

Analyse du système nerveux entérique dans la PSP

Responsable du projet

Pr Pascal DERKINDEREN

Directeur de l'unité Inserm 913

Dr Michel NEUNLIST

PU-PH Neurologie, Inserm U913, CHU Nantes

DR2 Inserm, Inserm 913

Coordonnées : Inserm U913, CHU de Nantes, 1 place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes Cedex 01. Tél: 0240165205. pascal.derkinderen@chu-nantes.fr; derkinderenp@yahoo.fr.

Contexte scientifique du projet de recherche

Le système nerveux entérique (SNE) est un réseau neuronal distribué tout le long du tube digestif, composé de plus de 100 millions de neurones, soit autant que dans la moelle épinière (1). Cette subdivision du système nerveux végétatif est parfois appelée « le second cerveau » car elle est capable de réguler de façon autonome les fonctions digestives, en partie indépendamment du système nerveux central (SNC). Le SNE présente par ailleurs de nombreuses similitudes avec le SNC. Les neurones entériques sont fonctionnellement variés et les différents neurotransmetteurs qu'ils synthétisent définissent leur codage neurochimique et déterminent leur rôle physiologique. Tout comme le SNC, le SNE contient des cellules gliales, les cellules gliales entériques (CGE) qui sont proches des astrocytes tant d'un point de vue morphologique que physiologique (2).

Le SNE est organisé en deux plexus principaux : le plexus myentérique, qui contrôle essentiellement la motilité, et le plexus sous-muqueux qui est principalement impliqué dans la régulation de la sécrétion digestive (Figure 1). Les techniques développées au laboratoire permettent d'étudier de façon fiable et précise le plexus sous-muqueux à partir de biopsies endoscopiques prélevées au cours d'une recto-sigmoïdoscopie ou d'une coloscopie (Figure 1) (3). Ainsi par immunohistochimie, une biopsie colique contient en moyenne 150 neurones et 4 à 5 fois plus de CGE (3). Des analyses complémentaires par Western Blot et/ou en PCR quantitative permettent d'étudier l'expression des principaux marqueurs neuronaux, gliaux et de l'inflammation dans le plexus-sous muqueux (3,4).

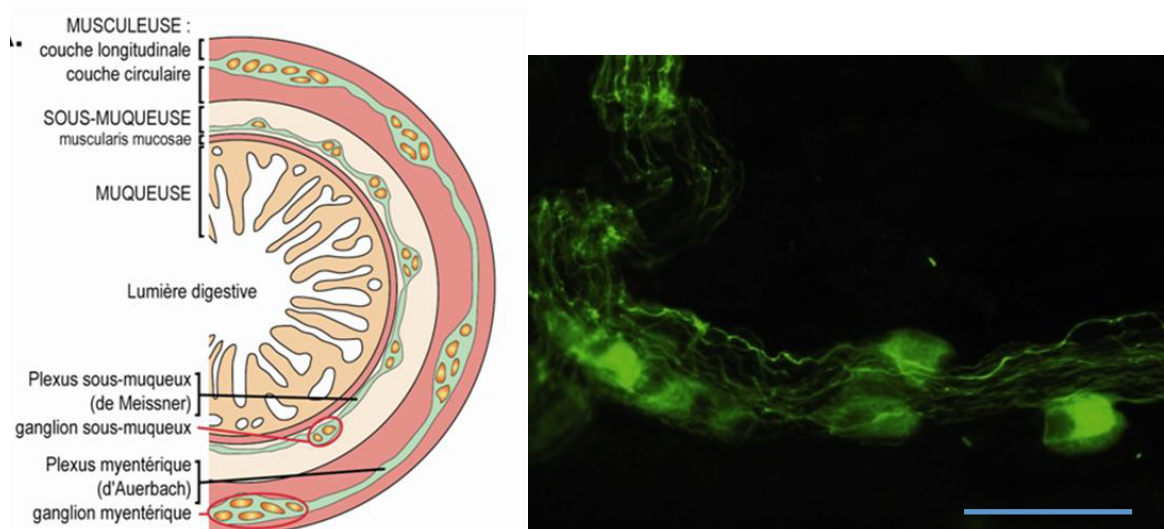


Figure. Droite, Organisation du système nerveux entérique en deux plexus principaux ; les biopsies coliques endoscopiques permettent d'accéder au plexus sous-muqueux (de Meissner). A Gauche, Immunomarquage du plexus sous-muqueux prélevé à partir de biopsies coliques. Immunomarquage pan-neuronal (protéine NF 220) permettant le comptage du nombre de neurones par ganglion et l'identification des prolongements neuronaux. Barre d'échelle à 30 micromètres.

Nous avons utilisé ces techniques d'analyse du plexus sous-muqueux chez les patients atteints de maladie de Parkinson. L'analyse des biopsies a permis de mettre en évidence des inclusions d'alpha-synucléine comparables aux prolongements de Lewy dans les neurones entériques chez 72% des patients parkinsoniens (5,6). La présence de ces inclusions était associée à une augmentation de l'expression des principales cytokines pro-inflammatoires (Interleukine-6, Interleukine 1-beta, TNF-alpha) et à une augmentation des marqueurs gliaux (GFAP et Sox-10)(4).

Hypothèses et objectifs du projet de recherche

Bien que les données sur l'atteinte des systèmes nerveux périphériques et plus particulièrement du système nerveux végétatif dans la paralysie supranucléaire progressive (PSP) soient peu abondantes, des travaux autopsiques d'équipes japonaises ont montré la présence d'inclusions intraneurales de protéine tau dans les ganglions sympathiques au cours de la maladie (revue dans (7)). Notre hypothèse est donc que l'analyse du SNE au cours de la PSP, permettrait d'étudier le processus neurodégénératif du vivant du patient, comme cela est désormais le cas pour la maladie de Parkinson. Nous proposons :

- d'étudier la présence de protéine tau pathologique dans le SNE des patients PSP
- d'étudier l'expression des principales cytokines pro-inflammatoires dans tube digestif des patients atteints de PSP en les comparant à patients atteints de maladie de Parkinson et à des témoins
- d'étudier l'expression des marqueurs gliaux dans le tube digestif des patients atteints de PSP en les comparant à patients atteints de maladie de Parkinson et à des témoins

Déroulement du projet de recherche et plan expérimental

Patients et biopsies digestives

Les biopsies digestives utilisées pour cette étude ont déjà été réalisées. Six patients atteints de PSP (PSP probable ou possible selon les critères internationaux), 19 patients

atteints de maladie de Parkinson et 10 témoins (dépistage de cancer colo-rectal) ont eu une rectosigmoidoscopie ou une coloscopie. Dix biopsies ont été réalisées dans le colon gauche. Quatre ont été microdisséquées et conservées pour une analyse immunohistochimique ultérieure, 3 ont été conservées dans le RA1 et conservées à -80°C pour analyse par qPCR et 3 biopsies ont été conservées à -80°C pour analyse par Western Blot. Les prélèvements ont été réalisés dans le cadre du protocole ColoBioParker (NCT01353183) et le protocole a été soumis à l'accord du CPP Ouest VI.

Analyse des biopsies par immunohistochimie

Quatre biopsies seront consacrées à l'étude immunohistochimiques. Une immunohistochimie de surface (*whole mount*) est réalisée directement sur le plexus disséqué, selon des techniques développées au laboratoire (3). Dans un premier temps, nous réaliserons un comptage neuronal et glial après immunomarquage de marqueurs pan-neuronaux (protéine Hu C/D, neurofilaments) ou gliaux (facteur de transcription Sox-10). Des paramètres comme le nombre de neurones ou de CGE par ganglion, la densité ganglionnaire ou la densité neuro-gliale permettront d'estimer la population neuro-gliale globale. Dans un second temps, la recherche d'inclusions d'alpha-synucléine et de protéine tau se fera par immunomarquage de tau et l'alpha-synucléine phosphorylées. La localisation gliale ou neuronale des inclusions sera déterminée par le co-immarquage de Sox-10 ou des neurofilaments.

Table des anticorps primaires utilisés en immunohistochimie

Antigène	Référence	Fournisseur	Type, espèce	Dilution
Hu C/D	A-21271	Molecular Probes	Monoclonal, souris	1/200
Neurofilaments (NF 220 kDa)	AB1982	Chemicon/ Millipore	Polyclonal, lapin	1/500
Sox-10	MAB2864	R&D Systems	Monoclonal, souris	1/500
Alpha-synucléine	610787	BD Transduction	Monoclonal, souris	1/500
Alpha-synucléine phosphorylée (pS129)	01-2028	WAKO	Monoclonal, souris	1/2500
Tau phosphorylée (Ser 202, Thr 205)	MN 1020	Pierce	Monoclonal, lapin	1/200
Tau	Z0334	DAKO	Polyclonal, lapin	1/500
S100β	37A	Swant	Polyclonal, lapin	1/1000

Analyse des biopsies par qPCR

L'expression des cytokines pro-inflammatoires (TNF-alpha; Interleukine-6 ; Interféron gamma) et de marqueurs gliaux (GFAP, Sox-10, S-100β) sera étudiée par RT-PCR quantifiée en temps réel à partir de 3 biopsies du côlon gauche. L'ARN total sera extrait en utilisant le Kit NucleoSpin Triprep (Macherey-Nagel EURL, Hoerd, France) comme décrit précédemment (4). Les conditions de temps et de température ont été optimisées préalablement pour chaque amorce. Nous utiliserons les amorces suivantes :

- *S6 sens*: 5' -CCAAGCTTATTCAGCGTCTTGTTACTCC-3'
- *S6 anti-sens*: 5' -CCCTCGAGTCCTTCATTCTTGGC-3'
- *TNF-alpha sens* : 5'-CGCTCTTCTGCCTGCTGCACT -3'

- *TNF-alpha anti-sens* : 5'-ACTGGAGCTGCCCCCTCAGCTT-3'
- *Interleukine-6 sens* : 5'-CAATGAGGAGACTTGCCTGGTGAA-3'
- *Interleukine-6 anti-sens* : 5'-TGTGGTTGGGTCAGGGGTGGTT-3'
- *Interféron gamma sens* : 5'-CCAGAGCATCCAAAAGAGTGTGGAG -3'
- *Interféron gamma anti-sens* : 5'-GCTGGCGACAGTTCAGCCATCA-3'
- *GFAP sens* :5'-AACCGGATCACCATTCCCGTGC-3'
- *GFAP anti-sens* :5'-TGACCTCTCCATCCCGCATCTCC-3'
- *Sox-10 sens* : 5'-GTGCCCATGCCCGTGC-3'
- *Sox-10 anti-sens* : 5'-ATGAAGGGGCGCTTGTCAC-3'
- *S100-béta sens* : 5'-GAGCTGGAGAAGGCCATGG-3'
- *S100-béta anti-sens* : 5'-CTAATCTCACTCATGTTCAAAGAACTC-3'

Analyse des biopsies par Western Blot

Trois biopsies seront analysées par Western Blot. Ces expériences permettront non seulement de valider les résultats obtenus pour les marqueurs gliaux en qPCR mais aussi de déterminer si des formes anormalement phosphorylées de la protéine tau sont présentes dans le SNE des patients atteints de PSP. Une biopsie sur 3 sera lysée dans du SDS 1% et analysée par Immunoblot comme décrit précédemment (3,8). La révélation se fera en utilisant l'anticorps anti-GFAP (Dako, dilution 1/10000), Sox-10 et S100b (voir table, la dilution sera de 1/2000 et 1/10000). L'analyse des isoformes de tau chez les témoins, parkinsoniens et patients PSP se fera en utilisant l'anticorps anti-tau total (Dako, voir table, dilution 1/10000) avec et sans déphosphorylation par la phosphatase lambda (9). Un extrait de cerveau total de patient sans pathologie neurologique et un « tau ladder » (Sigma) seront utilisés pour identifier les isoformes présentes.

Deux biopsies seront analysées séparément par suivant un protocole d'ultracentrifugation afin de mettre en évidence la présence de formes insolubles et anormalement phosphorylées de la protéine tau (9), la révélation se fera en utilisant l'anticorps AT8 et tau total

Résultats attendus et perspectives

Cette étude présente un double intérêt dans le cadre de la PSP :

- ils permettront de savoir si les lésions caractéristiques de la maladie et plus particulièrement la présence d'agrégats de protéine tau anormalement phosphorylée sont présents dans le SNE des patients PSP. Ceci permettrait de transposer les résultats que nous avons obtenus dans la maladie de Parkinson à la PSP et d'utiliser le SNE comme une fenêtre ouverte sur le processus neurodégénératif dans les tauopathies.
- même en l'absence « tauopathie entérique », nos résultats pourront être utilisés et valorisés pour développer des biomarqueurs permettant de différencier maladie de Parkinson et PSP en utilisant les biopsies digestives.

Budget

Le financement demandé à PSP France s'élève à 20000 euros se décomposant comme suit :

- anticorps primaires : 7000 euros
- anticorps secondaires : 3000 euros
- matériel d'électrophorèse, consommable Novex : 4000 euros
- matériel et réactifs pour PCR : 3000 euros

- achat d'un système « Midigel » Invitrogen/Novex et du système de transfert correspondant permettant l'analyse de 28 échantillons en Westen Blot : 2000 euros
- lampes de microscope : 1000 euros

Bibliographie

1. Schemann M, Neunlist M. The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil.* 2004 Apr;16 Suppl 1:55–9.
2. Benarroch EE. Enteric nervous system: Functional organization and neurologic implications. *Neurology.* 2007 Nov 13;69(20):1953–7.
3. Lebouvier T, Coron E, Chaumette T, Paillusson S, Bruley des Varannes S, Neunlist M, et al. Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients. *Neurogastroenterol Motil.* 2010 Jan;22(1):e11–4.
4. Devos D, Lebouvier T, Lardeux B, Biraud M, Rouaud T, Pouclet H, et al. Colonic inflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2012(null) ed. 2012 Sep 24.
5. Lebouvier T, Neunlist M, Bruley des Varannes S, Coron E, Drouard A, Nguyen JM, et al. Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PLoS One.* 2010;5(9):e12728.
6. Pouclet H, Lebouvier T, Coron E, Varannes des SB, Rouaud T, Roy M, et al. A comparison between rectal and colonic biopsies to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2011(null) ed. 2012 Jan;45(1):305–9.
7. Wakabayashi K, Mori F, Tanji K, Orimo S, Takahashi H. Involvement of the peripheral nervous system in synucleinopathies, tauopathies and other neurodegenerative proteinopathies of the brain. *Acta neuropathologica.* 2010 Jul;120(1):1–12.
8. Paillusson S, Tasselli M, Lebouvier T, Mahe MM, Chevalier J, Biraud M, et al. alpha-Synuclein expression is induced by depolarization and cyclic AMP in enteric neurons. *J Neurochem.* 2010(null) ed. 2010 Nov;115(3):694–706.
9. Wray S, Saxton M, Anderton BH, Hanger DP. Direct analysis of tau from PSP brain identifies new phosphorylation sites and a major fragment of N-terminally cleaved tau containing four microtubule-binding repeats. *J Neurochem.* 2008 Jun 1;105(6):2343–52.