology of the disease on the other hand, we undertook the present study to investigate the mechanisms involved in the regulation of expression of α -synuclein in a model of primary culture of ENS (Chevalier *et al.* 2008) and *in vivo*. To this end, we used two distinct stimuli, membrane depolarization and forskolin, because many important physiological and pathological events in the ENS are regulated by neuronal activity and cyclic AMP (Howe *et al.* 2006; Neylon *et al.* 2006; Chevalier *et al.* 2008).

Material and methods

Reagents and antibodies

KCl, forskolin, nifedipine, Bay K-8644 (–) were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). Omega-conotoxin and omega-agatoxin were purchased from Alomone (Jerusalem, Israel). PD98059, U0126 and FTI-277 were purchased from Calbiochem (Meudon, France). CM-H₂DCFDA was purchased from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). The following commercially available antibodies were used for western blotting: mouse monoclonal anti- α -synuclein (1 : 500; BD Bioscience; Le Pont-De-Claix, France) and rabbit polyclonal anti- α -synuclein (1 : 500; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), rabbit polyclonal anti-phospho-extracellular signal-regulated kinases (ERK) (1 : 2000; Cell Signaling; Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France), reacting with active ERK1/2 (doubly phosphorylated on the tyrosine and threonine residues of the activation loop), total anti-ERK1/2 (1 : 1000; Cell Signaling), mouse monoclonal anti-HSP 70 (1 : 1000; Cell Signaling) and mouse monoclonal anti-PGP 9.5 (1 : 1000; Ultracell limited, Isle of Wight, UK). For immunocytochemistry, mouse monoclonal anti- α -synuclein

(1 : 500; BD Bioscience) and rabbit polyclonal anti- α -synuclein (1 : 500; Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal anti- β III tubulin (1 : 500; Sigma), rabbit polyclonal anti-NF200 (1 : 500; Millipore; Molsheim, France), rabbit polyclonal anti-glial fibrillary acidic protein and rabbit polyclonal anti-S100 β (1 : 500; Dako, Trappes, France) were used.

Primary cultures of ENS

Small intestine of rat embryos E15 (35–45 per isolation from three pregnant Sprague–Dawley rats (CERJ, Le Genest St Isle, France) were removed and finely diced in Hank's Buffered Salt Solution (Sigma). Tissue fragments were collected in 5 mL of medium [Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)-F12 (1 : 1) medium] and digested at 37°C for 15 min in 0.1% trypsin (Sigma). The trypsin reaction was stopped by adding 10 mL of medium containing 10% fetal calf serum and then treated by Dnase I 0.01% (Sigma) for 10 min at 37°C. After triturating with a 10 mL pipette, cells were centrifuged at 500 *g* for 10 min. Cells were counted and then seeded at a density of 2.4×10^5 cells/cm² on 24-well plates previously coated for 6 h with a solution of gelatin (0.5%;Sigma) in sterile phosphate-buffered saline (PBS). After 24 h, the medium was replaced with a serum-free medium [DMEM-F12 (1 : 1) containing 1% of N-2 supplement (Life Technologies, Cergy Pontoise, France)]. Cells were maintained in culture for 15 days. Half of the medium was replaced every 2 days (Chevalier *et al.* 2008).

Immunohistochemistry

After the fixation procedure (1 h in 0.1 M PBS containing 4% paraformaldehyde at 25°C), cells seeded on glass slide or tissues were washed in PBS and then permeabilized for 30 min in PBS/NaN₃ containing 1% Triton X-100 and 4% horse serum before being incubated with the primary antibodies diluted in PBS/NaN₃, 4% horse serum, and 1% Triton X-100 for 90 min at 25°C for cells and overnight at 4°C for tissues. When biotinylated α -synuclein antibody was used (mouse monoclonal antibody, BD Biosciences, biotinylated with EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit from Thermo scientific), endogenous peroxidase activity was blocked by incubating preparations with 3% hydrogen peroxide for 20 min. Endogenous biotin was blocked with a commercial streptavidin/biotin blocking kit (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) according to the manufacturer's instruction. Following incubation with primary antisera, cells or tissue were washed three times with PBS and incubated respectively for 30 and 90 min with secondary antibodies coupled to fluorophores: donkey anti-rabbit, anti-goat or anti-mouse IgG conjugated to carboxymethylindocyanine 3 or 5 (CY3 or CY5) (1 : 500; Jackson Laboratories, Immunotech, Marseille, France), donkey anti-rabbit or anti-mouse IgG conjugated to FluoProbes®488 (1 : 500; Interchim, Montluçon, France) or streptavidin coupled to CY3 (Invitrogen). Nuclei were stained with a 4',6'-diamidino-2-phenylindole for 15 min (1 : 500; Sigma). After a final wash, samples were laid flat on a microscope slide and mounted in an aqueous fluorescence mounting medium (Dako). Specimens were viewed under a Zeiss Axiovert 200 mol/L microscope fluorescence microscope associated with the APO-TOME mode (confocal like) (Carl Zeiss S.A.S., Le Pecq, France) and images were analyzed with AXIOVISION 4.8 software (Carl Zeiss) and further treated with the Image J software (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

Western blot

Primary culture of ENS were harvested in NETF buffer (100 mM NaCl, 2 mM EGTA, 50 mM Tris-Cl, pH 7.4, and 50 mM NaF) containing 1% (v/v) Nonidet P-40, 2 mM orthovanadate, phosphatase inhibitor cocktail II (Roche, Neuilly sur Seine, France) and a protease inhibitors cocktail (Roche). Tissues were lysed in NETF buffer with 'Precellys 24' tissue homogenizer (Bertin technologies, St Quentin-en-Yvelines, France). Equal amounts of lysate were separated using the Invitrogen NuPage Novex Bis Tris MiniGels™ before electrophoretic transfer with the iBlot™ Dry Blotting System also from Invitrogen. Membranes were blocked for 1 h at 25°C in Tris-buffered saline (TBS) (100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.5) with 5% non-fat dry milk. Membranes were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies. Bound antibodies were detected with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibodies (Amersham, Les Ulis, France; diluted 1 : 5000) and visualized by enhanced chemiluminescent detection (ECL plus, Amersham). When necessary, membranes were stripped for 10 min in Reblot buffer (Millipore, Molsheim, France) followed by extensive washing in TBS before reblocking for 30 min in TBS with 5% non-fat dry milk and reprobing. The relevant immunoreactive bands were quantified with laser-scanning densitometry and analyzed with NIH Image J software. To allow comparison between different autoradiographic films, the density of the bands was expressed as a percentage of the average of controls (untreated). The value of α -synuclein immunoreactivity was normalized to the amount of PGP 9.5 immunoreactivity in the same sample and expressed as a percentage of controls.

Quantitative PCR analysis

RNA extraction from enteric primary culture was performed with RNeasy Minikit (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. For reverse transcription, 1 μ g of purified total RNA was denatured and subsequently processed for reverse transcription using SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. PCR amplifications were performed using the Absolute Blue SYBR green fluorescein kit (ABGENE, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's protocol and run on MyiQ thermocycler (Bio-Rad, Marnes la coquette, France). The mRNA level of expression was determined using the formula of the comparative cycle threshold: $(C_t): \Delta C_t$, where $\Delta C_t = (C_{t,\alpha\text{-synuclein}} - C_{t,\text{PGP 9.5}})$ sample - $(C_{t,\alpha\text{-synuclein}} - C_{t,\text{PGP 9.5}})$ calibrated as previously described (Livak and Schmittgen 2001).

Primers were generated by the OLIGO 4.0 S software (National Biosciences, Plymouth, MN, USA) based on their T_m (melting temperature) as calculated by the nearest neighbor method (as close as possible to 60°C) with less than 2°C difference between them and all the primer duplexes kept to a minimum (less than four nucleotides) and no G nor C nor GC stretches longer than four nucleotides. Primers were also chosen on separate exons to amplify cDNA but not genomic DNA. Then, the primers were submitted to BLASTn analysis (NCBI) to confirm their specificity. The following primers were used: for α -synuclein, forward: 5'-CACAAGAGG-GAATCCTGGAA-3'; reverse: 5'-TCATGCTGGCCGTGAGG-3'; PGP 9.5, forward: 5'-CCCCGAGATGCTGAACAAGTG-3'; reverse: 5'-CGATCACTGCTGATGGAAGA-3'.

Reactive oxygen species and neuron-specific enolase assays

After pharmacological treatments, primary cultures were loaded with pre-warmed Hank's Buffered Salt Solution containing 5 μ M of CM-H₂DCFDA (Invitrogen) for 15 min at 37°C then followed by a 10 min incubation at 37°C in DMEM medium without phenol red prior to microscopy analysis. For quantification of fluorescence, cells were lysed with 100 μ L of NETF/NP40 lysis buffer and fluorescence was read at 517 nm. Neuron-specific enolase release into culture medium was assessed as described previously (Abdo *et al.* 2010).

In vivo experiments

Male C57BL6N mice (Janvier, France) weighing 21–23 g were housed in cage in temperature-controlled room ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), one week before the experiments. The mice were given access to food and water *ad libitum* and were maintained on 12 h light/dark cycle. Animal care was conducted in accordance with standard ethical guidelines and approved by the local ethic committee. Animals received a daily intraperitoneal (i.p.) injection of Bay K-8644 (2 mg/kg) or forskolin (2 mg/kg) or vehicle (10% ethanol) for 3 days. Animals were killed 24 h after the last i.p. injection and the proximal colons were taken and analyzed by immunoblot and immunohistochemistry.

Statistical analysis

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

Results

α -Synuclein is expressed by neurons in primary culture of rat ENS

Following 14 days of culture, enteric neurons were organized in ganglia connected to each other by interganglionic fiber strands as evidenced by immunostaining using β III tubulin antibody (Fig. 1a) (Chevalier *et al.* 2008). Enteric glial cells, identified by glial fibrillary acidic protein immunostaining, were also present in enteric ganglia and along interganglionic fiber strands (Fig. 1b). α -Synuclein immunostaining revealed that α -synuclein was present in the cytoplasm of the somata as well as in the fibers of enteric neurons (Fig. 1a). In contrast, enteric glial cells did not express α -synuclein (Fig. 1b).

Expression of α -synuclein is increased in enteric neurons following KCl-induced depolarization and forskolin challenge

Membrane depolarization elicited by 40 mM KCl induced a significant increase in the protein level of α -synuclein in primary culture of rat ENS (Fig. 2a). A twofold increase in α -synuclein expression was observed after 24 h of treatment,

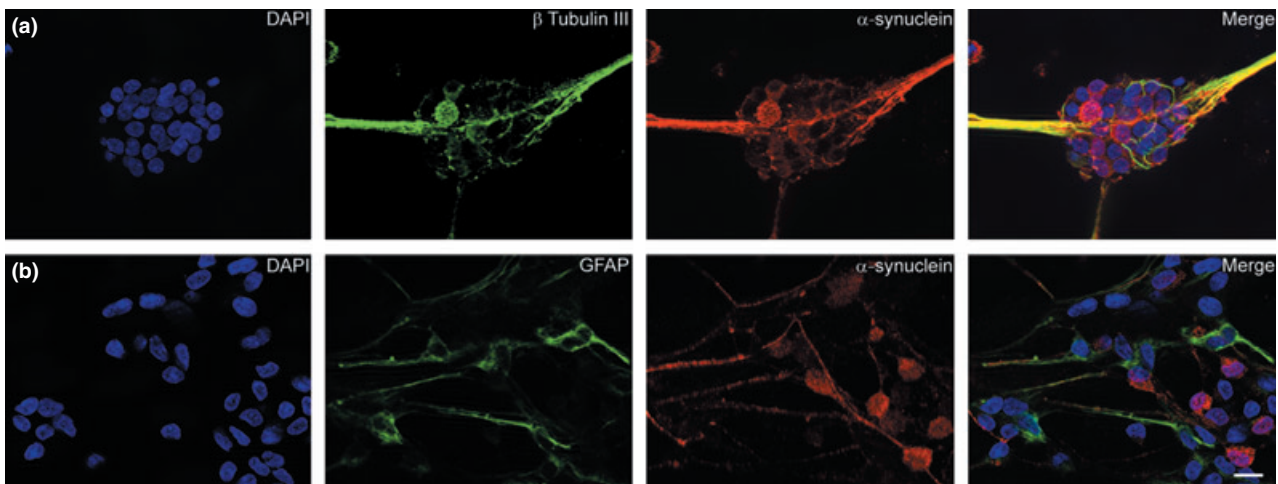


Fig. 1 Expression of α -synuclein in primary culture of ENS. (a) The presence of enteric neurons in primary culture of ENS was assessed by β III tubulin Immunostaining (β tubulin III); nuclei were stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI). (b) The presence of enteric glial cells within primary culture of ENS was assessed by glial fibrillary

acidic protein immunostaining (GFAP); nuclei were stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI). (a, b) Immunostaining with antibodies against α -synuclein demonstrate that α -synuclein colocalized primarily with enteric neurons and not with enteric glial cells (merge). Scale bar represents 20 μ m.

reaching 3.35-fold after 72 h (Fig. 2a and b). To rule out a non-specific osmotic effect of KCl, primary culture of rat ENS were treated with an equimolar concentration of mannitol. Such a treatment did not induce synuclein expression as compared to control either at 24 or 72 h (Fig. 2a and b). Treatment of primary culture of rat ENS with 20 μ M forskolin, which increases intracellular cyclic AMP, induced an almost sixfold significant increase in the expression of α -synuclein after 72 h (Fig. 2a and b). The increase in α -synuclein expression induced by KCl was associated with a significant 1.9-fold increase in the corresponding transcript at 24 h (Fig. 2c). A significant 2.1- and 1.8-fold increase in α -synuclein transcripts was observed following treatment with 20 μ M forskolin at 12 and 24 h respectively (Fig. 2c).

In some instances, treatments with depolarizing agents have been associated with neuronal injury (Ramnath *et al.* 1992). As α -synuclein expression can be increased by cell stress (Gomez-Santos *et al.* 2003), we have performed a set of experiments to determine whether a treatment with KCl or forskolin provoke neuronal oxidative stress and/or neuronal cell death. First, by using the reactive oxygen species (ROS)-specific fluorescent dye, CM-H2DCFDA (Sung *et al.* 2001), we found that the ROS fluorescence was mainly detectable within neurons in treated and untreated primary culture of ENS (Fig. 2d) and that the amount of intracellular ROS was comparable between control and KCl or forskolin-treated cells (Fig. 2e). Second, the expression level of the 70 kDa heat-shock protein (Hsp70), a chaperone protein whose expression is up-regulated in neuronal cells following an oxidative injury (Shyu *et al.* 2004), was assessed in both treated and untreated cells. Treatment with either 40 mM KCl or 20 μ M forskolin did not change the expression level

of Hsp70 protein (Fig. 2e) whereas hydrogen peroxide which was used as positive control, induced a reproducible increase in the expression of Hsp70 as compared with control (Fig. 2f). Third, neuron-specific enolase release into the culture medium was used to estimate neuronal injury after treatments with high-KCl and forskolin. We have recently shown that this technique enables a reliable and specific assessment of neuronal cell death in primary culture of ENS (Abdo *et al.* 2010). The amount of neuron-specific enolase released in the culture medium was comparable between cells treated with 40 mM KCl, 20 μ M forskolin and controls (2.3 ± 0.7 ng/mL for controls, 1.7 ± 0.6 ng/mL for KCl-treated cells and 3.2 ± 0.7 ng/mL for forskolin-treated cells, $n = 8$, $p > 0.05$ vs. control).

Taken together, our results demonstrate that depolarization and forskolin challenge of enteric neurons result in induction of α -synuclein expression at both the transcript and protein levels. The effects of depolarization and forskolin were specific and not a consequence of cell injury.

Induction of expression of α -synuclein by depolarization is mediated through L-type calcium channels

Voltage-operated calcium channels are critical in the regulation of gene expression by depolarization in the CNS (Flavell and Greenberg 2008). These channels have been classified by electrophysiological and pharmacological means into L-, N-, P-, Q-, R- and T-type channels (Catterall 2000). Within the enteric nervous system, L-, N-, P- and Q-type Ca^{2+} channels have been identified (Smith *et al.* 2003). Treatment of primary culture of ENS with nifedipine (1 μ M), a specific antagonist of L-type calcium channels (Catterall 2000), completely prevented the effects of

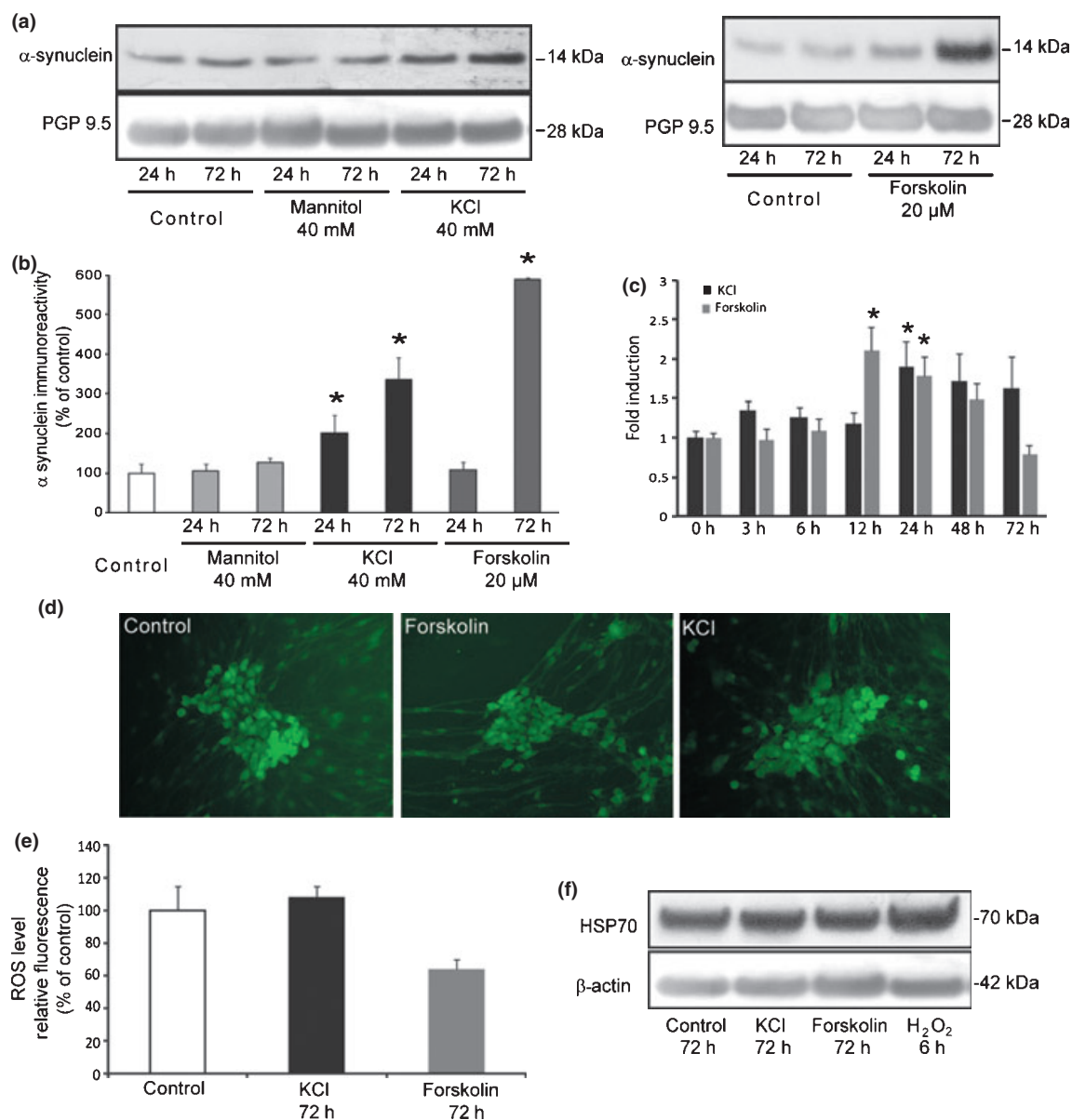


Fig. 2 Effects of KCl-induced membrane depolarization and forskolin on α -synuclein expression in primary culture of ENS. (a) After 14 days in culture, primary culture of ENS were treated with vehicle (control), 40 mM mannitol, 40 mM KCl, and 20 μ M forskolin for 24 or 72 h. Cells were harvested and homogenized in NETF/NP40 (1%) buffer and 35 μ g of protein per sample were subjected to immunoblot analysis using antibodies specific for α -synuclein. After stripping, membranes were reprobbed with anti-PGP 9.5 antibodies to ensure equal loading of neuronal proteins. (b) For quantification, the optical densities of α -synuclein immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of PGP 9.5 immunoreactive bands in the same samples, and expressed as percentages of controls. Data correspond to mean $\pm$ SEM of 6–15 samples per condition. Statistical analysis was performed with ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test (treated vs. control, $*p < 0.01$). (c) Quantitative PCR analysis of α -synuclein mRNA in primary culture of ENS treated with vehicle (control), 40 mM KCl (black bars) or forskolin (gray bars) for 3, 6, 12, 24, 48 and 72 h. Statistical analysis was performed with ANOVA

followed by Dunnett's multiple comparison test (treated vs. control, $*p < 0.01$). Data correspond to mean $\pm$ SEM of 6 samples per condition. (d) After 14 days in culture, primary culture of ENS were treated with vehicle (control), 40 mM KCl, or 20 μ M forskolin for 72 h. Cells were loaded with CM-H₂DCFDA (non-fluorescent) which is oxidized in DCF (fluorescent) by ROS. (e) For quantification, the relative fluorescence of DCF was measured using a microplate reader at 517 nm. Statistical analysis was performed with ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test. Data correspond to mean $\pm$ SEM of 6 samples per condition. (f) After 14 days in culture, primary culture of ENS were treated with vehicle (control), 40 mM KCl, and 20 μ M forskolin for 72 h or with 100 μ M H₂O₂ for 6 h. Cells were harvested and homogenized in NETF/NP40 (1%) buffer and 35 μ g of protein per sample were subjected to immunoblot analysis using antibodies specific for Hsp70. After stripping, membranes were reprobbed with anti- β actin antibodies to ensure equal loading of proteins. The autoradiograms are representative of three independent experiments.

depolarization on α -synuclein induction (Fig. 3a and b). In contrast, pre-treatment with 0.1 μ M of omega-conotoxin and omega-agatoxin, which inhibit specifically N- and P/Q-type calcium channels respectively (Catterall 2000), had no effects on the expression of α -synuclein elicited by depolarization (Fig. 3a and b).

To establish whether a selective L-type calcium channel agonist alone is able to induce α -synuclein expression, we used Bay K-8644, a selective agonist of these channels. Incubation of primary cultures of ENS with 1 μ M of Bay K-8644 for 72 h significantly increased the expression of α -synuclein (Fig. 3c and d).

Collectively, these results demonstrate a critical role for L-type calcium channels in depolarization-induced α -synuclein expression.

Induction of expression of α -synuclein by forskolin is mediated through PKA activation and L-type calcium channels

By increasing the intracellular level of cyclic AMP, forskolin is able to activate protein kinase A (PKA). PKA has been shown to be involved in some of the effects depolarization in neurons (Grewal *et al.* 2000). This logically led us to use a PKA inhibitor, H89 (Chijiwa *et al.* 1990), to study the role of PKA on the effects of both forskolin and depolarization. Pre-treatment of primary culture of ENS with 2 μ M H89 completely prevented the forskolin-induced increase in α -synuclein expression (Fig. 4a) but did not alter the effects of KCl-induced depolarization (Fig. 4b).

Regulation of gene expression by forskolin in neurons is either L-type calcium channels-dependent (Konradi *et al.* 2003) or -independent (Cigola *et al.* 1998). We thus studied the effects of nifedipine on forskolin-induced expression of α -synuclein and showed that this inhibitor of L-type calcium channels completely prevented the effects of forskolin (Fig. 4c).

These results suggest that both PKA activity and L-type calcium channels are required for the induction of expression of α -synuclein by forskolin. In contrast, PKA is not involved in the depolarization-induced α -synuclein expression.

Activation of ERK is required for depolarization and forskolin-induced expression of α -synuclein

Extracellular signal-regulated kinases play a pivotal in the regulation of gene expression in neurons (Grewal *et al.* 1999). ERK phosphorylation and activation can be achieved through several signaling pathways including depolarization and increase in intracellular cyclic AMP (Derkinderen *et al.* 1999). We therefore assessed the role of the ERK pathway in the induction of α -synuclein expression in enteric neurons. We first studied whether KCl-induced depolarization and forskolin were able to activate and thus to phosphorylate ERK in enteric neurons. Treatment of primary culture of ENS with either KCl or forskolin induced a rapid and

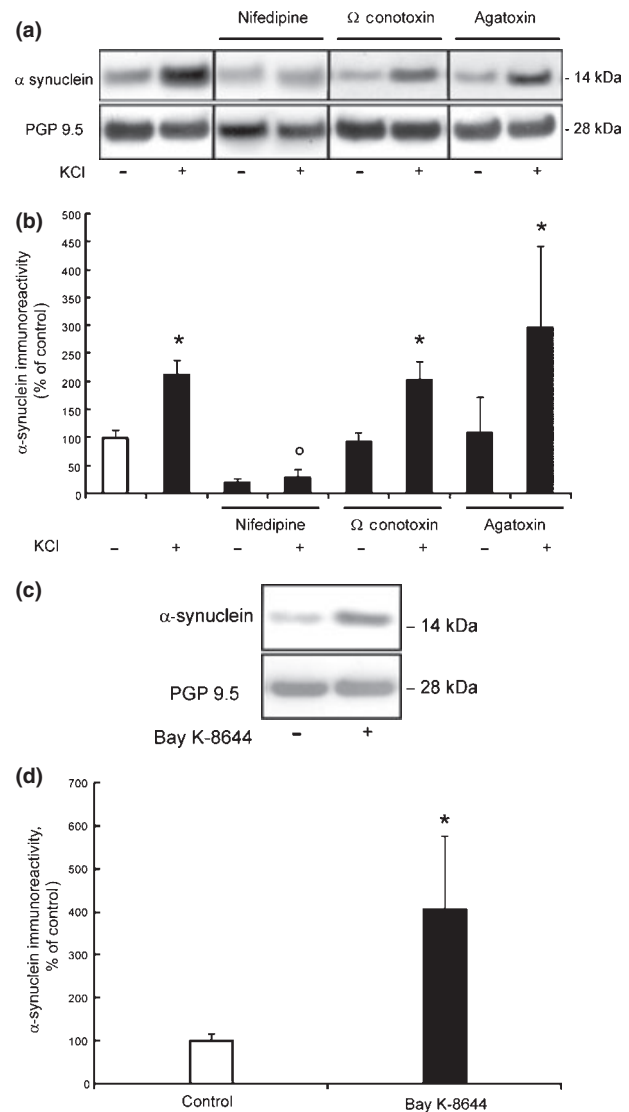


Fig. 3 Pharmacological characterization of the voltage operated calcium channels involved in the effects of depolarization on α -synuclein expression. (a) After 14 days in culture primary culture of ENS were treated with 40 mM KCl for 72 h in the absence or presence of 1 μ M nifedipine, 0.1 μ M omega-conotoxin and 0.1 μ M omega-agatoxin applied 30 min before. Immunoblots were performed as described in the legend to Fig. 2a. (b) Quantification of the results for α -synuclein protein level was assessed as described in the legend to Fig. 2b. Statistical analysis was performed with ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test (treated vs. control: * $p < 0.01$; treated in the presence of 1 μ M nifedipine vs. in its absence: ° $p < 0.01$). Data correspond to mean $\pm$ SEM of 3–9 samples per condition. (c) After 14 days in culture, primary culture of ENS were treated with 1 μ M Bay K-8644 for 72 h. Immunoblots were performed as described in the legend to Fig. 2a. (d) Quantification of the results for α -synuclein protein level was assessed as described in the legend to Fig. 2b. Statistical analysis was performed with ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test (treated vs. control: * $p < 0.01$). Data correspond to mean $\pm$ SEM of 3–15 samples per condition.

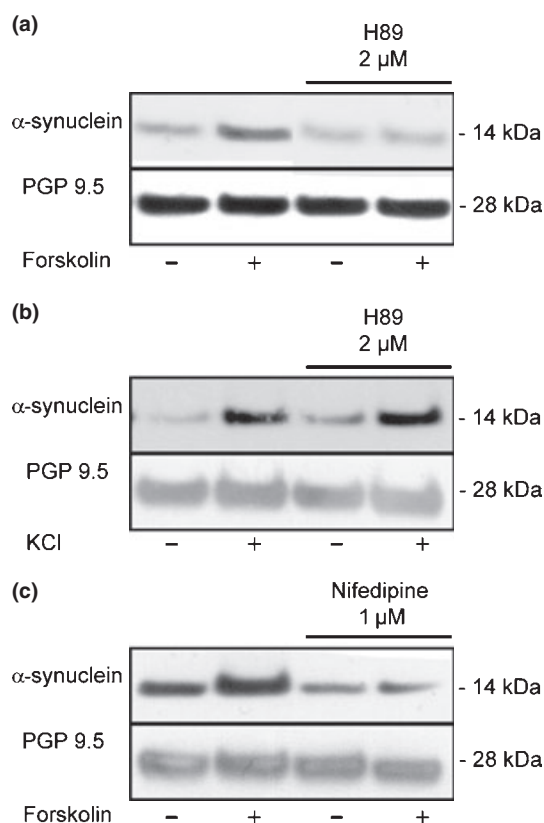


Fig. 4 Role of PKA in the regulation of α -synuclein expression by KCl-induced membrane depolarization and forskolin. (a) After 14 days in culture, primary culture of ENS were treated 40 mM KCl for 72 h in the absence or presence of 2 μ M H89 applied 30 min before. Immunoblots were performed as described in the legend to Fig. 2a. (b) After 14 days in culture, primary culture of ENS were treated with 20 μ M forskolin for 72 h in the absence or presence of 2 μ M H89 applied 30 min before. Immunoblots were performed as described in the legend to Fig. 2a. (c) After 14 days in culture, primary culture of ENS were treated with 20 μ M forskolin for 72 h in the absence or presence of 1 μ M nifedipine applied 30 min before. Immunoblots were performed as described in the legend to Fig. 2a. The autoradiograms are representative of at least 4 independent experiments.

monophasic activation of ERK as assessed by immunoblotting with antibodies specifically reacting with the active phosphorylated form of the kinase (Fig. 5a–d). The activation of ERK by depolarization appeared to be more sustained than the one induced by forskolin (Fig. 5a–d).

As activation of ERK results from the phosphorylation by the dual-specificity mitogen-activated protein kinases/ERK kinases, we have used PD98059 (Alessi *et al.* 1995) and U0126 (Favata *et al.* 1998), two mitogen-activated protein kinases/ERK kinases inhibitors. Pre-treatment of enteric neurons with 10 μ M U0126 completely prevented the effects of both depolarization and forskolin on α -synuclein expression (Fig. 5e–h). Similar results were obtained using 50 μ M PD98059 as a pre-treatment (data not shown).

Ras is required for depolarization and forskolin-induced expression of α -synuclein

Membrane depolarization and cyclic AMP are capable of activating ERK through diverse signaling pathways (Derkinderen *et al.* 1999). The small G protein Ras is a point of convergence for the two stimuli to activate ERK (Obara *et al.* 2007). We thus studied the effects of a Ras inhibitor, the farnesyl transferase inhibitor FTI-277 (Lerner *et al.* 1995), on the expression of α -synuclein in enteric neurons. Pre-treatment with 10 μ M FTI-277 significantly decreased the induction of α -synuclein expression elicited by both forskolin and depolarization (Fig. 6a–d). This suggests that depolarization and forskolin act through a common signaling pathway to activate ERK and in turn to induce α -synuclein expression. In line with this hypothesis, a simultaneous treatment with forskolin and KCl was no more efficient than forskolin and KCl alone to induce α -synuclein (Fig. 6e and f).

Taken as a whole, our results demonstrate a critical role for the Ras/ERK pathway in the regulation of α -synuclein expression by forskolin or depolarization.

Bay K-8644 and forskolin increase α synuclein expression in enteric neurons *in vivo*

We eventually sought to determine whether the effects of depolarization and forskolin on α -synuclein expression could be also observed *in vivo*. We first studied the expression of α -synuclein in the colonic ENS of mice. Whole mount immunofluorescence experiments showed that the expression of α -synuclein in the colonic myenteric plexus of mice was restricted to neurons (Fig. 7a). No α -synuclein staining was observed in enteric glial cells (Fig. 7a). To study the effects of depolarization and forskolin in living mice, we used Bay K-8644 and forskolin, two compounds that have already been shown to be efficient when intraperitoneally administered (Jinnah *et al.* 1999; Melis *et al.* 2002). Using western blot analysis, we have shown that treatment of mice with 2 mg/kg of Bay K-8644 or with 2 mg/kg of forskolin every day for 3 days induced a significant increase in the expression of α -synuclein in the proximal colon as compared with controls (Fig. 7b). Immunofluorescence experiments revealed that the increase in α -synuclein expression induced by Bay K-8644 and forskolin occurred in neurons and mainly in their somata (Fig. 7c).

Discussion

The three main outcomes of the present survey are (i) the induction of α -synuclein expression, a key protein in the pathophysiology of PD, by cyclic AMP and depolarization; (ii) the critical role of ERK in the regulation of α -synuclein expression; (iii) the identification of the enteric neurons as a subset of neurons in which α -synuclein expression can be regulated.

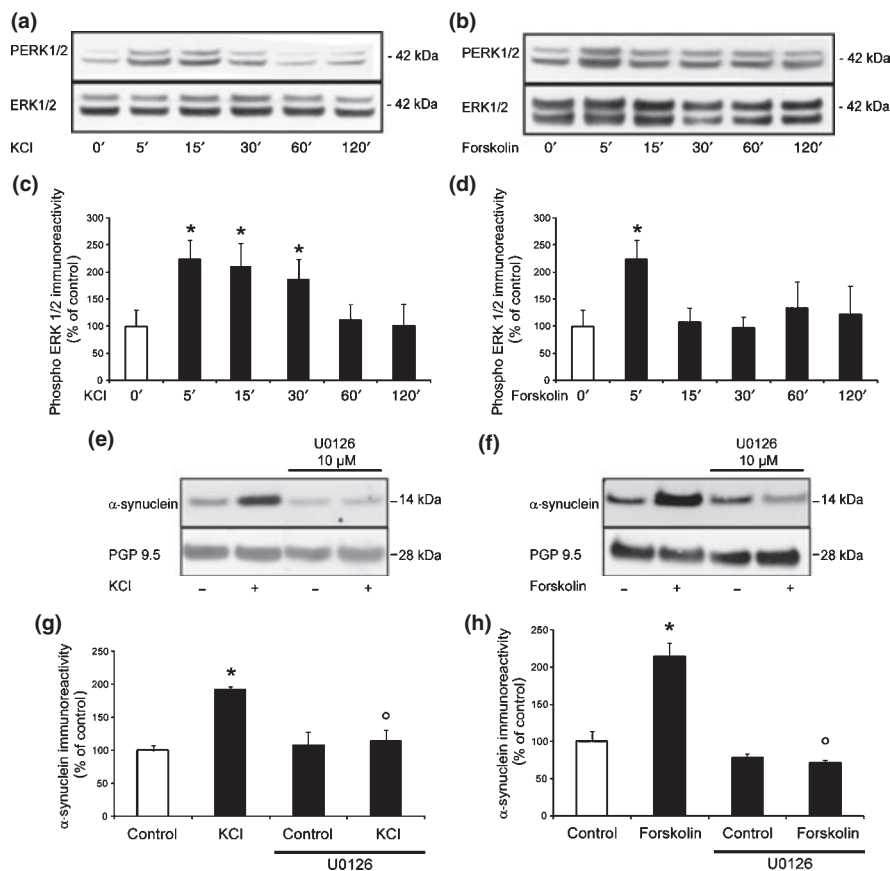


Fig. 5 Role of ERK signaling pathway in the regulation of α -synuclein expression by KCl-induced membrane depolarization and forskolin. (a, b) After 14 days in culture, primary culture of ENS were treated either with 40 mM KCl or with 20 μ M forskolin for 5, 15, 30, 60 or 120 min. Cell lysates were subjected to immunoblot analysis using antibodies specific for the dually phosphorylated (active) forms of ERK1 and ERK2 (P-ERK1/2). After stripping, the membranes were re probed with anti-ERK (ERK1/2) antibodies. Immunoblots were performed as described in the legend to Fig. 2. (c, d) The values of active phospho-ERK1 and 2 were normalized to the amount of total ERK1 and 2 in the same sample and expressed as a percentage of controls. Statistical

analysis was performed with ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test (treated vs. control: * $p < 0.01$) (e, f) After 14 days in culture, primary culture of ENS were treated with either 40 mM KCl or 20 μ M forskolin for 72 h respectively in the absence or presence of 10 μ M U0126 applied 30 min before. Immunoblots were performed as described in the legend to Fig. 2a. (g, h) Quantification of the results for α -synuclein protein level was assessed as described in the legend to Fig. 2b. Statistical analysis was performed with ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test (treated vs. control: * $p < 0.01$; treated in the presence of U0126 vs. in its absence: ° $p < 0.01$). Data correspond to mean $\pm$ SEM of 6–12 samples per condition.

Although the expression of α -synuclein has been suggested to be involved in the pathogenesis of PD, only a few studies to date have addressed the specific issue of the extracellular stimuli capable of modulating α -synuclein expression in neurons. An increase in α -synuclein expression occurs in response to growth factors such as nerve growth factor and basic fibroblast growth factor (Stefanis *et al.* 2001; Clough and Stefanis 2007). This study is the first to show that stimuli linked to neuronal activity, namely intracellular cyclic AMP and membrane depolarization can induce the expression of α -synuclein. Remarkably, a previous report performed in PC12 cells failed to demonstrate any effect of a non-hydrolyzable analogue of cyclic AMP, whereas nerve growth factor induced a robust increase in α -synuclein

expression (Stefanis *et al.* 2001). Two reasons can be put forward to explain such a discrepancy in the effects of cyclic AMP on α -synuclein expression. First, we have used a primary culture model in this study instead of a cell line. Second, the non-hydrolyzable analogue of cyclic AMP was applied for 10 days in PC12 cells instead of the 72 h treatment with forskolin used in the present study. Given the time course of α -synuclein mRNA induction observed in the present study, it is likely that a 10-day treatment with forskolin would have also failed to elicit an increase in α -synuclein expression.

Deciphering the signaling pathways, we have underscored two key elements involved in the effects of membrane depolarization and forskolin on α -synuclein expression. First,

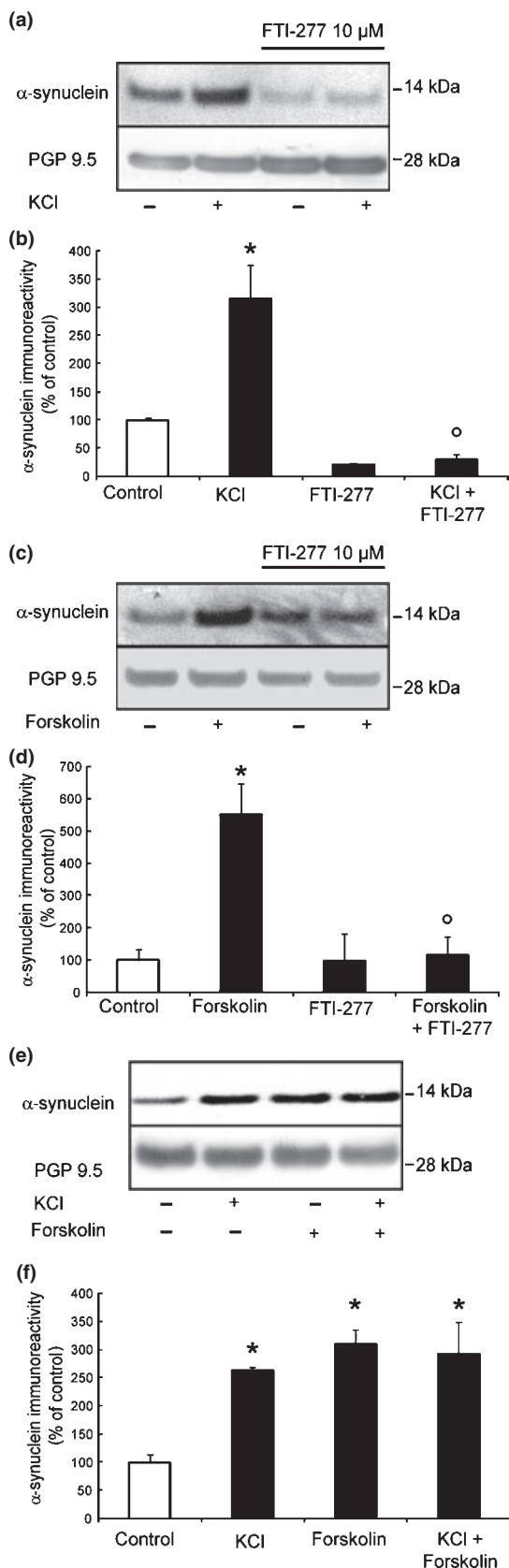


Fig. 6 Role of Ras signaling pathway in the regulation of α -synuclein expression by KCl-induced membrane depolarization and forskolin. (a, c) After 14 days in culture, primary culture of ENS were treated either with 40 mM KCl or 20 μ M forskolin for 72 h in the absence or presence of 10 μ M FTI-277 applied 30 min before. Immunoblots were performed as described in the legend to Fig. 2a. *b* and *d*, quantification of the results for synuclein protein level was assessed as described in the legend to Fig. 2b. Statistical analysis was performed with ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test (treated vs. control: * p < 0.01). (e) After 14 days in culture, primary culture of ENS were treated with either 40 mM KCl or 20 μ M forskolin alone or with both treatment concomitantly for 72 h. Immunoblots were performed as described in the legend to Fig. 2a. (f) Quantification of the results for synuclein protein level was assessed as described in the legend to Fig. 2b. Statistical analysis was performed with ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test (treated vs. control: * p < 0.01). Data correspond to mean $\pm$ SEM of six samples per condition.

we have shown L-type calcium channels were critically involved in the effects of depolarization and forskolin (Fig. 8). This is in accordance with the large body of studies performed in the CNS which have demonstrated that L-type calcium channels are the cornerstone in signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression (Flavell and Greenberg 2008). Recent evidence has emerged that a similar role for these channels also exists in the ENS (Chevalier *et al.* 2008). Remarkably, the involvement of L-type calcium channels in PD has been recently addressed both in experimental Parkinsonism and in an epidemiological survey. A dysregulation of L-type calcium channels occurs in rodents treated with either 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine or rotenone, and treatment with a channel blocker prevents the development of neurodegeneration in these animals (Chan *et al.* 2007). In line with these results obtained in animals, current long-term use of calcium channel blockers for hypertension in humans is associated with a significantly reduced risk of PD (Becker *et al.* 2008). Second, we have demonstrated that the Ras/ERK signaling pathway is necessary for α -synuclein expression following both depolarization and forskolin challenge (Fig. 8). This concurs with the results of Clough and Stefanis (2007), who also showed that Ras and ERK were two critical steps in the induction of α -synuclein by growth factors. From a pathological point of view, patients with PD exhibit cytoplasmic aggregates of activated forms of ERK within their nigral neurons (Zhu *et al.* 2002) and 6-hydroxydopamine elicits a sustained ERK activation that contributes to neuronal cell death *in vitro* (Kulich and Chu 2001), raising the possibility that abnormal patterns of ERK activation may contribute to dopaminergic neuronal cell death. In addition, a recent report has demonstrated that the product of the leucine-rich repeat kinase 2 gene, whose mutations account for frequent

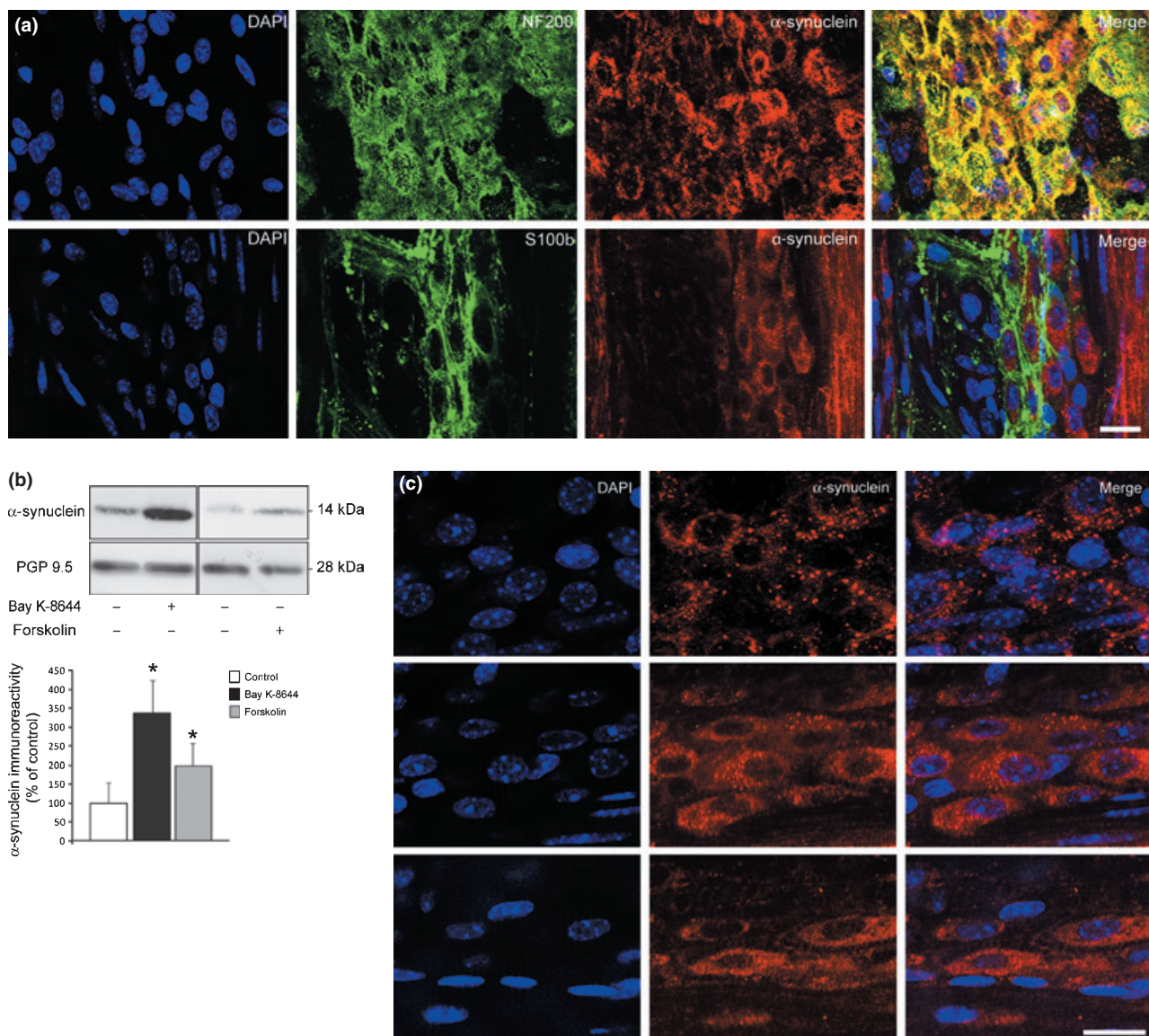


Fig. 7 Bay K-8644 and forskolin increase α synuclein expression in enteric neurons in mice. (a) Double immunohistochemical labeling of myenteric neurons and enteric glial cells from proximal colon of mice. Myenteric neurons were identified with anti-NF200 antibodies and stained with anti-synuclein antibodies. Enteric glial cells were labeled using S100 β antibodies and stained with anti-synuclein antibodies. Nuclei were stained with DAPI. Scale bar represents 20 μ m. (b) Mice were i.p. injected daily with Bay K-8644 (2 mg/kg) during 3 days. Their proximal colon was taken and the amount of α -synuclein was

assessed by immunoblots that were performed and quantified as described in the legend to Fig. 2a and b. Statistical analysis was performed with ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test (treated vs. control: $*p < 0.01$). Data correspond to mean $\pm$ SEM of 5 animals per condition. (c) Mice were i.p. injected daily with forskolin (2 mg/kg) during 3 days. Their proximal colon was taken, dissected and α -synuclein immunostaining was performed on myenteric plexus. Nuclei were stained with DAPI. Data are representative of five different animals per condition. Scale bar represents 20 μ m.

autosomal-dominant PD, induces α -synuclein expression via ERK (Carballo-Carbajal *et al.* 2010). Taken as whole, these results, along with the one obtained in the present study, strongly suggest that a dysregulation of both L-type calcium channels and of the Ras/MAP kinase pathway are present in neurons from PD patients and that such phenomenon are likely to occur not only in central neurons but also in enteric neurons.

Our findings may be relevant to the pathogenesis of PD. We have used in this study our recently developed model of primary culture of ENS, an *in vitro* model that recapitulates the main features of the ENS (Chevalier *et al.* 2008). The results obtained in this model were reinforced by the fact that Bay K-8644 and forskolin also induced a significant increase in synuclein expression *in vivo*. The ENS has received great deal of interest over the last years for its role in the

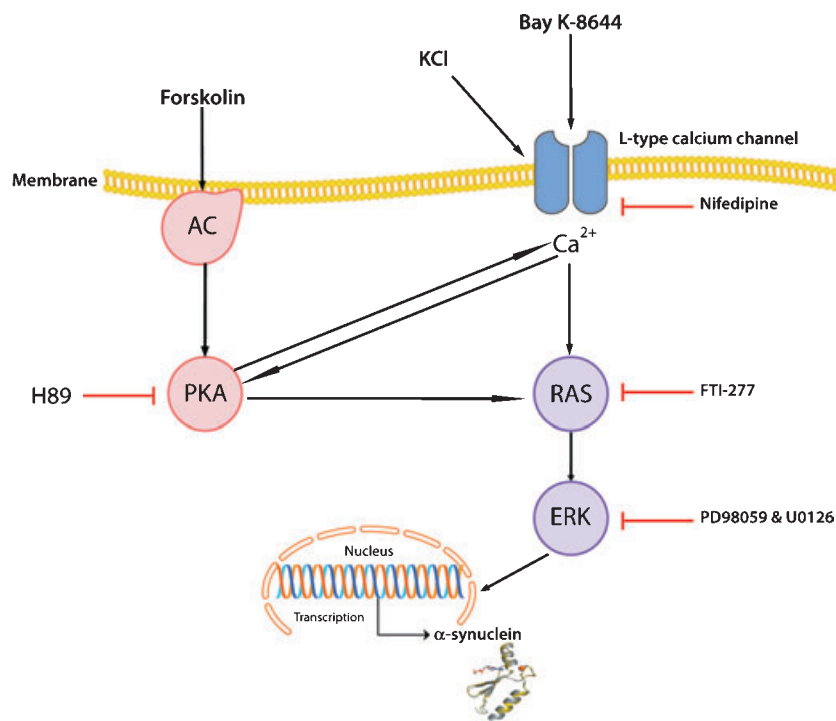


Fig. 8 Signaling pathways involved in the cAMP- and membrane depolarization-induced expression of α -synuclein in enteric neurons. Depolarization induced by KCl increased α -synuclein expression through activation of L-type calcium channels. The effects of forskolin,

an activator of adenylyl cyclase (AC) on synuclein expression are mediated through protein kinase A (PKA) and L-type calcium channels. Both stimuli converge on a Ras/ERK pathway. Black arrows indicate activation. Red lines indicate blockade by inhibitors.

pathophysiology of PD (Lebouvier *et al.* 2009). It has been suggested that the lesions in the ENS occur at a very early stage of the disease, even before the involvement of the CNS (Braak *et al.* 2006). This led to the postulate that the enteric nervous system is likely to be critical in the pathophysiology of PD as it could represent a route of entry for a putative environmental factor to initiate the pathological process (Braak's hypothesis) then spreading to the CNS via vagal connections (Braak *et al.* 2006). In this context, several recent reports strongly support that α -synuclein is pivotal in the spread of the pathological process from the ENS to the CNS. α -Synuclein has been shown to be secreted by neuronal cells *in vitro* and this secreted α -synuclein is prone to aggregate (Lee *et al.* 2005). Aggregates of α -synuclein can be taken up from the extracellular space by neighboring neurons thereby triggering neuronal cell death and the formation of Lewy body-like intracellular inclusions (Desplats *et al.* 2009), supporting the hypothesis that α -synuclein behaves like prion protein. Remarkably, the amount of α -synuclein secreted in the extracellular space is likely to be correlated with the quantity of α -synuclein present in the intracellular space (Lee *et al.* 2005). Altogether, these data suggest that the increase in the intracellular protein level of α -synuclein within enteric neurons may be the first critical step in the development of PD.

Eventually, our results have implications that go beyond PD. An emerging concept in gastroenterology is that a wide range of diseases, such as motility disorders, can be considered in part as enteric neuropathies. In particular, aging is associated with a variety of motility disorders or the gut including delays in gastric emptying and longer intestinal transit time (Camilleri *et al.* 2008). Aged rats display neuronal loss as well as changes in the neurochemical phenotype in the ENS, which are likely to result in motility disorders (Phillips *et al.* 2007). Remarkably, along with neuronal loss, these rats exhibit dystrophic enteric neurons that contains α -synuclein aggregates reminiscent of Lewy pathology (Phillips *et al.* 2009). This suggests that the presence of pathogens or xenobiotics in the gastrointestinal tract can convert normal aging into pathological aging associated not only with PD but also to a larger concept of enteric neuropathies/synucleinopathies.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from France Parkinson. Work in Michel Neunlist's lab is supported by Fondation de France, France Parkinson, CECAP (Comité d'Entente et de Coordination des Associations de Parkinsoniens), ADPLA (Association des Parkinsoniens de Loire Atlantique), FFPG (Fédération française des

groupements parkinsoniens), Parkinsoniens de Vendée, GFNG (groupe français de neurogastroentérologie). TL is a recipient of poste d'accueil Inserm. MN and PDe are both recipients of contrats d'Interface Inserm. The authors are grateful to the Cellular imaging platform PiCell, IFR26, Nantes, France for Apotome pictures. The authors declare no conflicts of interest.

References

- Abdo H., Derkinderen P., Gomes P., Chevalier J., Aubert P., Masson D., Galmiche J. P., Vanden Berghe P., Neunlist M. and Lardeux B. (2010) Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. *FASEB J.* **24**, 1082–1094.
- Alessi D. R., Cuenda A., Cohen P., Dudley D. T. and Saltiel A. R. (1995) PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **270**, 27489–27494.
- Becker C., Jick S. S. and Meier C. R. (2008) Use of antihypertensives and the risk of Parkinson disease. *Neurology* **70**, 1438–1444.
- Braak H., de Vos R. A., Bohl J. and Del Tredici K. (2006) Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci. Lett.* **396**, 67–72.
- Braak H., Del Tredici K., Rub U., de Vos R. A., Jansen Steur E. N. and Braak E. (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* **24**, 197–211.
- Camilleri M., Cowen T. and Koch T. R. (2008) Enteric neurodegeneration in ageing. *Neurogastroenterol. Motil.* **20**, 185–196.
- Carballo-Carbajal I., Weber-Endress S., Rovelli G., Chan D., Wolozin B., Klein C. L., Patenge N., Gasser T. and Kahle P. J. (2010) Leucine-rich repeat kinase 2 induces alpha-synuclein expression via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Cell. Signal.* **22**, 821–827.
- Catterall W. A. (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Cell. Annu. Rev. Biol. Dev.* **16**, 521–555.
- Chan C. S., Guzman J. N., Ilijic E., Mercer J. N., Rick C., Tkatch T., Meredith G. E. and Surmeier D. J. (2007) 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature* **447**, 1081–1086.
- Chartier-Harlin M. C., Kachergus J., Roumier C., Mouroux V., Douay X., Lincoln S., Levecque C., Larvor L., Andrieux J., Hulihan M., Waucquier N., Defebvre L., Amouyel P., Farrer M. and Destee A. (2004) Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* **364**, 1167–1169.
- Chesselet M. F. (2008) *In vivo* alpha-synuclein overexpression in rodents: a useful model of Parkinson's disease? *Exp. Neurol.* **209**, 22–27.
- Chevalier J., Derkinderen P., Gomes P., Thinard 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.
- Chijiwa T., Mishima A., Hagiwara M., Sano M., Hayashi K., Inoue T., Naito K., Toshioka T. and Hidaka H. (1990) Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isouquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.* **265**, 5267–5272.
- Cigola E., Volpe B. T., Lee J. W., Franzen L. and Baker H. (1998) Tyrosine hydroxylase expression in primary cultures of olfactory bulb: role of L-type calcium channels. *J. Neurosci.* **18**, 7638–7649.
- Clough R. L. and Stefanis L. (2007) A novel pathway for transcriptional regulation of alpha-synuclein. *FASEB J.* **21**, 596–607.
- Derkinderen P., Enslen H. and Girault J. A. (1999) The ERK/MAP-kinases cascade in the nervous system. *Neuroreport* **10**, R24–34.
- Desplats P., Lee H. J., Bae E. J., Patrick C., Rockenstein E., Crews L., Spencer B., Masliah E. and Lee S. J. (2009) Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 13010–13015.
- Favata M. F., Horiuchi K. Y., Manos E. J., Daulerio A. J., Stradley D. A., Feese W. S., Van Dyk D. E., Pitts W. J., Earl R. A., Hobbs F., Copeland R. A., Magolda R. L., Scherle P. A. and Trzaskos J. M. (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 18623–18632.
- Flavell S. W. and Greenberg M. E. (2008) Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* **31**, 563–590.
- Gomez-Santos C., Ferrer I., Santidrian A. F., Barrachina M., Gil J. and Ambrosio S. (2003) Dopamine induces autophagic cell death and alpha-synuclein increase in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J. Neurosci. Res.* **73**, 341–350.
- Grewal S. S., York R. D. and Stork P. J. (1999) Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**, 544–553.
- Grewal S. S., Horgan A. M., York R. D., Withers G. S., Banker G. A. and Stork P. J. (2000) Neuronal calcium activates a Rap1 and B-Raf signaling pathway via the cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **275**, 3722–3728.
- Howe D. G., Clarke C. M., Yan H., Willis B. S., Schneider D. A., McKnight G. S. and Kapur R. P. (2006) Inhibition of protein kinase A in murine enteric neurons causes lethal intestinal pseudo-obstruction. *J. Neurobiol.* **66**, 256–272.
- Jinnah H. A., Yitta S., Drew T., Kim B. S., Visser J. E. and Rothstein J. D. (1999) Calcium channel activation and self-biting in mice. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 15228–15232.
- Konradi C., Macias W., Dudman J. T. and Carlson R. R. (2003) Striatal proenkephalin gene induction: coordinated regulation by cyclic AMP and calcium pathways. *Brain Res.* **115**, 157–161.
- Kulich S. M. and Chu C. T. (2001) Sustained extracellular signal-regulated kinase activation by 6-hydroxydopamine: implications for Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **77**, 1058–1066.
- Lebouvier T., Chaumette T., Paillusson S., Duyckaerts C., Bruley des Varannes S., Neunlist M. and Derkinderen P. (2009) The second brain and Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* **30**, 735–741.
- Lebouvier T., Chaumette T., Damier P., Coron E., Touchefeu Y., Vrignaud S., Naveilhan P., Galmiche J. P., Bruley des Varannes S., Derkinderen P. and Neunlist M. (2008) Pathological lesions in colonic biopsies during Parkinson's disease. *Gut* **57**, 1741–1743.
- Lee H. J., Patel S. and Lee S. J. (2005) Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *J. Neurosci.* **25**, 6016–6024.
- Lerner E. C., Qian Y., Blaskovich M. A., Fossum R. D., Vogt A., Sun J., Cox A. D., Der C. J., Hamilton A. D. and Sefti S. M. (1995) Ras CAAX peptidomimetic FTI-277 selectively blocks oncogenic Ras signaling by inducing cytoplasmic accumulation of inactive Ras-Raf complexes. *J. Biol. Chem.* **270**, 26802–26806.
- Livak K. J. and Schmittgen T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta}Delta C(T) Method. *Methods (San Diego, CA)* **25**, 402–408.
- Melis M., Camarini R., Ungless M. A. and Bonci A. (2002) Long-lasting potentiation of GABAergic synapses in dopamine neurons after a single *in vivo* ethanol exposure. *J. Neurosci.* **22**, 2074–2082.
- Neylon C. B., Fowler C. J. and Furness J. B. (2006) Regulation of the slow afterhyperpolarization in enteric neurons by protein kinase A. *Auton. Neurosci.* **126–127**, 258–263.

- Obara Y., Horgan A. M. and Stork P. J. (2007) The requirement of Ras and Rap1 for the activation of ERKs by cAMP, PACAP, and KCl in cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* **101**, 470–482.
- Phillips R. J., Pairitz J. C. and Powley T. L. (2007) Age-related neuronal loss in the submucosal plexus of the colon of Fischer 344 rats. *Neurobiol. Aging* **28**, 1124–1137.
- Phillips R. J., Walter G. C., Wilder S. L., Baronowsky E. A. and Powley T. L. (2008) Alpha-synuclein-immunopositive myenteric neurons and vagal preganglionic terminals: autonomic pathway implicated in Parkinson's disease? *Neuroscience* **153**, 733–750.
- Phillips R. J., Walter G. C., Ringer B. E., Higgs K. M. and Powley T. L. (2009) Alpha-synuclein immunopositive aggregates in the myenteric plexus of the aging Fischer 344 rat. *Exp. Neurol.* **220**, 109–119.
- Ramnath R. R., Strange K. and Rosenberg P. A. (1992) Neuronal injury evoked by depolarizing agents in rat cortical cultures. *Neuroscience* **51**, 931–939.
- Scherzer C. R., Grass J. A., Liao Z., Pepivani I., Zheng B., Eklund A. C., Ney P. A., Ng J., McGoldrick M., Mollenhauer B., Bresnick E. H. and Schlossmacher M. G. (2008) GATA transcription factors directly regulate the Parkinson's disease-linked gene alpha-synuclein. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 10907–10912.
- Shyu W. C., Lin S. Z., Saeki K., Kubosaki A., Matsumoto Y., Onodera T., Chiang M. F., Thajeb P. and Li H. (2004) Hyperbaric oxygen enhances the expression of prion protein and heat shock protein 70 in a mouse neuroblastoma cell line. *Cell. Mol. Neurobiol.* **24**, 257–268.
- Singleton A. B., Farrer M., Johnson J., Singleton A., Hague S., Kachergus J., Hulihan M., Peuralinna T., Dutra A., Nussbaum R., Lincoln S., Crawley A., Hanson M., Maraganore D., Adler C., Cookson M. R., Muentert M., Baptista M., Miller D., Blancato J., Hardy J. and Gwinn-Hardy K. (2003) Alpha-synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* **302**, 841.
- Smith T. K., Kang S. H. and Vanden Berghe P. (2003) Calcium channels in enteric neurons. *Curr. Opin. Pharmacol.* **3**, 588–593.
- Spillantini M. G., Schmidt M. L., Lee V. M., Trojanowski J. Q., Jakes R. and Goedert M. (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* **388**, 839–840.
- Stefanis L., Kholodilov N., Rideout H. J., Burke R. E. and Greene L. A. (2001) Synuclein-1 is selectively up-regulated in response to nerve growth factor treatment in PC12 cells. *J. Neurochem.* **76**, 1165–1176.
- Sung J. Y., Kim J., Paik S. R., Park J. H., Ahn Y. S. and Chung K. C. (2001) Induction of neuronal cell death by Rab5A-dependent endocytosis of alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* **276**, 27441–27448.
- Waxman E. A. and Giasson B. I. (2009) Molecular mechanisms of alpha-synuclein neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta* **1792**, 616–624.
- Zhu J. H., Kulich S. M., Oury T. D. and Chu C. T. (2002) Cytoplasmic aggregates of phosphorylated extracellular signal-regulated protein kinases in Lewy body diseases. *Am. J. Pathol.* **161**, 2087–2098.

Références

1. Nussbaum, R.L. and C.E. Ellis, *Alzheimer's disease and Parkinson's disease*. N Engl J Med, 2003. **348**(14): p. 1356-64.
2. de Lau, L.M. and M.M. Breteler, *Epidemiology of Parkinson's disease*. Lancet Neurol, 2006. **5**(6): p. 525-35.
3. de Rijk, M.C., et al., *Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group*. Neurology, 2000. **54**(11 Suppl 5): p. S21-3.
4. Jankovic, J., *Parkinson's disease: clinical features and diagnosis*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2008. **79**(4): p. 368-76.
5. Dauer, W.T. and S. Przedborski, *Parkinson's Disease : mechanisms and models*. Neuron, 2003. **39**: p. 889-909.
6. Del Tredici, K., et al., *Where does parkinson disease pathology begin in the brain?* J Neuropathol Exp Neurol, 2002. **61**(5): p. 413-26.
7. Fearnley, J.M. and A.J. Lees, *Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity*. Brain, 1991. **114** (Pt 5): p. 2283-301.
8. Koller, W.C., *When does Parkinson's disease begin?* Neurology, 1992. **42**(4 Suppl 4): p. 27-31; discussion 41-8.
9. Hilker, R., et al., *Nonlinear progression of Parkinson disease as determined by serial positron emission tomographic imaging of striatal fluorodopa F 18 activity*. Arch Neurol, 2005. **62**(3): p. 378-82.
10. Chaudhuri, K.R., D.G. Healy, and A.H. Schapira, *Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management*. Lancet Neurol, 2006. **5**(3): p. 235-45.
11. Martinez-Martin, P., et al., *Prevalence of nonmotor symptoms in Parkinson's disease in an international setting; study using nonmotor symptoms questionnaire in 545 patients*. Mov Disord, 2007. **22**(11): p. 1623-9.
12. Hely, M.A., et al., *Sydney Multicenter Study of Parkinson's disease: non-L-dopa-responsive problems dominate at 15 years*. Mov Disord, 2005. **20**(2): p. 190-9.
13. Yoshida, M., *Multiple system atrophy: alpha-synuclein and neuronal degeneration*. Neuropathology, 2007. **27**(5): p. 484-93.
14. Poewe, W. and G. Wenning, *The differential diagnosis of Parkinson's disease*. Eur J Neurol, 2002. **9** Suppl 3: p. 23-30.
15. Langley, J.N., *Some observations on the degeneration in the sympathetic and sacral autonomic nervous system of amphibia following nerve section*. J Physiol, 1911. **42**(2): p. 113-24.
16. Cannon, W.B., *Bodily changes in pain, hunger, fear, and rage; an account of recent researches into the function of emotional excitement* 1915, New York, London,: D. Appleton and Company. xiii, 311 p.
17. Purves, D., *Neuroscience*. 4th ed 2008, Sunderland, Mass.: Sinauer. 1 v. (various pagings).
18. Nestler, E.J., S.E. Hyman, and R.C. Malenka, *Molecular neuropharmacology : a foundation for clinical neuroscience* 2001, New York: McGraw-Hill Medical Pub. Div. xvi, 539.
19. Furness, J.B., *The organisation of the autonomic nervous system: peripheral connections*. Auton Neurosci, 2006. **130**(1-2): p. 1-5.
20. Weihe, E., et al., *Coexpression of cholinergic and noradrenergic phenotypes in human and nonhuman autonomic nervous system*. J Comp Neurol, 2005. **492**(3): p. 370-9.
21. Okuda, T., et al., *Identification and characterization of the high-affinity choline transporter*. Nat Neurosci, 2000. **3**(2): p. 120-5.
22. Harrington, A.M., et al., *Immunoreactivity for high-affinity choline transporter colocalises with VACHT in human enteric nervous system*. Cell Tissue Res, 2010. **341**(1): p. 33-48.
23. Quigley, E.M.M. and R. Pfeiffer, *Neuro-gastroenterology*. 1st ed 2004, Philadelphia, PA: Butterworth-Heinemann. xii, 363 , 4 col. plates.
24. Jost, W.H., *Autonomic dysfunctions in idiopathic Parkinson's disease*. J Neurol, 2003. **250** Suppl 1: p. I28-30.
25. Visser, M., et al., *Assessment of autonomic dysfunction in Parkinson's disease: the SCOPA-AUT*. Mov Disord, 2004. **19**(11): p. 1306-12.
26. Verbaan, D., et al., *Patient-reported autonomic symptoms in Parkinson disease*. Neurology, 2007. **69**(4): p. 333-41.

27. Papapetropoulos, S., A.A. Argyriou, and E. Chroni, *No correlation between the clinical severity of autonomic symptoms (SCOPA-AUT) and electrophysiological test abnormalities in advanced Parkinson's disease*. *Mov Disord*, 2006. **21**(3): p. 430-1.
28. Goldstein, D.S., et al., *Cardiac sympathetic denervation preceding motor signs in Parkinson disease*. *Clin Auton Res*, 2007. **17**(2): p. 118-21.
29. Litvan, I. and Y. Agid, *Atypical Parkinsonian disorders : clinical and research aspects*. Current clinical neurology 2005, Totowa, N.J.: Humana Press. xix, 512.
30. Pfeiffer, R.F., *Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease*. *Lancet Neurol*, 2003. **2**(2): p. 107-16.
31. Edwards, L.L., et al., *Gastrointestinal symptoms in Parkinson's disease*. *Mov Disord*, 1991. **6**(2): p. 151-6.
32. Edwards, L.L., E.M. Quigley, and R.F. Pfeiffer, *Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease: frequency and pathophysiology*. *Neurology*, 1992. **42**(4): p. 726-32.
33. Longstreth, G.F., et al., *Functional bowel disorders*. *Gastroenterology*, 2006. **130**(5): p. 1480-91.
34. Kaye, J., et al., *Excess burden of constipation in Parkinson's disease: a pilot study*. *Mov Disord*, 2006. **21**(8): p. 1270-3.
35. Bassotti, G., et al., *Manometric investigation of anorectal function in early and late stage Parkinson's disease*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2000. **68**(6): p. 768-70.
36. Sakakibara, R., et al., *Colonic transit time and rectoanal videomanometry in Parkinson's disease*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2003. **74**(2): p. 268-72.
37. Ueki, A. and M. Otsuka, *Life style risks of Parkinson's disease: association between decreased water intake and constipation*. *J Neurol*, 2004. **251 Suppl 7**: p. vii18-23.
38. Edwards, L.L., et al., *Characterization of swallowing and defecation in Parkinson's disease*. *Am J Gastroenterol*, 1994. **89**(1): p. 15-25.
39. Abbott, R.D., et al., *Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson's disease*. *Neurology*, 2001. **57**(3): p. 456-62.
40. Hilz, M.J. and M. Dutsch, *Quantitative studies of autonomic function*. *Muscle Nerve*, 2006. **33**(1): p. 6-20.
41. Goldstein, D.S., *Dysautonomia in Parkinson's disease: neurocardiological abnormalities*. *Lancet Neurol*, 2003. **2**(11): p. 669-76.
42. Orimo, S., et al., *(123)I-metaiodobenzylguanidine myocardial scintigraphy in Parkinson's disease*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1999. **67**(2): p. 189-94.
43. Sharabi, Y., et al., *Neurotransmitter specificity of sympathetic denervation in Parkinson's disease*. *Neurology*, 2003. **60**(6): p. 1036-9.
44. Senard, J.M., et al., *Effects of yohimbine on plasma catecholamine levels in orthostatic hypotension related to Parkinson disease or multiple system atrophy*. *Clin Neuropharmacol*, 1993. **16**(1): p. 70-6.
45. Orimo, S., et al., *Sympathetic cardiac denervation in Parkinson's disease and pure autonomic failure but not in multiple system atrophy*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2002. **73**(6): p. 776-7.
46. Orimo, S., et al., *[123I] meta-iodobenzylguanidine myocardial scintigraphy differentiates corticobasal degeneration from Parkinson's disease*. *Intern Med*, 2003. **42**(1): p. 127-8.
47. Orimo, S., et al., *Preserved cardiac sympathetic nerve accounts for normal cardiac uptake of MIBG in PARK2*. *Mov Disord*, 2005. **20**(10): p. 1350-3.
48. Riley, D.E. and T.C. Chelimsky, *Autonomic nervous system testing may not distinguish multiple system atrophy from Parkinson's disease*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2003. **74**(1): p. 56-60.
49. Oka, H., et al., *Characteristics of orthostatic hypotension in Parkinson's disease*. *Brain*, 2007. **130**(Pt 9): p. 2425-32.
50. Armour, J.A., *Potential clinical relevance of the 'little brain' on the mammalian heart*. *Exp Physiol*, 2008. **93**(2): p. 165-76.
51. Araki, I., et al., *Voiding dysfunction and Parkinson's disease: urodynamic abnormalities and urinary symptoms*. *The Journal of urology*, 2000. **164**(5): p. 1640-3.
52. Lemack, G.E., et al., *Questionnaire-based assessment of bladder dysfunction in patients with mild to moderate Parkinson's disease*. *Urology*, 2000. **56**(2): p. 250-4.
53. Sakakibara, R., et al., *Questionnaire-based assessment of pelvic organ dysfunction in Parkinson's disease*. *Autonomic neuroscience : basic & clinical*, 2001. **92**(1-2): p. 76-85.
54. Sakakibara, R., et al., *Genitourinary dysfunction in Parkinson's disease*. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 2010. **25**(1): p. 2-12.
55. Andersson, K.E., *Mechanisms of Disease: central nervous system involvement in overactive bladder syndrome*. *Nature clinical practice. Urology*, 2004. **1**(2): p. 103-8.
56. Sakakibara, R., et al., *Videourodynamic and sphincter motor unit potential analyses in Parkinson's disease and multiple system atrophy*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2001. **71**(5): p. 600-6.
57. Ali, G.N., et al., *Mechanisms of oral-pharyngeal dysphagia in patients with Parkinson's disease*. *Gastroenterology*, 1996. **110**(2): p. 383-92.

58. Born, L.J., et al., *Cricopharyngeal dysfunction in Parkinson's disease: role in dysphagia and response to myotomy*. *Mov Disord*, 1996. **11**(1): p. 53-8.
59. Stocchi, F., et al., *Anorectal function in multiple system atrophy and Parkinson's disease*. *Mov Disord*, 2000. **15**(1): p. 71-6.
60. Walker, J.K., et al., *Mice lacking the dopamine transporter display altered regulation of distal colonic motility*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000. **279**(2): p. G311-8.
61. Bassotti, G., et al., *Esophageal manometric abnormalities in Parkinson's disease*. *Dysphagia*, 1998. **13**(1): p. 28-31.
62. Castell, J.A., et al., *Manometric abnormalities of the oesophagus in patients with Parkinson's disease*. *Neurogastroenterol Motil*, 2001. **13**(4): p. 361-4.
63. Johnston, B.T., et al., *Repetitive proximal esophageal contractions: a new manometric finding and a possible further link between Parkinson's disease and achalasia*. *Dysphagia*, 2001. **16**(3): p. 186-9.
64. Francis, D.L. and D.A. Katzka, *Achalasia: update on the disease and its treatment*. *Gastroenterology*, 2010. **139**(2): p. 369-74.
65. Hermanowicz, N., *Fatal gastroparesis in a patient with Parkinson's disease*. *Mov Disord*, 2008. **23**(1): p. 152-3.
66. Soykan, I., et al., *Demography, clinical characteristics, psychological and abuse profiles, treatment, and long-term follow-up of patients with gastroparesis*. *Dig Dis Sci*, 1998. **43**(11): p. 2398-404.
67. Chang, F.Y., *Electrogastrography: basic knowledge, recording, processing and its clinical applications*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2005. **20**(4): p. 502-16.
68. Parkman, H.P., W.L. Hasler, and R.S. Fisher, *American Gastroenterological Association medical position statement: diagnosis and treatment of gastroparesis*. *Gastroenterology*, 2004. **127**(5): p. 1589-91.
69. Soykan, I., et al., *Gastric myoelectrical activity in patients with Parkinson's disease: evidence of a primary gastric abnormality*. *Dig Dis Sci*, 1999. **44**(5): p. 927-31.
70. Marinella, M.A., *Acute colonic pseudo-obstruction complicated by cecal perforation in a patient with Parkinson's disease*. *South Med J*, 1997. **90**(10): p. 1023-6.
71. Rosenthal, M.J. and C.E. Marshall, *Sigmoid volvulus in association with parkinsonism. Report of four cases*. *J Am Geriatr Soc*, 1987. **35**(7): p. 683-4.
72. Ashraf, W., et al., *Constipation in Parkinson's disease: objective assessment and response to psyllium*. *Mov Disord*, 1997. **12**(6): p. 946-51.
73. Wedel, T., et al., *Enteric nerves and interstitial cells of Cajal are altered in patients with slow-transit constipation and megacolon*. *Gastroenterology*, 2002. **123**(5): p. 1459-67.
74. Palace, J., V.A. Chandiramani, and C.J. Fowler, *Value of sphincter electromyography in the diagnosis of multiple system atrophy*. *Muscle Nerve*, 1997. **20**(11): p. 1396-403.
75. Ahlskog, J.E., *Beating a dead horse: dopamine and Parkinson disease*. *Neurology*, 2007. **69**(17): p. 1701-11.
76. Lang, A.E. and J.A. Obeso, *Time to move beyond nigrostriatal dopamine deficiency in Parkinson's disease*. *Ann Neurol*, 2004. **55**(6): p. 761-5.
77. Liao, L., et al., *Proteomic characterization of postmortem amyloid plaques isolated by laser capture microdissection*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(35): p. 37061-8.
78. Shults, C.W., *Lewy bodies*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(6): p. 1661-8.
79. Ross, C.A. and M.A. Poirier, *Protein aggregation and neurodegenerative disease*. *Nat Med*, 2004. **10** Suppl: p. S10-7.
80. Brion, J.P., et al., *Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study*. *J Submicrosc Cytol*, 1985. **17**(1): p. 89-96.
81. Spillantini, M.G., et al., *Alpha-synuclein in Lewy bodies*. *Nature*, 1997. **388**(6645): p. 839-40.
82. Neumann, M., et al., *Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis*. *Science*, 2006. **314**(5796): p. 130-3.
83. Maroteaux, L., J.T. Campanelli, and R.H. Scheller, *Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal*. *J Neurosci*, 1988. **8**(8): p. 2804-15.
84. Larsen, K.E., et al., *Alpha-synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis*. *J Neurosci*, 2006. **26**(46): p. 11915-22.
85. Chua, C.E. and B.L. Tang, *alpha-synuclein and Parkinson's disease: the first roadblock*. *J Cell Mol Med*, 2006. **10**(4): p. 837-46.
86. Uversky, V.N., *Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation*. *J Neurochem*, 2007. **103**(1): p. 17-37.
87. Polymeropoulos, M.H., et al., *Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease*. *Science*, 1997. **276**(5321): p. 2045-7.
88. Singleton, A.B., et al., *alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease*. *Science*, 2003. **302**(5646): p. 841.

89. Chen, L. and M.B. Feany, *Alpha-synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a Drosophila model of Parkinson disease*. Nat Neurosci, 2005. **8**(5): p. 657-63.
90. Fujiwara, H., et al., *alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(2): p. 160-4.
91. Anderson, J.P., et al., *Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease*. J Biol Chem, 2006. **281**(40): p. 29739-52.
92. Double, K.L., et al., *The comparative biology of neuromelanin and lipofuscin in the human brain*. Cell Mol Life Sci, 2008.
93. Gomez-Tortosa, E., et al., *alpha-Synuclein immunoreactivity in dementia with Lewy bodies: morphological staging and comparison with ubiquitin immunostaining*. Acta Neuropathol, 2000. **99**(4): p. 352-7.
94. Jellinger, K.A., *Lewy body-related alpha-synucleinopathy in the aged human brain*. J Neural Transm, 2004. **111**(10-11): p. 1219-35.
95. Dickson, D., *Neurodegeneration : the molecular pathology of dementia and movement disorders*. Pathology & genetics.2003, Basel, Switz.: International Society of Neuropathology. 414.
96. Dubois, C., et al., *Short-term risk stratification at admission based on simple clinical data in acute myocardial infarction*. Am J Cardiol, 1988. **61**(4): p. 216-9.
97. Braak, H., et al., *Extensive axonal Lewy neurites in Parkinson's disease: a novel pathological feature revealed by alpha-synuclein immunocytochemistry*. Neurosci Lett, 1999. **265**(1): p. 67-9.
98. Marui, W., et al., *Progression and staging of Lewy pathology in brains from patients with dementia with Lewy bodies*. J Neurol Sci, 2002. **195**(2): p. 153-9.
99. Irizarry, M.C., et al., *Characterization of the precursor protein of the non-A beta component of senile plaques (NACP) in the human central nervous system*. Journal of neuropathology and experimental neurology, 1996. **55**(8): p. 889-95.
100. Ma, S.Y., et al., *A quantitative morphometrical study of neuron degeneration in the substantia nigra in Parkinson's disease*. J Neurol Sci, 1996. **140**(1-2): p. 40-5.
101. Zarow, C., et al., *Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases*. Arch Neurol, 2003. **60**(3): p. 337-41.
102. Damier, P., et al., *The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease*. Brain, 1999. **122** (Pt 8): p. 1437-48.
103. Damier, P., et al., *The substantia nigra of the human brain. I. Nigrosomes and the nigral matrix, a compartmental organization based on calbindin D(28K) immunohistochemistry*. Brain, 1999. **122** (Pt 8): p. 1421-36.
104. Hirsch, E.C., et al., *The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **991**: p. 214-28.
105. Block, M.L., L. Zecca, and J.S. Hong, *Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(1): p. 57-69.
106. Hishikawa, N., et al., *Widespread occurrence of argyrophilic glial inclusions in Parkinson's disease*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2001. **27**(5): p. 362-72.
107. Hughes, A.J., et al., *The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service*. Brain, 2002. **125**(Pt 4): p. 861-70.
108. Braak, H., et al., *Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease*. Neurobiol Aging, 2003. **24**(2): p. 197-211.
109. Kalaitzakis, M.E., et al., *Controversies over the staging of alpha-synuclein pathology in Parkinson's disease*. Acta Neuropathol, 2008. **116**(1): p. 125-8; author reply 129-31.
110. Parkkinen, L., T. Pirttila, and I. Alafuzoff, *Applicability of current staging/categorization of alpha-synuclein pathology and their clinical relevance*. Acta Neuropathologica, 2008. **115**(4): p. 399-407.
111. Braak, H. and E. Braak, *Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes*. Acta Neuropathol, 1991. **82**(4): p. 239-59.
112. Braak, H., et al., *Stanley Fahn Lecture 2005: The staging procedure for the inclusion body pathology associated with sporadic Parkinson's disease reconsidered*. Mov Disord, 2006. **21**(12): p. 2042-51.
113. Alafuzoff, I., et al., *Staging/typing of Lewy body related α -synuclein pathology: a study of the BrainNet Europe Consortium*. Acta Neuropathologica, 2009. **117**(6): p. 635-652.
114. Kalaitzakis, M.E., et al., *Evidence against a reliable staging system of alpha-synuclein pathology in Parkinson's disease*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2009. **35**(1): p. 125-6.
115. Jellinger, K.A., *A critical evaluation of current staging of alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders*. Biochimica et biophysica acta, 2009. **1792**(7): p. 730-40.
116. Kalaitzakis, M.E., et al., *The dorsal motor nucleus of the vagus is not an obligatory trigger site of Parkinson's disease: a critical analysis of alpha-synuclein staging*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2008. **34**(3): p. 284-95.
117. Attems, J. and K.A. Jellinger, *The dorsal motor nucleus of the vagus is not an obligatory trigger site of Parkinson's disease*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2008.

118. Zaccai, J., et al., *Patterns and stages of alpha-synucleinopathy: Relevance in a population-based cohort*. Neurology, 2008. **70**(13): p. 1042-8.
119. Zaccai, J., et al., *Patterns and stages of alpha-synucleinopathy*. Neurology, 2008. **70**(13): p. 1042-1048.
120. Dickson, D.W., et al., *Evidence in favor of Braak staging of Parkinson's disease*. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society, 2010. **25 Suppl 1**: p. S78-82.
121. Przuntek, H., T. Muller, and P. Riederer, *Diagnostic staging of Parkinson's disease: conceptual aspects*. J Neural Transm, 2004. **111**(2): p. 201-16.
122. Tissingh, G., et al., *Loss of olfaction in de novo and treated Parkinson's disease: possible implications for early diagnosis*. Mov Disord, 2001. **16**(1): p. 41-6.
123. Ponsen, M.M., et al., *Idiopathic hyposmia as a preclinical sign of Parkinson's disease*. Ann Neurol, 2004. **56**(2): p. 173-81.
124. Lu, J., et al., *A putative flip-flop switch for control of REM sleep*. Nature, 2006. **441**(7093): p. 589-94.
125. Iranzo, A., et al., *Rapid-eye-movement sleep behaviour disorder as an early marker for a neurodegenerative disorder: a descriptive study*. Lancet Neurol, 2006. **5**(7): p. 572-7.
126. Postuma, R.B., et al., *Quantifying the risk of neurodegenerative disease in idiopathic REM sleep behavior disorder*. Neurology, 2009. **72**(15): p. 1296-300.
127. Fantini, M.L., et al., *Olfactory deficit in idiopathic rapid eye movements sleep behavior disorder*. Brain Res Bull, 2006. **70**(4-6): p. 386-90.
128. Ferini-Strambi, L., et al., *Cardiac autonomic activity during wakefulness and sleep in REM sleep behavior disorder*. Sleep, 1996. **19**(5): p. 367-9.
129. Shiba, M., et al., *Anxiety disorders and depressive disorders preceding Parkinson's disease: a case-control study*. Mov Disord, 2000. **15**(4): p. 669-77.
130. Remy, P., et al., *Depression in Parkinson's disease: loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system*. Brain, 2005. **128**(Pt 6): p. 1314-22.
131. Wakabayashi, K. and H. Takahashi, *Neuropathology of autonomic nervous system in Parkinson's disease*. Eur Neurol, 1997. **38 Suppl 2**: p. 2-7.
132. Klos, K.J., et al., *Alpha-synuclein pathology in the spinal cords of neurologically asymptomatic aged individuals*. Neurology, 2006. **66**(7): p. 1100-2.
133. Bloch, A., et al., *Alpha-synuclein pathology of the spinal and peripheral autonomic nervous system in neurologically unimpaired elderly subjects*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2006. **32**(3): p. 284-95.
134. Braak, H., et al., *Parkinson's disease: lesions in dorsal horn layer I, involvement of parasympathetic and sympathetic pre- and postganglionic neurons*. Acta Neuropathol, 2007. **113**(4): p. 421-9.
135. Braak, H., et al., *Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology*. Neurosci Lett, 2006. **396**(1): p. 67-72.
136. Probst, A., A. Bloch, and M. Tolnay, *New insights into the pathology of Parkinson's disease: does the peripheral autonomic system become central?* Eur J Neurol, 2008. **15 Suppl 1**: p. 1-4.
137. Fumimura, Y., et al., *Analysis of the adrenal gland is useful for evaluating pathology of the peripheral autonomic nervous system in lewy body disease*. Journal of neuropathology and experimental neurology, 2007. **66**(5): p. 354-62.
138. Dabby, R., et al., *Skin biopsy for assessment of autonomic denervation in Parkinson's disease*. J Neural Transm, 2006. **113**(9): p. 1169-76.
139. Rossi, A., et al., *Skin biopsy: a new diagnostic tool for autonomic dysfunctions in Parkinson's disease?* Lancet Neurol, 2007. **6**(10): p. 848-9; author reply 849.
140. Ikemura, M., et al., *Lewy body pathology involves cutaneous nerves*. Journal of neuropathology and experimental neurology, 2008. **67**(10): p. 945-53.
141. Beach, T.G., et al., *Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders*. Acta Neuropathol, 2010.
142. Qualman, S.J., et al., *Esophageal Lewy bodies associated with ganglion cell loss in achalasia. Similarity to Parkinson's disease*. Gastroenterology, 1984. **87**(4): p. 848-56.
143. Goldblum, J.R., et al., *Achalasia. A morphologic study of 42 resected specimens*. Am J Surg Pathol, 1994. **18**(4): p. 327-37.
144. Kupsky, W.J., et al., *Parkinson's disease and megacolon: concentric hyaline inclusions (Lewy bodies) in enteric ganglion cells*. Neurology, 1987. **37**(7): p. 1253-5.
145. Wakabayashi, K., *[Parkinson's disease: the distribution of Lewy bodies in the peripheral autonomic nervous system]*. No To Shinkei, 1989. **41**(10): p. 965-71.
146. Wakabayashi, K., et al., *Lewy bodies in the visceral autonomic nervous system in Parkinson's disease*. Adv Neurol, 1993. **60**: p. 609-12.
147. Wakabayashi, K., et al., *Parkinson's disease: the presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses*. Acta Neuropathol, 1988. **76**(3): p. 217-221.
148. Wakabayashi, K., et al., *Lewy bodies in the enteric nervous system in Parkinson's disease*. Arch Histol Cytol, 1989. **52 Suppl**: p. 191-4.

149. Wakabayashi, K., et al., *Parkinson's disease: an immunohistochemical study of Lewy body-containing neurons in the enteric nervous system*. Acta Neuropathol, 1990. **79**(6): p. 581-3.
150. Singaram, C., et al., *Dopaminergic defect of enteric nervous system in Parkinson's disease patients with chronic constipation*. Lancet, 1995. **346**(8979): p. 861-4.
151. Anlauf, M., et al., *Chemical coding of the human gastrointestinal nervous system: cholinergic, VIPergic, and catecholaminergic phenotypes*. J Comp Neurol, 2003. **459**(1): p. 90-111.
152. Devoto, P., et al., *Evidence for co-release of noradrenaline and dopamine from noradrenergic neurons in the cerebral cortex*. Mol Psychiatry, 2001. **6**(6): p. 657-64.
153. Orimo, S., et al., *Degeneration of cardiac sympathetic nerve begins in the early disease process of Parkinson's disease*. Brain Pathol, 2007. **17**(1): p. 24-30.
154. Orimo, S., et al., *Axonal alpha-synuclein aggregates herald centripetal degeneration of cardiac sympathetic nerve in Parkinson's disease*. Brain, 2008. **131**(Pt 3): p. 642-50.
155. Fujishiro, H., et al., *Cardiac sympathetic denervation correlates with clinical and pathologic stages of Parkinson's disease*. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society, 2008. **23**(8): p. 1085-92.
156. Minguez-Castellanos, A., et al., *Do alpha-synuclein aggregates in autonomic plexuses predate Lewy body disorders?: a cohort study*. Neurology, 2007. **68**(23): p. 2012-8.
157. Sangrairang, S., et al., *Estramustine resistance correlates with tau over-expression in human prostatic carcinoma cells*. Int J Cancer, 1998. **77**(4): p. 626-31.
158. Bennett, D.A., et al., *Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies*. Neurology, 2006. **66**(12): p. 1837-44.
159. Uchiyama, M., et al., *Incidental Lewy body disease in a patient with REM sleep behavior disorder*. Neurology, 1995. **45**(4): p. 709-12.
160. Boeve, B.F., et al., *Insights into REM sleep behavior disorder pathophysiology in brainstem-predominant Lewy body disease*. Sleep medicine, 2007. **8**(1): p. 60-4.
161. Claassen, D.O., et al., *REM sleep behavior disorder preceding other aspects of synucleinopathies by up to half a century*. Neurology, 2010. **75**(6): p. 494-9.
162. Burnstock, G., et al., *Inhibition of the Smooth Muscle on the Taenia Coli*. Nature, 1963. **200**: p. 581-2.
163. Goyal, R.K. and I. Hirano, *The enteric nervous system*. N Engl J Med, 1996. **334**(17): p. 1106-15.
164. Heanue, T.A. and V. Pachnis, *Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(6): p. 466-79.
165. Costa, M., S.J. Brookes, and G.W. Hennig, *Anatomy and physiology of the enteric nervous system*. Gut, 2000. **47 Suppl 4**: p. iv15-9; discussion iv26.
166. Schemann, M. and M. Neunlist, *The human enteric nervous system*. Neurogastroenterol Motil, 2004. **16 Suppl 1**: p. 55-9.
167. Hansen, M.B., *The enteric nervous system I: organisation and classification*. Pharmacol Toxicol, 2003. **92**(3): p. 105-13.
168. De Fontgalland, D., et al., *Immunohistochemical characterization of the innervation of human colonic mesenteric and submucosal blood vessels*. Neurogastroenterol Motil, 2008. **20**(11): p. 1212-26.
169. Hansen, M.B., *Neurohumoral control of gastrointestinal motility*. Physiol Res, 2003. **52**(1): p. 1-30.
170. Galligan, J.J., *Pharmacology of synaptic transmission in the enteric nervous system*. Curr Opin Pharmacol, 2002. **2**(6): p. 623-9.
171. Neal, K.B. and J.C. Bornstein, *Serotonergic receptors in therapeutic approaches to gastrointestinal disorders*. Current Opinion in Pharmacology, 2006. **6**(6): p. 547-52.
172. Izzo, A.A. and K.A. Sharkey, *Cannabinoids and the gut: new developments and emerging concepts*. Pharmacology & therapeutics, 2010. **126**(1): p. 21-38.
173. Gershon, M.D., *Nerves, reflexes, and the enteric nervous system: pathogenesis of the irritable bowel syndrome*. J Clin Gastroenterol, 2005. **39**(4 Suppl 3): p. S184-93.
174. Furness, J.B., *Novel gut afferents: Intrinsic afferent neurons and intestinofugal neurons*. Auton Neurosci, 2006. **125**(1-2): p. 81-5.
175. Furness, J.B., *Types of neurons in the enteric nervous system*. J Auton Nerv Syst, 2000. **81**(1-3): p. 87-96.
176. Noorian, A.R., et al., *Neurochemical phenotypes of myenteric neurons in the rhesus monkey*. The Journal of Comparative Neurology, 2011. **519**(17): p. 3387-401.
177. Knowles, C.H., et al., *Quantitation of cellular components of the enteric nervous system in the normal human gastrointestinal tract--report on behalf of the Gastro 2009 International Working Group*. Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society, 2011. **23**(2): p. 115-24.
178. Phillips, R.J., et al., *Quantification of neurons in the myenteric plexus: an evaluation of putative pan-neuronal markers*. J Neurosci Methods, 2004. **133**(1-2): p. 99-107.
179. Ganns, D., et al., *Investigation of general and cytoskeletal markers to estimate numbers and proportions of neurons in the human intestine*. Histol Histopathol, 2006. **21**(1): p. 41-51.

180. Holst, M.C. and T.L. Powley, *Cuprolinic blue (quinolinic phthalocyanine) counterstaining of enteric neurons for peroxidase immunocytochemistry*. Journal of Neuroscience Methods, 1995. **62**(1-2): p. 121-7.
181. Knowles, C.H., et al., *The London Classification of gastrointestinal neuromuscular pathology: report on behalf of the Gastro 2009 International Working Group*. Gut, 2010. **59**(7): p. 882-7.
182. Karaosmanoglu, T., et al., *Regional differences in the number of neurons in the myenteric plexus of the guinea pig small intestine and colon: an evaluation of markers used to count neurons*. The Anatomical record, 1996. **244**(4): p. 470-80.
183. Bar-Shai, A., et al., *Decreased density of ganglia and neurons in the myenteric plexus of familial dysautonomia patients*. J Neurol Sci, 2004. **220**(1-2): p. 89-94.
184. Neunlist, M., *Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis*. Gut, 2003. **52**(1): p. 84-90.
185. Schneider, J., et al., *Neurotransmitter coding of enteric neurones in the submucous plexus is changed in non-inflamed rectum of patients with Crohn's disease*. Neurogastroenterol Motil, 2001. **13**(3): p. 255-64.
186. Murphy, E.M., et al., *Quantification of subclasses of human colonic myenteric neurons by immunoreactivity to Hu, choline acetyltransferase and nitric oxide synthase*. Neurogastroenterol Motil, 2007. **19**(2): p. 126-34.
187. Beck, M., et al., *ChAT and NOS in human myenteric neurons: co-existence and co-absence*. Cell Tissue Res, 2009. **338**(1): p. 37-51.
188. Pimont, S., et al., *Neurochemical coding of myenteric neurones in the human gastric fundus*. Neurogastroenterol Motil, 2003. **15**(6): p. 655-62.
189. Li, Z.S., et al., *Enteric dopaminergic neurons: definition, developmental lineage, and effects of extrinsic denervation*. J Neurosci, 2004. **24**(6): p. 1330-9.
190. Li, Z.S., et al., *Physiological modulation of intestinal motility by enteric dopaminergic neurons and the D2 receptor: analysis of dopamine receptor expression, location, development, and function in wild-type and knock-out mice*. J Neurosci, 2006. **26**(10): p. 2798-807.
191. Zhang, Y., et al., *Neurotransmission in lower esophageal sphincter of W/Wv mutant mice*. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, 2010. **298**(1): p. G14-24.
192. Ruhl, A., *Glial cells in the gut*. Neurogastroenterol Motil, 2005. **17**(6): p. 777-90.
193. Savidge, T.C., M.V. Sofroniew, and M. Neunlist, *Starring roles for astroglia in barrier pathologies of gut and brain*. Lab Invest, 2007. **87**(8): p. 731-6.
194. Bayliss, W.M. and E.H. Starling, *The movements and innervation of the small intestine*. J Physiol, 1899. **24**(2): p. 99-143.
195. Langley, J.N. and R. Magnus, *Some observations of the movements of the intestine before and after degenerative section of the mesenteric nerves*. J Physiol, 1905. **33**(1): p. 34-51.
196. Furness, J.B., et al., *Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine*. Prog Neurobiol, 2004. **72**(2): p. 143-64.
197. Hansen, M.B., *The enteric nervous system II: gastrointestinal functions*. Pharmacol Toxicol, 2003. **92**(6): p. 249-57.
198. Costa, M., H. Glise, and R. Sjodahl, *The enteric nervous system in health and disease*. Gut, 2000. **47 Suppl 4**: p. IV1.
199. Grundy, D., et al., *Fundamentals of neurogastroenterology: basic science*. Gastroenterology, 2006. **130**(5): p. 1391-411.
200. De Giorgio, R. and M. Camilleri, *Human enteric neuropathies: morphology and molecular pathology*. Neurogastroenterol Motil, 2004. **16**(5): p. 515-31.
201. Pohl, D. and R. Tutuian, *Achalasia: an overview of diagnosis and treatment*. J Gastrointest Liver Dis, 2007. **16**(3): p. 297-303.
202. Farrokhi, F. and M.F. Vaezi, *Idiopathic (primary) achalasia*. Orphanet J Rare Dis, 2007. **2**: p. 38.
203. Gomes, O.A., R.R. de Souza, and E.A. Liberti, *A preliminary investigation of the effects of aging on the nerve cell number in the myenteric ganglia of the human colon*. Gerontology, 1997. **43**(4): p. 210-7.
204. Wade, P.R. and T. Cowen, *Neurodegeneration: a key factor in the ageing gut*. Neurogastroenterol Motil, 2004. **16 Suppl 1**: p. 19-23.
205. Phillips, R.J., E.J. Kieffer, and T.L. Powley, *Loss of glia and neurons in the myenteric plexus of the aged Fischer 344 rat*. Anat Embryol (Berl), 2004. **209**(1): p. 19-30.
206. Phillips, R.J., J.C. Pairitz, and T.L. Powley, *Age-related neuronal loss in the submucosal plexus of the colon of Fischer 344 rats*. Neurobiol Aging, 2006.
207. Phillips, R.J. and T.L. Powley, *Innervation of the gastrointestinal tract: patterns of aging*. Auton Neurosci, 2007. **136**(1-2): p. 1-19.
208. De Giorgio, R., et al., *Inflammatory neuropathies of the enteric nervous system*. Gastroenterology, 2004. **126**(7): p. 1872-83.

209. Neunlist, M., et al., *Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis*. Gut, 2003. **52**(1): p. 84-90.
210. Dafnis, G., et al., *Complications of diagnostic and therapeutic colonoscopy within a defined population in Sweden*. Gastrointest Endosc, 2001. **54**(3): p. 302-9.
211. Lebouvier, T., et al., *Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients*. Neurogastroenterol Motil, 2009.
212. Ferrante, M., et al., *The value of myenteric plexitis to predict early postoperative Crohn's disease recurrence*. Gastroenterology, 2006. **130**(6): p. 1595-606.
213. Tornblom, H., et al., *Full-thickness biopsy of the jejunum reveals inflammation and enteric neuropathy in irritable bowel syndrome*. Gastroenterology, 2002. **123**(6): p. 1972-9.
214. Iantorno, G., et al., *The enteric nervous system in chagasic and idiopathic megacolon*. Am J Surg Pathol, 2007. **31**(3): p. 460-8.
215. Rajan, E., et al., *Endoscopic "no hole" full-thickness biopsy of the stomach to detect myenteric ganglia*. Gastrointest Endosc, 2008.
216. Neunlist, M., et al., *Colonic endoscopic full-thickness biopsies: from the neuropathological analysis of the myenteric plexus to the functional study of neuromuscular transmission*. Gastrointestinal endoscopy, 2011. **73**(5): p. 1029-34.
217. Metzger, M., et al., *Enteric nervous system stem cells derived from human gut mucosa for the treatment of aganglionic gut disorders*. Gastroenterology, 2009. **136**(7): p. 2214-25 e1-3.
218. Buhner, S., et al., *Activation of human enteric neurons by supernatants of colonic biopsy specimens from patients with irritable bowel syndrome*. Gastroenterology, 2009. **137**(4): p. 1425-34.
219. Friedlander, R.M., *Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases*. N Engl J Med, 2003. **348**(14): p. 1365-75.
220. Stadelmann, C., et al., *Activation of caspase-3 in single neurons and autophagic granules of granulovacuolar degeneration in Alzheimer's disease. Evidence for apoptotic cell death*. Am J Pathol, 1999. **155**(5): p. 1459-66.
221. Meijering, E., et al., *Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images*. Cytometry A, 2004. **58**(2): p. 167-76.
222. Huisman, E., H.B. Uylings, and P.V. Hoogland, *A 100% increase of dopaminergic cells in the olfactory bulb may explain hyposmia in Parkinson's disease*. Mov Disord, 2004. **19**(6): p. 687-92.
223. Phillips, R.J., et al., *Alpha-synuclein-immunopositive myenteric neurons and vagal preganglionic terminals: Autonomic pathway implicated in Parkinson's disease?* Neuroscience, 2008.
224. Nishie, M., et al., *Accumulation of phosphorylated alpha-synuclein in the brain and peripheral ganglia of patients with multiple system atrophy*. Acta Neuropathol, 2004. **107**(4): p. 292-8.
225. Ikemura, M., et al., *Lewy body pathology involves cutaneous nerves*. J Neuropathol Exp Neurol, 2008. **67**(10): p. 945-53.
226. Christensen, J., et al., *Comparative anatomy of the myenteric plexus of the distal colon in eight mammals*. Gastroenterology, 1984. **86**: p. 706-713.
227. Hopkins, D.A., et al., *Vagal efferent projections: viscerotopy, neurochemistry and effects of vagotomy*. Prog Brain Res, 1996. **107**: p. 79-96.
228. Derkinderen, P., et al., *Dual role of Fyn in the regulation of FAK+6,7 by cannabinoids in hippocampus*. J Biol Chem, 2001. **276**(41): p. 38289-96.
229. Diederich, N.J., et al., *Parkinson disease with old-age onset: a comparative study with subjects with middle-age onset*. Arch Neurol, 2003. **60**(4): p. 529-33.
230. Allcock, L.M., R.A. Kenny, and D.J. Burn, *Clinical phenotype of subjects with Parkinson's disease and orthostatic hypotension: autonomic symptom and demographic comparison*. Mov Disord, 2006. **21**(11): p. 1851-5.
231. Kim, J.S., et al., *Cardiac sympathetic denervation is correlated with Parkinsonian midline motor symptoms*. J Neurol Sci, 2008. **270**(1-2): p. 122-6.
232. van Rooden, S.M., et al., *Patterns of motor and non-motor features in Parkinson's disease*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2009. **80**(8): p. 846-50.
233. Alves, G., et al., *Changes in motor subtype and risk for incident dementia in Parkinson's disease*. Mov Disord, 2006. **21**(8): p. 1123-30.
234. *Guidelines--Rome III Diagnostic Criteria for Functional Gastrointestinal Disorders*. J Gastrointest Liver Dis, 2006. **15**(3): p. 307-12.
235. Braak, H., et al., *Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages)*. J Neurol, 2002. **249** Suppl 3: p. III/1-5.
236. Doty, R.L., et al., *University of Pennsylvania Smell Identification Test: a rapid quantitative olfactory function test for the clinic*. Laryngoscope, 1984. **94**(2 Pt 1): p. 176-8.
237. Doty, R.L., D.A. Deems, and S. Stellar, *Olfactory dysfunction in parkinsonism: a general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration*. Neurology, 1988. **38**(8): p. 1237-44.

238. Muller, A., et al., *Olfactory function in idiopathic Parkinson's disease (IPD): results from cross-sectional studies in IPD patients and long-term follow-up of de-novo IPD patients*. J Neural Transm, 2002. **109**(5-6): p. 805-11.
239. Boesveldt, S., et al., *A comparative study of odor identification and odor discrimination deficits in Parkinson's disease*. Mov Disord, 2008. **23**(14): p. 1984-90.
240. Doty, R.L., et al., *Bilateral olfactory dysfunction in early stage treated and untreated idiopathic Parkinson's disease*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1992. **55**(2): p. 138-42.
241. Ward, C.D., W.A. Hess, and D.B. Calne, *Olfactory impairment in Parkinson's disease*. Neurology, 1983. **33**(7): p. 943-6.
242. Doty, R.L., *Olfaction in Parkinson's disease*. Parkinsonism Relat Disord, 2007. **13 Suppl 3**: p. S225-8.
243. Jellinger, K.A., *Formation and development of Lewy pathology: a critical update*. J Neurol, 2009. **256 Suppl 3**: p. 270-9.
244. Camilleri, M., T. Cowen, and T.R. Koch, *Enteric neurodegeneration in ageing*. Neurogastroenterol Motil, 2008. **20**(4): p. 418-29.
245. Phillips, R.J., J.C. Pairitz, and T.L. Powley, *Age-related neuronal loss in the submucosal plexus of the colon of Fischer 344 rats*. Neurobiol Aging, 2007. **28**(7): p. 1124-37.
246. Phillips, R.J., B.S. Rhodes, and T.L. Powley, *Effects of age on sympathetic innervation of the myenteric plexus and gastrointestinal smooth muscle of Fischer 344 rats*. Anat Embryol (Berl), 2006. **211**(6): p. 673-83.
247. *Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework*. Clin Pharmacol Ther, 2001. **69**(3): p. 89-95.
248. Van Everbroeck, B., J. Boons, and P. Cras, *Cerebrospinal fluid biomarkers in Creutzfeldt-Jakob disease*. Clin Neurol Neurosurg, 2005. **107**(5): p. 355-60.
249. Dubois, B., et al., *Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria*. Lancet Neurol, 2007. **6**(8): p. 734-46.
250. Blennow, K. and H. Hampel, *CSF markers for incipient Alzheimer's disease*. Lancet Neurol, 2003. **2**(10): p. 605-13.
251. Dubois, B., et al., *Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon*. Lancet Neurol, 2010. **9**(11): p. 1118-27.
252. Kieslich, M., et al., *Brain white-matter lesions in celiac disease: a prospective study of 75 diet-treated patients*. Pediatrics, 2001. **108**(2): p. E21.
253. Thobois, S., F. Delamarre-Damier, and P. Derkinderen, *Treatment of motor dysfunction in Parkinson's disease: an overview*. Clin Neurol Neurosurg, 2005. **107**(4): p. 269-81.
254. Olanow, C.W., et al., *A double-blind, delayed-start trial of rasagiline in Parkinson's disease*. N Engl J Med, 2009. **361**(13): p. 1268-78.
255. Schapira, A.H. and C.W. Olanow, *Neuroprotection in Parkinson disease: mysteries, myths, and misconceptions*. Jama, 2004. **291**(3): p. 358-64.
256. Berg, D. and G. Becker, *Perspectives of B-mode transcranial ultrasound*. Neuroimage, 2002. **15**(3): p. 463-73.
257. Martin, W.R., M. Wieler, and M. Gee, *Midbrain iron content in early Parkinson disease: a potential biomarker of disease status*. Neurology, 2008. **70**(16 Pt 2): p. 1411-7.
258. Hong, Z., et al., *DJ-1 and alpha-synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease*. Brain, 2010. **133**(Pt 3): p. 713-26.
259. Mollenhauer, B., et al., *alpha-Synuclein and tau concentrations in cerebrospinal fluid of patients presenting with parkinsonism: a cohort study*. Lancet Neurol, 2011. **10**(3): p. 230-40.
260. El-Agnaf, O.M., et al., *Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease*. Faseb J, 2006. **20**(3): p. 419-25.
261. Marek, K., et al., *Biomarkers for Parkinson's [corrected] disease: tools to assess Parkinson's disease onset and progression*. Ann Neurol, 2008. **64 Suppl 2**: p. S111-21.
262. Witt, M., et al., *Biopsies of olfactory epithelium in patients with Parkinson's disease*. Mov Disord, 2009. **24**(6): p. 906-14.
263. Parkkinen, L., et al., *Can olfactory bulb biopsy be justified for the diagnosis of Parkinson's disease? Comments on "olfactory bulb alpha-synucleinopathy has high specificity and sensitivity for Lewy body disorders"*. Acta Neuropathol, 2009. **117**(2): p. 213-4; author reply 217-8.
264. Miki, Y., et al., *Clinical availability of skin biopsy in the diagnosis of Parkinson's disease*. Neurosci Lett, 2010. **469**(3): p. 357-9.
265. Del Tredici, K., et al., *Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and sporadic Parkinson's disease*. Acta Neuropathol, 2010. **119**(6): p. 703-13.
266. Caporali, R., et al., *Safety and usefulness of minor salivary gland biopsy: retrospective analysis of 502 procedures performed at a single center*. Arthritis Rheum, 2008. **59**(5): p. 714-20.

267. Cersosimo, M.G., et al. *Alpha-Synuclein Immunoreactivity In Minor Salivary Glands: A Potential Pathological Biomarker For Parkinson's Disease?* in *14th International Congress On Parkinson's Disease And Movement Disorders*. 2010. Buenos Aires, Argentina.
268. Hakim, S. and R.D. Adams, *The special clinical problem of symptomatic hydrocephalus with normal cerebrospinal fluid pressure. Observations on cerebrospinal fluid hydrodynamics*. J Neurol Sci, 1965. **2**(4): p. 307-27.
269. Uchikado, H., et al., *Lewy bodies in progressive supranuclear palsy represent an independent disease process*. Journal of neuropathology and experimental neurology, 2006. **65**(4): p. 387-95.
270. Pini-Prato, A., et al., *Rectal suction biopsy in the workup of childhood chronic constipation: indications and diagnostic value*. Pediatric surgery international, 2007. **23**(2): p. 117-22.
271. Leung, F.W., *Double-EMR-derived full-thickness biopsy and functional GI disorders*. Gastrointestinal endoscopy, 2008. **67**(2): p. 304-6.
272. Shannon, K.M., et al., *Alpha-synuclein in colonic submucosa in early untreated Parkinson's disease*. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society, 2011.
273. Hawkes, C.H., K. Del Tredici, and H. Braak, *Parkinson's disease: the dual hit theory revisited*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1170**: p. 615-22.
274. Stern, M.B. and A. Siderowf, *Parkinson's at risk syndrome: can Parkinson's disease be predicted?* Mov Disord, 2010. **25 Suppl 1**: p. S89-93.
275. Dickson, D.W., et al., *Neuropathology of non-motor features of Parkinson disease*. Parkinsonism Relat Disord, 2009. **15 Suppl 3**: p. S1-5.
276. Boeve, B.F., et al., *Pathophysiology of REM sleep behaviour disorder and relevance to neurodegenerative disease*. Brain, 2007. **130**(Pt 11): p. 2770-88.
277. Postuma, R.B., et al., *Quantifying the risk of neurodegenerative disease in idiopathic REM sleep behavior disorder*. Neurology, 2009.
278. McKeith, I.G., et al., *Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium*. Neurology, 2005. **65**(12): p. 1863-72.
279. Ironside, J.W., et al., *Retrospective study of prion-protein accumulation in tonsil and appendix tissues*. Lancet, 2000. **355**(9216): p. 1693-4.
280. Wadsworth, J.D., et al., *Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay*. Lancet, 2001. **358**(9277): p. 171-80.
281. Piche, T., et al., *Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators*. Gut, 2009. **58**(2): p. 196-201.
282. Van Landeghem, L., et al., *Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF*. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, 2011. **300**(6): p. G976-87.
283. Flamant, M., et al., *Enteric glia protect against Shigella flexneri invasion in intestinal epithelial cells: a role for S-nitrosoglutathione*. Gut, 2011. **60**(4): p. 473-84.
284. Bach-Ngohou, K., et al., *Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation through 15-deoxy-12,14-prostaglandin J2*. J Physiol, 2010. **588**(Pt 14): p. 2533-44.
285. Savidge, T.C., et al., *Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione*. Gastroenterology, 2007. **132**(4): p. 1344-58.
286. Neunlist, M., et al., *Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway*. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, 2007. **292**(1): p. G231-41.
287. Toumi, F., et al., *Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model*. Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society, 2003. **15**(3): p. 239-42.
288. Neunlist, M., et al., *Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways*. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, 2003. **285**(5): p. G1028-36.
289. Solano, S.M., et al., *Expression of alpha-synuclein, parkin, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 mRNA in human brain: genes associated with familial Parkinson's disease*. Ann Neurol, 2000. **47**(2): p. 201-10.
290. Cabin, D.E., et al., *Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2002. **22**(20): p. 8797-807.
291. Abeliovich, A., et al., *Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system*. Neuron, 2000. **25**(1): p. 239-52.
292. Madsen, J.T., et al., *Tetrahydrobiopterin precursor sepiapterin provides protection against neurotoxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium in nigral slice cultures*. Journal of Neurochemistry, 2003. **85**(1): p. 214-23.
293. Elstner, A., et al., *Identification of diagnostic serum protein profiles of glioblastoma patients*. Journal of neuro-oncology, 2011. **102**(1): p. 71-80.

294. Simunovic, F., et al., *Gene expression profiling of substantia nigra dopamine neurons: further insights into Parkinson's disease pathology*. Brain : a journal of neurology, 2009. **132**(Pt 7): p. 1795-809.
295. Liu, M.T., et al., *5-HT₄ receptor-mediated neuroprotection and neurogenesis in the enteric nervous system of adult mice*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2009. **29**(31): p. 9683-99.
296. Laranjeira, C., et al., *Glial cells in the mouse enteric nervous system can undergo neurogenesis in response to injury*. The Journal of clinical investigation, 2011. **121**(9): p. 3412-24.
297. Volpicelli-Daley, L.A., et al., *Exogenous alpha-synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death*. Neuron, 2011. **72**(1): p. 57-71.
298. Dunning, C.J., et al., *Can Parkinson's disease pathology be propagated from one neuron to another?* Progress in Neurobiology, 2011.
299. Gershon, M.D., *The second brain : the scientific basis of gut instinct and a groundbreaking new understanding of nervous disorders of the stomach and intestine*. 1st ed 1998, New York, NY: HarperCollinsPublishers. xvi, 314 p.
300. Agnati, L.F., et al., *Understanding wiring and volume transmission*. Brain research reviews, 2010. **64**(1): p. 137-59.
301. Baraban, S.C. and M.K. Tallent, *Interneuron Diversity series: Interneuronal neuropeptides--endogenous regulators of neuronal excitability*. Trends Neurosci, 2004. **27**(3): p. 135-42.
302. Egberongbe, Y.I., et al., *The distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the human brain*. Neuroscience, 1994. **59**(3): p. 561-78.
303. Mayer, E.A., *Gut feelings: the emerging biology of gut-brain communication*. Nature reviews. Neuroscience, 2011. **12**(8): p. 453-66.
304. Van Oudenhove, L., et al., *Fatty acid-induced gut-brain signaling attenuates neural and behavioral effects of sad emotion in humans*. The Journal of clinical investigation, 2011. **121**(8): p. 3094-9.
305. Winge, K., D. Rasmussen, and L.M. Werdelin, *Constipation in neurological diseases*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2003. **74**(1): p. 13-9.
306. Graus, F. and J. Dalmau, *Paraneoplastic neurological syndromes: diagnosis and treatment*. Curr Opin Neurol, 2007. **20**(6): p. 732-7.
307. Kashyap, P. and G. Farrugia, *Enteric autoantibodies and gut motility disorders*. Gastroenterology clinics of North America, 2008. **37**(2): p. 397-410, vi-vii.
308. De Giorgio, R., et al., *Anti-HuD-induced neuronal apoptosis underlying paraneoplastic gut dysmotility*. Gastroenterology, 2003. **125**(1): p. 70-9.
309. Barnett, J.L., et al., *Familial visceral neuropathy with neuronal intranuclear inclusions: diagnosis by rectal biopsy*. Gastroenterology, 1992. **102**(2): p. 684-91.
310. El-Rifai, N., et al., *Neuronal intranuclear inclusion disease presenting as chronic intestinal pseudo-obstruction in the neonatal period in the absence of neurologic symptoms*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2006. **42**(3): p. 321-3.
311. Paviour, D.C., et al., *Neuronal intranuclear inclusion disease: report on a case originally diagnosed as dopa-responsive dystonia with Lewy bodies*. Mov Disord, 2005. **20**(10): p. 1345-9.
312. Takahashi-Fujigasaki, J., *Neuronal intranuclear hyaline inclusion disease*. Neuropathology, 2003. **23**(4): p. 351-9.
313. Clarke, C.M., et al., *Visceral neuropathy and intestinal pseudo-obstruction in a murine model of a nuclear inclusion disease*. Gastroenterology, 2007. **133**(6): p. 1971-8.
314. Rassi, A., Jr., A. Rassi, and J.A. Marin-Neto, *Chagas disease*. Lancet, 2010. **375**(9723): p. 1388-402.
315. Carod-Artal, F.J. and J. Gascon, *Chagas disease and stroke*. Lancet Neurol, 2010. **9**(5): p. 533-42.
316. Giordano, C., et al., *Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy: evidence of mitochondrial DNA depletion in the small intestine*. Gastroenterology, 2006. **130**(3): p. 893-901.
317. Berry-Kravis, E., et al., *Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: clinical features, genetics, and testing guidelines*. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society, 2007. **22**(14): p. 2018-30, quiz 2140.
318. Hunsaker, M.R., et al., *Widespread non-central nervous system organ pathology in fragile X premutation carriers with fragile X-associated tremor/ataxia syndrome and CGG knock-in mice*. Acta Neuropathologica, 2011. **122**(4): p. 467-79.
319. Utari, A., et al., *Aging in fragile X syndrome*. Journal of neurodevelopmental disorders, 2010. **2**(2): p. 70-76.
320. Neunlist, M., et al., *Neuro-glial crosstalk in inflammatory bowel disease*. J Intern Med, 2008. **263**(6): p. 577-83.
321. Geissler, A., et al., *Focal white-matter lesions in brain of patients with inflammatory bowel disease*. Lancet, 1995. **345**(8954): p. 897-8.
322. Hart, P.E., et al., *Brain white-matter lesions in inflammatory bowel disease*. Lancet, 1998. **351**(9115): p. 1558.

323. Brun, P., et al., *Herpes simplex virus type 1 infection of the rat enteric nervous system evokes small-bowel neuromuscular abnormalities*. Gastroenterology, 2010. **138**(5): p. 1790-801.
324. Selgrad, M., et al., *JC virus infects the enteric glia of patients with chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction*. Gut, 2009. **58**(1): p. 25-32.
325. Davies, G.A., et al., *Prion diseases and the gastrointestinal tract*. Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie, 2006. **20**(1): p. 18-24.
326. Ford, M.J., et al., *Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse*. Neuroscience, 2002. **113**(1): p. 177-92.
327. McBride, P.A. and M. Beekes, *Pathological PrP is abundant in sympathetic and sensory ganglia of hamsters fed with scrapie*. Neuroscience Letters, 1999. **265**(2): p. 135-8.
328. Sigurdson, C.J., et al., *PrP(CWD) in the myenteric plexus, vagosympathetic trunk and endocrine glands of deer with chronic wasting disease*. The Journal of general virology, 2001. **82**(Pt 10): p. 2327-34.
329. Haik, S., et al., *The sympathetic nervous system is involved in variant Creutzfeldt-Jakob disease*. Nat Med, 2003. **9**(9): p. 1121-3.
330. Lawson, V.A., et al., *The brain to gut pathway: a possible route of prion transmission*. Gut, 2010. **59**(12): p. 1643-51.
331. Prusiner, S.B., *Prions*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(23): p. 13363-83.
332. Brundin, P., R. Melki, and R. Kopito, *Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2010. **11**(4): p. 301-7.
333. Angot, E., et al., *Are synucleinopathies prion-like disorders?* Lancet Neurol, 2010. **9**(11): p. 1128-38.
334. Haik, S., et al., *Alpha-synuclein-immunoreactive deposits in human and animal prion diseases*. Acta Neuropathol (Berl), 2002. **103**(5): p. 516-20.
335. Halliday, G.M., et al., *Neuropathology underlying clinical variability in patients with synucleinopathies*. Acta Neuropathologica, 2011. **122**(2): p. 187-204.
336. Yamada, M., et al., *Involvement of the cerebral cortex and autonomic ganglia in Machado-Joseph disease*. Acta Neuropathologica, 2001. **101**(2): p. 140-4.
337. Li, M., et al., *Nonneural nuclear inclusions of androgen receptor protein in spinal and bulbar muscular atrophy*. The American Journal of Pathology, 1998. **153**(3): p. 695-701.
338. Yamada, M., et al., *Widespread occurrence of intranuclear atrophin-1 accumulation in the central nervous system neurons of patients with dentatorubral-pallidoluysian atrophy*. Ann Neurol, 2001. **49**(1): p. 14-23.
339. Moffitt, H., et al., *Formation of polyglutamine inclusions in a wide range of non-CNS tissues in the HdhQ150 knock-in mouse model of Huntington's disease*. PLoS One, 2009. **4**(11): p. e8025.
340. Wakabayashi, K., et al., *Involvement of the peripheral nervous system in synucleinopathies, tauopathies and other neurodegenerative proteinopathies of the brain*. Acta Neuropathologica, 2010. **120**(1): p. 1-12.
341. Shankle, W.R., et al., *Studies of the enteric nervous system in Alzheimer disease and other dementias of the elderly: enteric neurons in Alzheimer disease*. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc, 1993. **6**(1): p. 10-4.
342. Bellini, M., et al., *Gastrointestinal manifestations in myotonic muscular dystrophy*. World journal of gastroenterology : WJG, 2006. **12**(12): p. 1821-8.
343. Muraige, C.A., et al., *Similar brain tau pathology in DM2/PROMM and DM1/Steinert disease*. Neurology, 2005. **65**(10): p. 1636-8.
344. Leroy, O., et al., *Brain-specific change in alternative splicing of Tau exon 6 in myotonic dystrophy type 1*. Biochimica et biophysica acta, 2006. **1762**(4): p. 460-7.
345. Arai, H., et al., *Expression patterns of beta-amyloid precursor protein (beta-APP) in neural and nonneural human tissues from Alzheimer's disease and control subjects*. Ann Neurol, 1991. **30**(5): p. 686-93.

RESUME ET MOTS CLEFS

SYSTEME NERVEUX ENTERIQUE ET MALADIE DE PARKINSON

Les lésions emblématiques de la maladie de Parkinson que sont la perte neuronale et les inclusions de Lewy affectent très précocement le système nerveux autonome, dans son contingent central (centres de la moelle et du tronc cérébral) et périphérique (ganglions végétatifs et plexus intrinsèques). Des séries autopsiques suggèrent que le processus dégénératif évolue de façon centripète au sein du système nerveux autonome en débutant par l'atteinte post-ganglionnaire. Ces éléments pointent les plexus intrinsèques comme origine potentielle de la maladie.

Le système nerveux entérique est le plus différencié ces plexus. Des arguments histologiques, cliniques et épidémiologiques confirment l'atteinte précoce de ce système complexe dans la maladie de Parkinson. Contrairement au système nerveux central, il est facilement accessible à la biopsie par endoscopie digestive.

Cet ouvrage est consacré aux biopsies digestives comme outil diagnostique dans la maladie de Parkinson. Les inclusions de Lewy de la muqueuse colique et du plexus sous-muqueux en constituent un biomarqueur histologique potentiel. Sur une série de 29 patients parkinsoniens et de 10 témoins, la sensibilité des biopsies atteint 72% et leur spécificité 100%. La charge lésionnelle sous-muqueuse est répartie selon un gradient caudo-rostral dans le côlon. Corrélée à la sévérité de la maladie, elle semble en revanche indépendante de l'atteinte olfactive également précoce dans la maladie. Au delà de potentielles applications diagnostiques, l'accès aisé à la neuropathologie de la maladie de Parkinson ouvre des perspectives pour la recherche clinique et fondamentale.

MOTS CLEFS : Maladie de Parkinson, Système Nerveux Autonome, Système Nerveux Entérique, Biopsies Digestives, Troubles Gastro-Intestinaux, Corps de Lewy, Alpha-Synucléine

THE ENTERIC NERVOUS SYSTEM IN PARKINSON'S DISEASE

The autonomic nervous system belongs to the earliest regions affected by Parkinson's disease pathology. Neuronal loss and Lewy inclusions are present both in its central (autonomic nuclei of the brainstem and spinal cord) and peripheral (autonomic ganglia and intrinsic plexuses) components. Recent studies suggest that the degenerative process follows a centripetal route within the autonomic nervous system, the postganglionic neurons being affected first, and point to the intrinsic plexuses as the putative origin of the disease.

The enteric nervous system is the most differentiated of these plexuses. Pathological, clinical and epidemiological data confirm its early dysfunction in Parkinson's disease. Contrary to the central nervous system, it is readily biopsable by digestive endoscopy.

This work focuses on digestive biopsies as a diagnostic tool in Parkinson's disease, by studying the value of Lewy inclusions of the colonic mucosa and submucosal plexus as a pathological biomarker for Parkinson's disease. In a cohort of 29 patients and 10 controls, our method reached 72% sensitivity and 100% specificity. Pathological burden within the colonic submucosa follows a rostrocaudal distribution. It is correlated to disease severity but not to olfactory dysfunction, which is also an early sign of the disease. Beyond the potential diagnostic applications, easy access to Parkinson's disease pathology opens perspectives for clinical and basic research.

KEYWORDS : Parkinson's Disease, Autonomic Nervous System, Enteric Nervous System, Gastrointestinal biopsies, Gastrointestinal Diseases, Lewy Bodies, Alpha-Synuclein

LEBOUVIER Thibaud

CM2R Neurologie

Hôpital Laënnec – CHU de Nantes

Saint Herblain – 44093 Nantes Cedex 1

Visa du Directeur de thèse