



HAL
open science

Tau dans le tube digestif: expression et phosphorylation dans les neurones entériques et dans les cellules entéroendocrines

Guillaume Chapelet

► To cite this version:

Guillaume Chapelet. Tau dans le tube digestif: expression et phosphorylation dans les neurones entériques et dans les cellules entéroendocrines. Médecine humaine et pathologie. Nantes Université, 2024. Français. NNT: 2024NANU1004 . tel-04737528

HAL Id: tel-04737528

<https://theses.hal.science/tel-04737528v1>

Submitted on 15 Oct 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie-Santé

Spécialité : Neurosciences

Par

Guillaume Chapelet

Tau dans le tube digestif : expression et phosphorylation dans les neurones entériques et dans les cellules entéroendocrines.

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 17 Janvier 2024

Unité de recherche : INSERM UMR1235 TENS

Rapporteurs avant soutenance :

Karelle LEROY Professeur, Université Libre de Bruxelles
Nicolas SERGEANT Directeur de recherche, Université de Lille

Composition du Jury :

Président : Claire ROUBAUD-BAUDRON PUPH, Université de Bordeaux

Dir. de thèse : Pascal DERKINDEREN PU-PH, Nantes Université
Co-dir. de thèse : Laure de DECKER PU-PH, Nantes Université

Invité(s)

Gilles BERRUT PU-PH, Nantes Université
Michel NEUNLIST Directeur de laboratoire, Nantes Université
Marc VERNY PU-PH, Nantes Université

Remerciements

A mon directeur de thèse, Mr le Pr Pascal Derkinderen, Merci pour ton accueil dans l'équipe, ta compréhension de mes difficultés de clinicien, ton accompagnement bienveillant, et tes relectures rigoureuses et attentives. Ma Thèse n'aurait certainement pas été possible sans toi. Merci de m'initier à la recherche fondamentale, et pour m'avoir donné l'opportunité de poursuivre mon ouverture d'esprit en Angleterre, avec Wendy Noble. Certaines personnes permettent d'avancer dans la vie, tu as fait cela pour moi, et je t'en suis reconnaissant, pour longtemps.

A Mme la Pr Laure de Decker, Merci de m'avoir fait l'honneur de co-encadrer ma Thèse et, plus globalement, de m'aider à développer mes compétences de gériatre. Merci de m'avoir accepté dans ton équipe, depuis quelques années déjà, tu m'honores de ta confiance, et tu participes, très activement, avec une grande bienveillance, à mon développement professionnel. J'ai conscience que je te dois beaucoup.

A Mme la Pr Karelle Leroy et Mr Le Pr Nicolas Sergeant, Merci de m'avoir fait l'honneur de relire cette Thèse, et de m'apporter votre savoir scientifique et fondamental, pour enrichir mes réflexions.

A Mme la Pr Claire Roubaud-Baudron, Merci de me faire l'honneur de participer à ce jury de Thèse. Merci de me proposer de participer à des initiatives gériatriques, très enrichissantes pour moi. Tu fais partie des personnes qui inspirent, et qui permettent d'aider à trouver et garder la motivation.

A Mr Le Pr Gilles Berrut, Merci de me faire l'honneur d'être présent. Vous avez une grande confiance en moi, et j'essaie de la mériter au quotidien. Merci, depuis de nombreuses années, de m'aider à développer mes compétences de gériatre, au sein de votre école gériatrique nantaise. Merci de me permettre de m'ouvrir l'esprit, en m'intégrant à des projets structurants, auxquels je n'aurai jamais imaginé participé. Merci pour tous vos conseils avisés, et pour les opportunités d'enrichir mes compétences d'enseignant.

A Mr le Pr Marc Verny, Merci de me faire l'honneur d'assister à ma Thèse. Je suis très admiratif de votre parcours professionnel, je vous remercie très sincèrement d'avoir accepté d'être présent.

A Mr le Pr Michel Neunlist, Merci de m'avoir accepté dans votre laboratoire. C'est l'occasion pour moi de découvrir le milieu de la recherche fondamentale, avec des chercheurs particulièrement compétents et bienveillants, et de m'ouvrir des perspectives de recherche fortement en lien avec ma pratique clinique, pour les patients âgés ayant des maladies neurocognitives.

A toutes les membres de l'équipe TENS, UMR 1235, pour votre accueil, votre bonne humeur, et vos conseils avisés. En particulier, un grand Merci à Gwenola, Malvyne, Thibault, Nora, Adrien, et Alice, pour leur aide dans les expérimentations, et pour m'avoir permis d'enrichir mes réflexions.

Aux médecins et à toute l'équipe paramédicale des services de gériatre de Nantes, Merci de m'enrichir grâce à vos nombreuses compétences. Merci de m'avoir intégré, si amicalement,

dans l'équipe, et Merci de me permettre de réaliser des projets de soin et de recherche. Un grand Merci à toutes les équipes gériatriques et neurologiques du CMRR de Nantes, Merci en particulier à Claire de m'aider à développer mes compétences en neurocognition, et de me donner l'opportunité de développer avec, et grâce à toi, des projets enrichissants. Merci également à Mohamad, pour me faire découvrir, et participer, à des projets de recherche en neuropsychologie.

A Nicolas Farthouat, Merci d'avoir été le premier à voir en moi un futur gériatre, il y a des (nombreuses) années, lors de mon premier stage d'internat au fin fond de la Vendée.

A la team Luçon/Mesquer, Merci de votre amitié sincère, et de rendre la vie nantaise/bretonne, et, aveyronnaise, si agréable.

A Jocelyne, Jean Pierre, Lionel, Daphnée, Thelma, Denise, François, Marc, Clotilde, Xavier, et Augustin, et aux autres membres de ma famille, Merci pour votre chaleureuse présence et pour votre amour. Ma vie serait tellement moins passionnante sans vous, et, surtout, je ne serai absolument pas où j'en suis sans votre soutien inconditionnel.

Enfin, Merci à *Agnès*, qui me supporte au quotidien. Merci de partager ma vie, de me soutenir, de m'encourager, de m'aimer, et d'avoir accepté de le faire pour toujours. Merci de m'aider à être un bon père, *Eulalie* et *Adèle*, vous êtes ce que j'ai de plus précieux.

Tau dans le tube digestif : expression et phosphorylation dans les neurones entériques et dans les cellules entéroendocrines

Table des matières

Préambule.....	4
1. L'axe intestin-cerveau	6
2. Le système nerveux entérique	8
2.1 Organisation générale du SNE	10
2.2 Fonctions du SNE.....	13
2.3 Neuropathie entérique	16
3. Les cellules entéroendocrines.....	18
3.1 Fonctions endocrines des CEE.....	19
3.2 Propriétés neuronales des CEE.....	22
4. Atteinte du tube digestif dans les protéinopathies du SNC	23
4.1 Tube digestif et synucléinopathie.....	23
4.2 Tube digestif et tauopathie	26
Rappel sur les tauopathie du SNC	26
Généralités sur la protéine tau.	27
Fonctions de la protéine tau.....	30
Modifications post-traductionnelles de la protéine tau.....	31
Expression de la protéine tau dans le SNE.....	33
4.3 Tube digestif et amyloïdopathie	35
5. Objectifs et présentation des articles	38
6. Tau expression and phosphorylation in enteroendocrine cells.....	39
7. Tau accumulates in Crohn's disease gut.....	40
8. Discussion	41
9. Références bibliographiques	49

Préambule

Le rôle potentiel de l'axe intestin-cerveau dans le développement des maladies neurodégénératives et neuropsychiatriques est un sujet de recherche intense (Cryan et al. 2019; Sampson et al. 2016; Friedland 2015; Chapelet et al. 2018). Pour ce qui est des maladies neurodégénératives, l'axe intestin-cerveau a principalement été étudié dans les synucléinopathies, un groupe de maladies associées à des dépôts d'alpha-synucléine (a-syn), et dont le principal représentant est la maladie de Parkinson (MP) (Chapelet et al. 2018). Il est en effet désormais bien établi que la MP n'est pas seulement une maladie du cerveau et de la substance noire, mais qu'elle est aussi une maladie digestive et du système nerveux entérique (SNE) (H. Braak et al. 2003; de Guilhem de Lataillade et al. 2020), compte tenu du fait que (i) les lésions neuropathologiques typiques de la MP (dépôts d'a-syn évocateurs de corps de Lewy) sont présentes dans les neurones entériques chez la quasi-totalité des sujets parkinsoniens (Beach et al. 2010; 2021; Gelpi et al. 2014) (ii) une grande majorité des sujets atteints de MP auront, un jour ou l'autre, des troubles digestifs (Knudsen et al. 2017), (iii) tout comme dans le Système Nerveux Central (SNC), l'a-syn pathologique dans le SNE des sujets parkinsoniens est agrégée, hyperphosphorylée, et tronquée, en faveur d'une authentique synucléinopathie entérique (revue dans (de Guilhem de Lataillade et al. 2020)). Finalement, l'existence d'une synucléinopathie entérique, dans la MP, suggère même la présence de deux formes de MP, l'une qui serait à début cérébral, et l'autre à début digestif (Berg et al. 2021).

En dehors des synucléinopathies, les tauopathies sont un autre groupe de maladies neurodégénératives, caractérisées par la présence de dépôts de protéines tau dans le SNC, dont les principaux représentants sont la Maladie d'Alzheimer (MA), la Paralyse Supranucléaire Progressive (PSP) et la Dégénérescence Cortico Basale (DCB) (Götz, Halliday, et Nisbet 2019; Sexton et al. 2022). Contrairement à l'a-syn, les données concernant la protéine tau dans le tube digestif, en conditions physiologique ou pathologique, sont encore peu nombreuses. Quelques études montrent que les neurones entériques expriment certaines isoformes de tau (Lionnet, Wade, et al. 2018) mais il n'y a pas, à l'heure actuelle, d'anomalie neuropathologique spécifiquement décrite dans le SNE dans les tauopathies (revue dans (Derkinderen et al. 2021)).

L'objectif de ce travail de thèse a donc été de renforcer nos connaissances sur la protéine tau dans le tube digestif, en abordant deux aspects. Dans un premier travail, nous nous sommes intéressés à l'expression de la protéine tau dans les cellules entéroendocrines (CEE), qui sont un acteur important de l'axe intestin-cerveau, et dont le rôle potentiel dans le développement des maladies neurodégénératives est en train d'émerger (Chapelet et al. 2018; Hurley et al.

2023; Ye et al. 2021). Dans un second travail, nous avons étudié l'expression et la phosphorylation de la protéine tau dans la maladie de Crohn (MC), une maladie inflammatoire digestive associée à des modifications du SNE et à une neuropathie entérique (revue dans (Villanacci et al. 2008)).

1. L'axe intestin-cerveau

Il serait impossible de débiter cette Thèse sans faire une introduction rapide sur l'axe intestin-cerveau. En effet, nous utiliserons ce terme à plusieurs reprises dans le manuscrit et, depuis quelques années, il est abondamment utilisé dans la littérature. A titre illustratif, l'étude de l'axe intestin-cerveau, dans les maladies neurodégénératives, a fait l'objet de près de 500 publications, entre 2014 et 2022, avec une croissance moyenne estimée à près de 25% par an (Sun et al. 2022).

Malgré l'intérêt récent pour ce concept, il faut préciser que les premières descriptions d'une communication entre l'intestin et le cerveau (et vice versa) datent du 18^{ème} siècle (Nguyen et Palm 2022) (Figure 1). Plus récemment, le concept d'axe intestin-cerveau a évolué vers une nouvelle définition, qui reste encore à préciser, avec l'adjonction du rôle potentiel du système immunitaire et du microbiote (Nguyen et Palm 2022) (Figure 1).

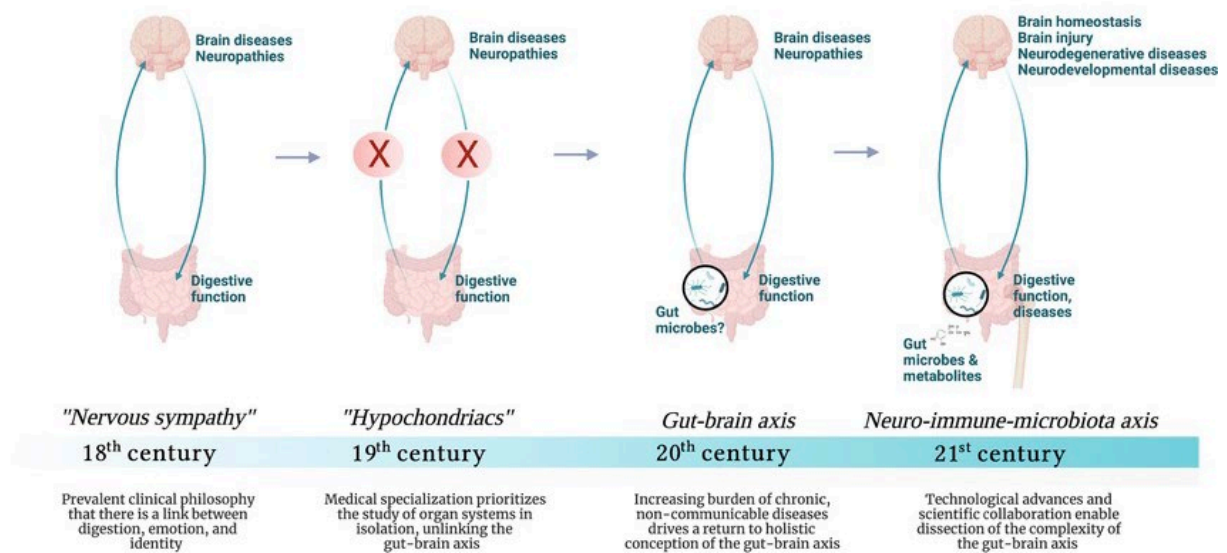


Figure 1. Brève histoire de l'axe intestin-cerveau. Au XVIII^e siècle, l'axe intestin-cerveau était vu comme une communication permanente, et non régulée, entre les 2 organes. Au XIX^e siècle, cette idée de communication entre les deux organes a été mise de côté, en partie en raison de la spécialisation par organes de la médecine. Au XX^e siècle, il y a eu un regain d'intérêt pour la communication intestin-cerveau, mais c'est au XXI^e siècle que ce concept émerge réellement avec l'ajout du microbiome intestinal et des acteurs neuroimmunologiques, D'après Nguyen et Palm (Nguyen et Palm 2022).

Ces dernières années, et à la suite des travaux de Sudo et al (Sudo et al. 2004), qui montraient une réponse altérée au stress chez les souris axéniques, le concept d'axe intestin-cerveau a évolué vers la description d'un système de communication bidirectionnel qui se compose de connexions neuronales et de composants humoraux générés par les systèmes

endocrinien et immunitaire ainsi que par l'épithélium intestinal (Figure 2). Plus précisément, l'axe intestin-cerveau comprend :

- Les connexions neuronales entre l'intestin et le cerveau, avec pour principaux acteurs le Système Nerveux Central (SNC, *i.e.* cerveau et moelle épinière), le Système Nerveux Autonome (SNA), le Système Nerveux Entérique (SNE), et l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. Le SNA, avec les voies sympathiques et parasympathiques, pilote les signaux afférents transmis par le SNE (provenant de la lumière digestive), les voies spinales et vagues (vers le SNC), et les signaux efférents qui vont du SNC vers le SNE et la paroi intestinale (McCorry et al. 2007). L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, qui fait partie du système limbique, est considéré comme le principal axe efférent qui coordonne les réponses adaptatives de l'organisme aux facteurs de stress (Lilly et Gann 1992). Le SNE, quant à lui, est le réseau neuronal intrinsèque du tube digestif.
- La composante humorale, essentiellement représentée par les cellules entéroendocrines (CEE), les cellules du système immunitaire présentes dans la muqueuse, et les métabolites produits par le microbiote (Gribble et Reimann 2019; Cryan et al. 2019).
- La barrière épithéliale intestinale, située entre la circulation sanguine et le contenu de la lumière digestive, est essentiellement formée par l'alignement des cellules épithéliales intestinales. Cette barrière empêche le passage de contenus nocifs tout en permettant l'absorption de nutriments (Marchiando, Graham, et Turner 2010). D'un point de vue moléculaire, les structures clefs de cette barrière sont les jonctions serrées, qui relient ensemble les entérocytes adjacents pour réguler la perméabilité paracellulaire. Ces jonctions serrées sont formées de protéines transmembranaires, claudines et occludines, connectées à l'actine du cytosquelette via des protéines de haut poids moléculaire, appelées *zonula occludens* (ZO-1, ZO-2 et 3) (Figure 2a).
- Le microbiote intestinal (Cryan et al. 2019), composé de plusieurs milliards de micro-organismes, dont principalement des bactéries, qui interagissent directement avec l'épithélium intestinal et contribuent à maintenir l'intégrité de l'épithélium intestinal, à travers la régulation de l'expression des protéines des jonctions serrées (Bhattarai 2018). A noter par ailleurs que le microbiote, et ses métabolites, ont également la capacité d'influencer l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique ainsi que la fonction et la maturation de la microglie dans le SNC (Michel et Prat 2016; Scheperjans et al. 2014).

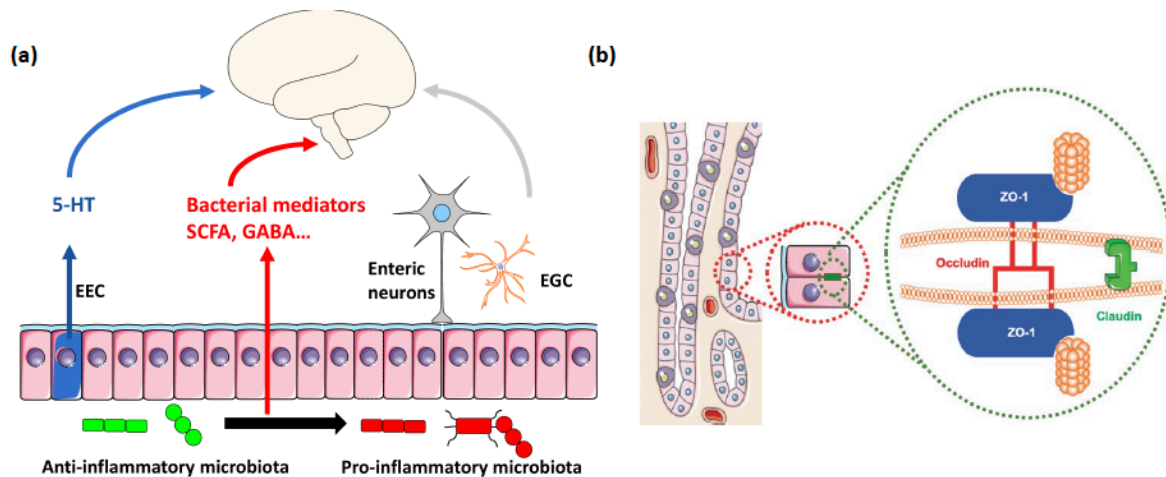


Figure 2. Principaux composants de l'axe intestin-cerveau et de la barrière épithéliale intestinale. (a) le système nerveux entérique (enteric neurons et enteric glial cells, EGC) permet de communiquer avec le cerveau via l'innervation autonome, en gris ; la composante humorale est principalement composée des métabolites bactériens, en rouge, comme les acides gras à chaîne courte (AGCC ou, en anglais, Short Chain Fatty Acid, SCFA) et certains neurotransmetteurs (GABA par exemple), et les cellules entéroendocrines, en bleu (Entero Endocrine Cells, EEC) qui sécrètent des neurotransmetteurs (5-HT, pour sérotonine) ou des hormones ayant un effet endocrine et/ou paracrine (b) la barrière épithéliale intestinale est principalement composée de l'alignement des cellules épithéliales reliées entre elles par des jonctions serrées.

Ainsi, considérant cette brève introduction sur l'axe intestin cerveau, dans ce travail de Thèse, nous nous sommes intéressés à deux acteurs digestifs principaux de l'axe intestin cerveau, **le SNE et les CEE**, décrits plus en détail dans les chapitres suivants.

2. Le système nerveux entérique

Comme cela a été décrit précédemment, l'innervation du tube digestif intègre deux réseaux nerveux, un réseau intrinsèque, le SNE, qui comprend des neurones situés dans la paroi du tube digestif, et un réseau extrinsèque, faisant partie du SNA, et qui fait le lien entre SNE et SNC (Figure 3). Le SNE, en raison de sa localisation dans la paroi digestive, est un acteur fondamental de plusieurs fonctions digestives, comme la régulation de la motricité digestive et des propriétés de barrière épithéliale intestinale (Schemann et Neunlist 2004; Neunlist et al. 2014; Goyal et Hirano 1996). Cependant, bien qu'il soit considéré comme intégré au SNA, et qu'il interagisse en permanence avec le SNC, le SNE peut tout à fait fonctionner de façon indépendante, comme cela a été mis en évidence par des expériences historiques menées par Bayliss et Starling (Bayliss et Starling 1901; Bayliss et Starlin 1899), qui ont constaté, après vagotomie, une persistance du péristaltisme intestinal et des contractions spontanées de

l'intestin et du côlon, chez le chien et le lapin. Ce fonctionnement indépendant du SNE a participé à l'émergence du concept d'axe intestin-cerveau (Furness et al. 2012), et explique le surnom de "deuxième cerveau" parfois donné au SNE (Furness et Stebbing 2018; Gershon et al. 1999). Par la suite, certains auteurs ont même proposé que le SNE soit considéré comme le "premier cerveau" étant donné que, dans les formes de vie les plus primordiales, il s'est développé avant le SNC, et de façon indépendante (Furness et Stebbing 2018).

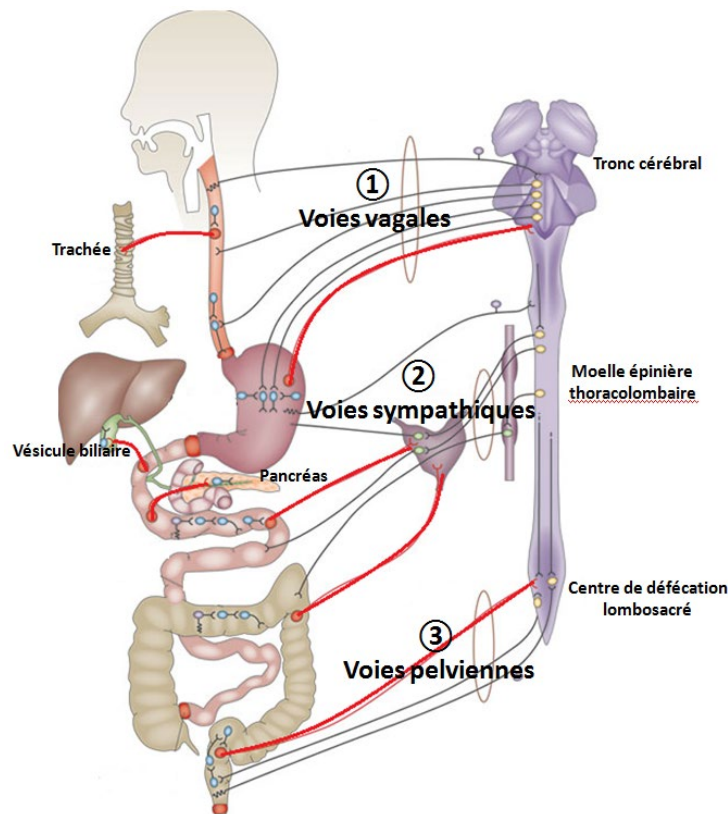


Figure 3. Innervation du tube digestif. L'innervation intrinsèque du tube digestif est assurée par le SNE qui interagit avec le SNC via le SNA par 3 principales voies extrinsèques, la voie vagale, la voie sympathique et les voies sacrées (ou pelviennes). Ces trois voies font intervenir des fibres nerveuses, soit sympathique soit parasympathique, et sont formées de fibres nerveuses afférentes ou efférentes. Plus précisément, l'innervation parasympathique du SNE fait intervenir le nerf vague, pour la partie haute du tube digestif (jusqu'au côlon transverse), et la voie sacrée, pour la partie basse du tube digestif (du côlon gauche au rectum). Les neurones afférents de la voie parasympathique, provenant du nerf vague, innervent la paroi digestive, la muqueuse et les muscle lisses. Leurs terminaisons nerveuses sont responsables de la perception des distensions mécaniques, et sont sensibles aux concentrations intraluminales de glucose, d'acides aminés ou d'acides gras. L'innervation sympathique regroupe des fibres nerveuses provenant des ganglions cœliaques et mésentériques. Les neurones afférents sympathiques sont principalement des neurones nocicepteurs, et les fibres efférentes ont pour principal rôle la régulation de la motricité intestinale et la régulation de la sécrétion digestive (D'après Furness, 2012).

Plusieurs éléments suggèrent que le SNE a une organisation en miroir du SNC. En effet, le SNE humain contient un nombre très important de neurones, presque égal à celui de la moelle épinière (Schemann et Neunlist 2004; Michel et al. 2022), et présente également une diversité neuronale et une répartition fonctionnelle, équivalentes à celle du SNC (Fung et Vanden Berghe 2020). De plus, comme le SNC, le SNE contient des cellules gliales, considérées comme équivalents des astrocytes, tant d'un point de vue morphologique, que fonctionnel (Jessen et Mirsky 1983) et revue dans (Boesmans et al. 2021)). Enfin, comme le SNC, le SNE peut être atteint par un nombre important de pathologies congénitales ou acquises, regroupées sous le terme de neuropathie entérique (De Giorgio et al. 2016).

2.1 Organisation générale du SNE

Le SNE s'étend du tiers supérieur de l'œsophage, jusqu'au rectum et dans les glandes digestives (glandes salivaires, pancréas et vésicule biliaire) (Furness 2012). Le SNE humain se compose d'un réseau d'environ 500 millions de neurones et 5 fois plus de cellules gliales entériques (Furness et al. 2014). Ce réseau est regroupé en ganglions, reliés entre eux par des fibres inter ganglionnaires, au sein de deux plexus, ayant des rôles complémentaires, le plexus myentérique d'Auerbach (dans les couches longitudinales et circulaires du tractus gastro-intestinal) et le plexus sous-muqueux (de Meissner). Plus précisément, le plexus myentérique est impliqué dans la contraction et la motilité intestinale, tandis que le plexus sous-muqueux joue un rôle dans la régulation de la sécrétion muqueuse et du flux sanguin de la paroi digestive (Benarroch 2007; Schemann et Neunlist 2004) (Figure 4).

Il existe plusieurs classifications des neurones entériques. En particulier, deux classifications basées sur leur critères morphologiques (Dogiel et Dogiel 1899) et leurs propriétés électrophysiologiques (Lomax, Bertrand, et Furness 2001) ont été proposées, mais ne sont plus utilisées de nos jours. Désormais, la classification des neurones entériques est principalement fonctionnelle, basée sur leur implication dans l'activité réflexe entérique, ou encore sur l'expression de différents neurotransmetteurs/messagers intercellulaires (Furness et Stebbing 2018; Neunlist et al. 2014; Hansen et al. 2003).

Les neurones entériques sécrètent et produisent plus de 30 neurotransmetteurs et messagers intercellulaires, qui peuvent être soit des neurotransmetteurs dits « classiques », *i.e.* aussi produits par les neurones du SNC (sérotonine, acétylcholine...), mais aussi des neuromédiateurs non produits dans le SNC, comme des peptides (polypeptide intestinal

vasoactif, VIP ou substance P) ou encore des gaz (NO, oxyde nitrique). La production et la libération de ces neuromédiateurs dépend généralement de leur fonction. Ainsi, les neurones moteurs excitateurs responsables d'une contraction musculaire, sont cholinergiques, alors que les neurones moteurs inhibiteurs sont nitrergiques et VIPergiques (Benarroch 2007; Schemann et Neunlist 2004).

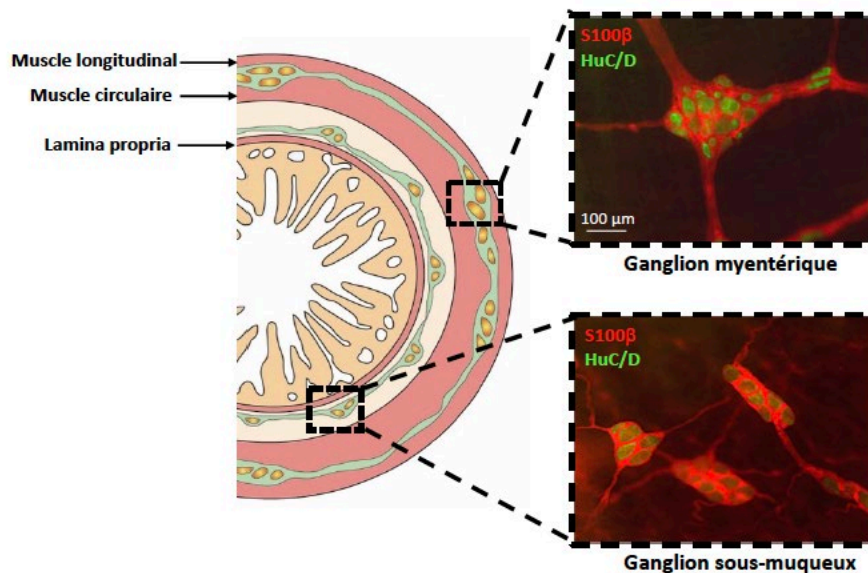


Figure 4. Organisation du système nerveux entérique dans la paroi intestinale. Le SNE est enchâssé dans le tube digestif, et organisé en deux plexus principaux, le plexus sous muqueux et myentérique. Les illustrations montrent un plexus myentérique et sous-muqueux de colon de souris adulte, disséqué pour obtenir une préparation 'whole mount' avec un double marquage, HuC/D, pour visualiser les neurones, et S100 β , pour identifier les cellules gliales entériques (images du laboratoire, Nora Béguin, Thibault Oullier et Guillaume Chapelet)

Selon leur fonction et leur localisation, les neurones entériques peuvent être regroupés en trois catégories : neurones afférents primaires intrinsèques (IPAN), interneurones, et neurones moteurs (Figure 5). Les neurones afférents primaires intrinsèques (IPAN) sont présents dans les ganglions des plexus sous-muqueux et myentérique, où ils représentent, respectivement, 14% et 30% des neurones. Les IPAN sont considérés comme des neurones mécano- et chémosensibles, car ils ont la capacité de répondre aux stimuli chimiques, provenant de la lumière intestinale, et aux déformations mécaniques de la muqueuse jouant un rôle dans la contraction musculaire (Furness et al. 2014; Clerc et Furness 2004). A noter que l'action des IPAN peut être modulée par de nombreuses substances, ou par d'autres types cellulaires, comme les cellules endocrines intestinales ou les cellules immunitaires (Ahlman et Nilsson 2001). Les interneurones, quant à eux, représentent la population la plus abondante de neurones

entériques. Ces neurones sont situés dans le plexus myentérique, et leur rôle principal est de transmettre l'information nerveuse provenant des IPAN, vers les neurones moteurs. Deux grandes catégories d'interneurones sont décrites, les interneurones ascendants, et les interneurones descendants. Les interneurones ascendants ont des voies axonales, en amont de leur stimulation, et sont responsables de l'activation de neurones moteurs excitateurs, via la sécrétion d'acétylcholine et de substance P (Bornstein, Costa, et Grider 2004). Les interneurones descendants ont des projections axonales en aval du tube digestif, vers les neurones moteurs descendants, et interviennent dans les réflexes sécréto-moteurs, via la sécrétion d'acétylcholine ou de sérotonine, ou dans le péristaltisme, via la sécrétion de NO et de VIP (Furness et al. 2014) (Figure 2). Finalement, les neurones moteurs, qui, quant à eux, peuvent être subdivisés en 5 sous-types différents, selon leur fonction (Hansen et al. 2003) : neurones moteurs musculaires excitateurs, neurones moteurs musculaires inhibiteurs, neurones sécrétomoteurs vasodilatateurs et non vasodilatateurs, et neurones moteurs innervant les cellules endocrines de l'estomac. Les neurones moteurs, en fonction des stimuli perçus via l'interaction avec les interneurones, ont la capacité de transmettre aux cellules effectrices des signaux activateurs ou inhibiteurs, respectivement par la sécrétion d'acétylcholine/substance P ou de NO/VIP.

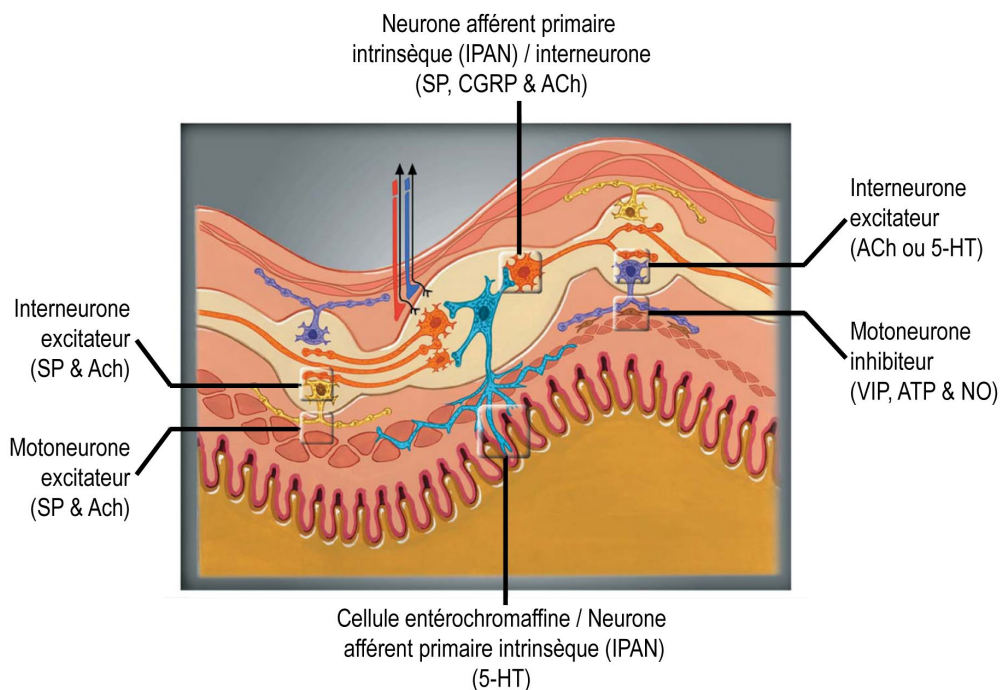


Figure 5. Organisation fonctionnelle des différentes populations de neurones du SNE en neurones afférents primaires intrinsèques (neurones mécano- et chémosensibles), au contact de la lumière intestinale, interneurones et motoneurones inhibiteurs/excitateurs, impliqués notamment dans le péristaltisme intestinal.

2.2 Fonctions du SNE

Le SNE participe à la régulation de nombreuses fonctions fondamentales du système digestif, en ayant, en particulier, une action régulatrice de la motricité digestive et de l'intégrité de la barrière intestinale (Schemann et Neunlist 2004; Neunlist et al. 2014). Par ailleurs, le SNE est en contact direct, et indirect, avec des stimuli perçus dans la lumière intestinale (rôle de *sensing*), et dans la paroi digestive (Schemann et Neunlist 2004; Neunlist et al. 2014). Le SNE a, par ailleurs, la capacité d'interagir avec le système immunitaire, le système endocrinien et le système vasculaire (régulation du flux sanguin digestif). Ces principales fonctions du SNE sont décrites plus en détails, ci-après.

L'intégrité neuronale est essentielle au bon fonctionnement de la motricité digestive, et implique les voies nerveuses intrinsèques et extrinsèques (Figure 3). Le réflexe péristaltique va permettre l'avancée du bol alimentaire, grâce à une contraction sur le versant oral, et une relaxation sur le versant anal (Figure 6). Il est initié par la perception par le SNE de différents stimuli chimiques (glucose, acides gras) ou physiques (perception de la distension des muscles de la paroi intestinales) (John B. Furness et al. 2014; John B. Furness 2012). L'activation des IPAN va conduire à la stimulation des interneurons qui vont activer, soit des neurones moteurs excitateurs ascendants responsables de la contraction des muscles sur versant oral (Acétylcholine et substance P), soit des neurones moteurs inhibiteurs sur le versant anal (NO et VIP) (Furness, 2000) (Huizinga et Lammers 2009) (Figure 6).

Le SNE joue aussi un rôle important dans la régulation de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale, et est ainsi responsable du maintien de l'homéostasie digestive, en permettant le passage de nutriments, d'électrolytes, ou en empêchant le passage d'agents pathogènes ou de substances toxiques (Marchiando, Graham, et Turner 2010). En effet, l'intégrité de la barrière intestinale est assurée par le maintien de sa conformation structurelle et, notamment, par la présence de jonctions serrées (Figure 2b) (Suzuki et al. 2013). Or, le SNE a la capacité de réguler l'intégrité de la barrière en sécrétant, par exemple, le peptide VIP qui diminue la perméabilité intestinale en agissant sur la protéine des jonctions serrées ZO-1, ou en sécrétant de l'acétylcholine qui, à l'inverse, augmente la perméabilité intestinale (Neunlist et al. 2003). De plus, fait intéressant, la stimulation du SNE, via par exemple la stimulation du nerf vague ou des racines sacrées, est également associé à une modification de la perméabilité de la barrière intestinale (Meurette et al. 2012).

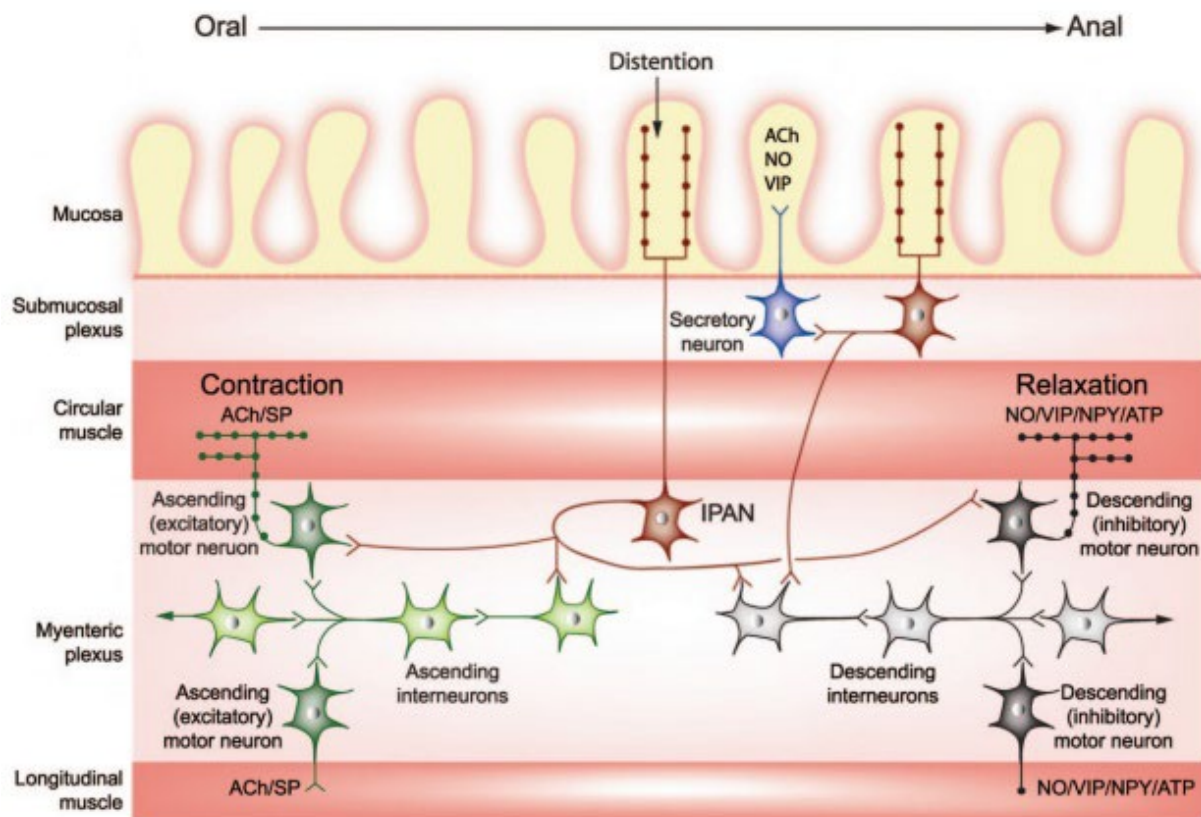


Figure 6. Connexions entre neurones entériques impliquées dans le réflexe péristaltique. Les neurones afférents primaires intrinsèques (IPAN) myentérique ou sous-muqueux qui sont activés, par exemple, par une distension de la paroi intestinale, font synapse avec les interneurons et les neurones moteurs. Le réflexe péristaltique comprend un réflexe excitateur ascendant médié par les neurones moteurs myentériques, qui utilisent l'acétylcholine (ACh) et la substance P (SP) et provoque une contraction des muscles circulaires et longitudinaux. Le réflexe inhibiteur descendant implique des neurones moteurs inhibiteurs qui utilisent le monoxyde d'azote (NO) et le polypeptide intestinal vasoactif (VIP) pour relaxer les muscles (Benarroch, 2007)

Il a été montré que le SNE pouvait jouer un rôle dans la réponse immunitaire, en participant à l'élimination d'agents pathogènes (Udit, Blake, et Chiu 2022). En effet, des projections des neurones entériques sont en étroite interaction avec des cellules immunitaires adaptatives, notamment au niveau des plaques de Peyer (follicules lymphoïdes de la muqueuse) (Chiocchetti et al. 2008; Vulchanova et al. 2007), et à proximité des cellules T régulatrices (Treg) de la *lamina propria* (voir figure 2) (Yan et al. 2021) ce qui permet aux neurones entériques d'influencer l'équilibre des populations de cellules T régulatrices dans le côlon (Vulchanova et al. 2007). Par ailleurs, le SNE est capable d'interagir avec les macrophages tissulaires, qui sont l'une des cellules immunitaires les plus nombreuses dans la muqueuse intestinale, notamment au niveau de la couche musculieuse (De Schepper et al. 2018; Muller et al. 2014). Une attention particulière a d'ailleurs été portée à l'interaction entre un sous type de

macrophages musculaires et le plexus myentérique (Verheijden et Boeckxstaens 2018; Viola et Boeckxstaens 2020). En effet, ces macrophages semblent être impliqués dans la régulation de la contractilité du muscle lisse, et donc de la motilité gastro-intestinale, et, notamment seraient impliqués dans l'iléus post-opératoire, un état clinique caractérisé par une inertie prolongée de la motilité intestinale, qui peut survenir après un traumatisme, ou une chirurgie (Kalff et al. 2003; Wehner et al. 2007). En effet, il a été mis en évidence que les neurones entériques étaient capables d'interagir directement avec les macrophages et de moduler leur fonction (Matteoli et al. 2014; Muller et al. 2014; Gabanyi et al. 2016). Cette interaction macrophage/SNE est susceptible d'expliquer que la stimulation du nerf vague puisse réduire l'iléus post-opératoire, en agissant sur l'inflammation localisée (de Jonge et al. 2005). Enfin, des travaux plus récents suggèrent une relation bidirectionnelle entre neurones entériques et composés de la lumière intestinale, comme le microbiote intestinal et ses métabolites (Jarret et al. 2020). Cette interaction bidirectionnelle microbiote/SNE serait associée à l'apparition de réponses immunologiques distinctes et spécifiques. Par exemple, Jarret et al. (Jarret et al. 2020) ont montré que les neurones entériques pouvaient jouer un rôle clef dans la barrière muqueuse, via la libération de l'IL-18, permettant de contrôler l'expression des protéines antimicrobiennes par les cellules caliciformes intestinales, responsables de l'élimination d'agents pathogènes.

Le SNE joue aussi un rôle fondamental de signalisation sensorielle (rôle de *sensing*) du contenu de la lumière digestive. Plus précisément, au niveau de l'intestin, la signalisation sensorielle du SNE est médiée par trois types de cellules : les IPANs, les CEE, et les cellules immunitaires (Mayer 2011). En effet, via leurs terminaisons nerveuses, les IPANs forment un réseau interconnecté avec les CEE, au niveau de la *lamina propria* de l'intestin. Ces CEE, situées au sein de l'épithélium intestinal, peuvent libérer en retour des molécules capables de moduler l'activité du SNE (Bertrand et al. 1997; Furness 2012). Par exemple, une des principales substances libérées par les CEE est la sérotonine, qui est impliquée dans la régulation du péristaltisme intestinal (Fung et Vanden Berghe 2020; Gershon 1999) (Figure 2). Un autre exemple de l'interconnexion neurone/CEE est la réponse aux stimuli lumineux associée à la sécrétion d'acide par les cellules pariétales de l'estomac, qui implique des substances sécrétées par les CEE, comme la gastrine, l'histamine et la somatostatine (Schubert et Peura 2008).

2.3 Neuropathie entérique

Des troubles digestifs, en particulier des troubles de la motricité intestinale, peuvent être la conséquence d'une atteinte du SNE, définissant le concept de neuropathies entériques (De Giorgio et al. 2016; De Giorgio et al. 1999). En effet, il est suggéré qu'une perte de plus de 50% des neurones des ganglions myentériques et sous-muqueux (par rapport aux témoins) serait un seuil critique de survenue de manifestations cliniques liées à des troubles de la motricité intestinale (Boschetti et al. 2019).

Les premiers travaux sur les neuropathies entériques remontent au XIXe siècle (plus précisément en 1886) lorsque Harald Hirschsprung, un pédiatre danois, a décrit la maladie qui porte toujours son nom (Skaba et al. 2007). Harald Hirschsprung a en effet identifié des anomalies du SNE responsables des symptômes, *i.e.* l'absence de ganglions myentériques et sous-muqueux chez des nouveau-nés présentant un mégacôlon congénital (Skaba et al. 2007). Désormais, les neuropathies entériques sont classées (De Giorgio et al. 2016) en primaires, si la maladie cible principalement le SNE, ou secondaires, si les anomalies du SNE font partie d'une affection systémique impliquant plusieurs organes, comme par exemple, le diabète, la sclérodémie systémique, ou l'amylose digestive (Knowles et al. 2013; De Giorgio et al. 2016; De Giorgio et Camilleri 2004)

La description histopathologique des différentes neuropathies entériques se fait en fonction des caractéristiques neurodégénératives et/ou immunitaires/inflammatoires (De Giorgio et al. 2016). Ainsi, la neuropathie entérique peut être analysée en considérant la présence d'une infiltration de lymphocytes, d'éosinophiles, ou de mastocytes, dans les plexus du SNE, aboutissant parfois à un aspect de plexite (De Giorgio et Camilleri 2004; Knowles et al. 2013). Cependant, les analyses histopathologiques, et la classifications des neuropathies, sont amenées à évoluer, car les mécanismes impliqués dans l'apparition des neuropathies ne sont pas encore complètement compris (De Giorgio et al. 2016). Cela est principalement lié à la difficulté d'étude du SNE, notamment concernant l'analyse quantitative des ganglions entériques, ou des corps cellulaires neuronaux, qui est complexe, chronophage, et reste peu réalisable en routine (Boschetti et al. 2019; De Giorgio et al. 2016). Il est en de même pour les analyses qualitatives du SNE, difficiles à réaliser et à interpréter, en raison du manque de normes validées (De Giorgio et al. 2016).

La plupart des neuropathies primaires sont considérées comme idiopathiques, même si des facteurs de risque génétiques ont pu être identifiés (De Giorgio et al. 2016). Par ailleurs, des lésions spécifiques du SNE ont pu être identifiées dans certaines neuropathies primaires. Ainsi, certaines sous-populations neuronales peuvent être spécifiquement dysfonctionnelles,

comme dans les troubles chroniques de la motilité gastrique (Boschetti et al. 2019) ou la maladie de Hirschsprung (Dariel et al. 2020). Par ailleurs, des neurones moteurs inhibiteurs nitreergiques seraient affectés dans certaines neuropathies entériques, comme l'achalasie (De Giorgio et al. 1999; De Giorgio et al. 2016), et la constipation liée à un ralentissement chronique du transit (Wattchow et al. 2008). Considérant les caractéristiques immunitaires des neuropathies, il a aussi été décrit des éléments spécifiques, dans certaines neuropathies primaires, comme la présence de ganglions entériques "géants" (probablement dus à une augmentation du nombre de neurones et des cellules gliales) dans une maladie génétique, la ganglioneuromatose (Raue et Frank-Raue 2010). Dans certaines neuropathies primaires, une expression pathologique de certains marqueurs neuronaux (*neuron specific enolase*, NSE, *protein gene product 9.5*, PGP9.5, ou Hu) peut être observée au niveau des corps cellulaires des neurones ganglionnaires, et est associée à la présence d'anomalies morphologiques des mitochondries, d'une vacuolisation cytoplasmique et à une perte axonale (De Giorgio et Camilleri 2004). Cet aspect de ganglionite lymphocytaire, avec présence d'anticorps anti-neuronaux anti-HuC/D (selon la cible moléculaire) ou présence d'anticorps anti-neuronaux nucléaires (ANNA-1) (selon la nomenclature), a d'ailleurs fait émerger une entité spécifique de neuropathie entérique dénommée neuropathie primaire à anticorps anti-neuronaux (De Giorgio et Camilleri 2004). Fait intéressant, en plus de leur intérêt dans le diagnostic de neuropathies entériques inflammatoires, les anticorps anti-HuC/D sont associés à une altération de la voie réflexe ascendante du péristaltisme, *in vitro*, provoquant l'apoptose neuronale, et déclenchant des mécanismes autophagiques dans des modèles de cultures primaires de neurones myentériques (De Giorgio et al., 2004). Finalement, l'infiltration lymphocytaire dans les ganglions entériques et la présence d'autoanticorps anti-neuronaux spécifiques, fournissent donc une base de connaissance permettant de mieux comprendre l'origine de la dysmotilité sévère observée chez certains patients.

Une atteinte du SNE est également décrite dans la maladie de Crohn (MC) (Lakhan et Kirchgessner 2010). La MC est une maladie inflammatoire de l'intestin, caractérisée par une inflammation chronique, rémittente et récurrente, de l'ensemble du tractus gastro-intestinal. Bien que l'étiologie précise de la MC soit inconnue, il est généralement admis qu'elle se développe à travers une réponse immunitaire exagérée à des antigènes luminaux, chez des individus génétiquement susceptibles, entraînant une inflammation et des lésions de l'épithélium intestinal (Torres et al. 2017). Fait intéressant, le processus pathologique de la MC ne se limite pas au revêtement épithélial, mais s'étend à tous les composants de la paroi, y

compris le SNE, dont la structure et le phénotype neurochimique sont altérés lors de phase active de MC (Brierley et Linden 2014). De nombreuses anomalies structurelles du SNE ont été décrites au cours des MICI, parmi lesquelles des altérations architecturales des plexus (Nadorra, Landing, et Wells 1986), un nombre accru de fibres nerveuses épaissies/hypertrophiées (Rumessen, Vanderwinden, et Horn 2011; Geboes 1993), altérations des corps cellulaires neuronaux (Oehmichen et Reifferscheid 1977; Geboes et Collins 1998) et une nécrose axonale (Dvorak et al. 1993) (Figure 7a). Au-delà de ces anomalies morphologiques, des modifications du phénotype neurochimique ont été rapportées, avec par exemple une augmentation de la proportion des neurones VIPergiques (Boyer et al. 2007; Belai et al. 1997). A noter par ailleurs que quelques études qui ont évalué la densité neuronale, dans les plexus myentérique et/ou sous-muqueux au cours de la MC, n'ont pas trouvé de différence avec une population témoin (Schneider et al. 2001; Boyer et al. 2007).

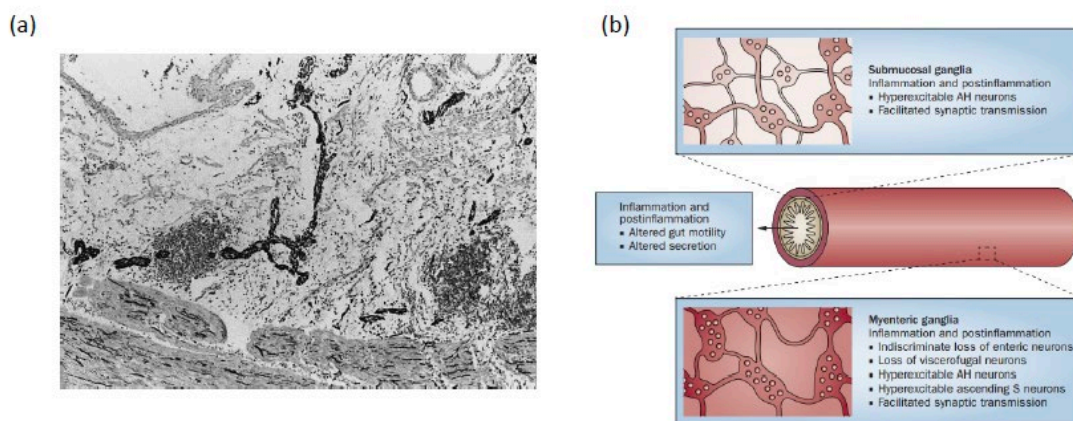


Figure 7. Modifications du SNE observées dans la MC. (a) Iléon d'un cas de patient ayant une MC montrant une hypertrophie nerveuse associée à une inflammation de la sous-muqueuse. Immunomarquage neurofilaments pour détecter les neurones (fibres foncées) (Geboes and Collins, 1998) ; (b) Modification des neurones entériques suite à une inflammation intestinale, avec modifications fonctionnelles et morphologiques des neurones entériques (Brierley and Linden, 2014)

3. Les cellules entéroendocrines

Les CEE sont des acteurs clés de l'axe intestin-cerveau (Cryan et al. 2019; Ye et al. 2021), non seulement par leurs propriétés endocrines, mais aussi paracrines, en interagissant avec le système immunitaire et le SNE (Sternini, Anselmi, et Rozengurt 2008; Bohórquez et al. 2015; Larraufie et al. 2018; Gribble et Reimann 2019; Eissa et al. 2018). Les CEE jouent donc un rôle

important dans l'immunité muqueuse, le maintien de la fonctionnalité de la barrière intestinale, et la motilité gastro-intestinale (Gribble et Reimann 2019; Ye et al. 2021; Yu et al. 2020). Dans ce chapitre, nous décrivons tout d'abord les propriétés classiques endocrines de CEE, puis nous abordons un aspect plus récent concernant les propriétés neuronales des CEE.

3.1 Fonctions endocrines des CEE

Les CEE sont dispersées le long de la muqueuse gastro-intestinale, dans les cryptes et les villosités, et sont peu abondantes, ne représentant que 1 % des cellules de l'épithélium intestinal (Sternini, Anselmi, et Rozengurt 2008; Gribble et Reimann 2019). L'action des CEE est principalement liée à la sécrétion d'hormones et, malgré leur dispersion, les CEE représentent un des plus grand systèmes endocriniens du corps humain (Furness et al. 2013; Sternini, Anselmi, et Rozengurt 2008; Gribble et Reimann 2019; Yu et al. 2020). Cette production paracrine, ou endocrine, se fait en réponse à divers stimuli présents dans la lumière digestive, comme les glucides, lipides et les acides gras à chaîne courte (Gribble et Reimann 2019; Furness et al. 2013; Larrauffie et al. 2018). Ces derniers sont particulièrement intéressants puisqu'ils sont produits par certaines bactéries du microbiote intestinal (après fermentation de glucides complexes), et qu'ils sont un des composants humoraux important de l'axe intestin-cerveau (van der Hee et Wells 2021). Les surfaces apicales de la plupart des CEE sont exposées à la lumière intestinale, ce qui leur permet de détecter directement le contenu luminal ingéré, alors que la partie baso-latérale des CEE est responsable de la libération d'hormones (Figure 8). Toutefois, certaines CEE ne sont pas directement en contact avec la lumière intestinale et résident près de la lame basale (Sternini, Anselmi, et Rozengurt 2008; Höfer et Drenckhahn 1999). Ces différents types morphologiques, classés respectivement en "ouverts" ou "fermés", ont traditionnellement été considérés comme reflétant des rôles cellulaires distincts (Yu et al. 2020; Gribble et Reimann 2019). Cependant, la transition entre les différents types cellulaires de CEE reste, à ce jour, peu étudiée (Yu et al. 2020).

Les CEE sont classiquement catégorisées en fonction des hormones qu'elles secrètent (Tableau I) (Gribble et Reimann 2019; Yu et al. 2020). Plus précisément, les CEE sont capables de sécréter plus de 15 hormones différentes (Gribble et Reimann 2019; Yu et al. 2020), comme la chromogranine, la sérotonine, la somatostatine, le neuropeptide, le VIP, la SP, la cholécystokinine (CKK), le peptide glucagon-like (GLP)-1/2 et la ghreline. Comme cela a été précisé précédemment, les CEE représentent la plus grande population de cellules endocrines du corps humain et, à titre d'exemple, elles sont responsable de plus de 95% de la sécrétion de

sérotonine dans le corps humain (Mawe et Hoffman 2013). Par ailleurs, fait intéressant, une des hormones produites par les CEE, la chromogranine A, est un des principaux facteur associé à la composition du microbiote intestinal, renforçant le rôle clef des CEE dans l'axe intestin/cerveau (Falony et al. 2016; Zhernakova et al. 2016).

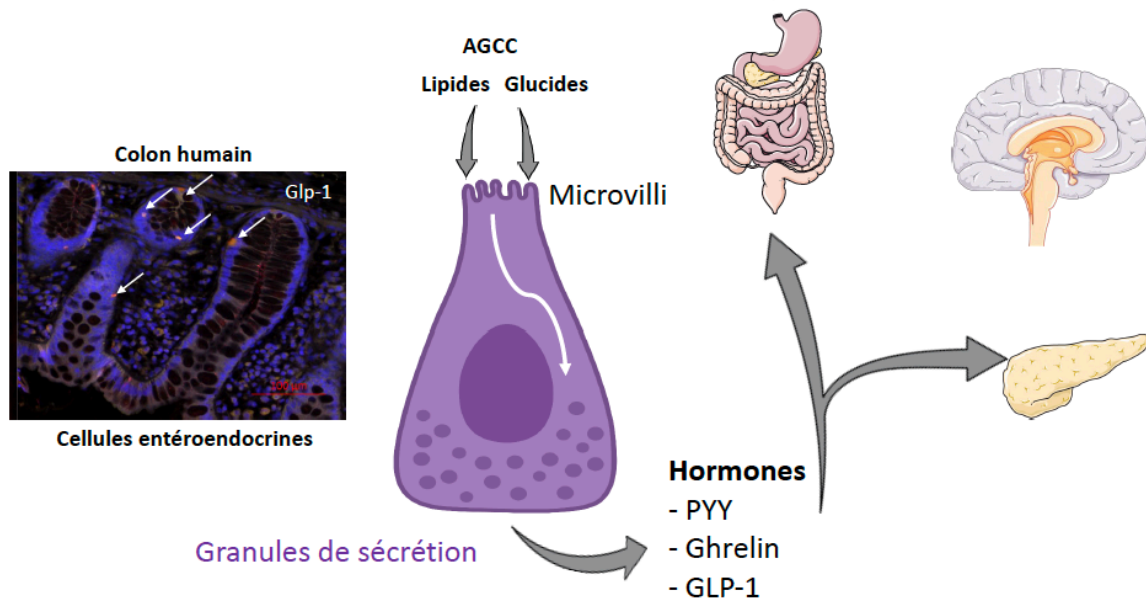


Figure 8. Propriétés générales des CEE. A gauche, coupe de colon humain marquée par un anticorps anti-GLP1 montrant les CEE dispersés dans l'épithélium (image du laboratoire en collaboration avec Gwenola Le Dréan, PhAN INRAE). A droite, interaction avec les composés de la lumière intestinale à leur pole apical (lipides, glucides, acides gras à chaine courte) entrainant une libération d'hormones avec effet endocrine ou paracrine.

Types cellulaires	Principales hormones secrétées	Fonctions digestives
Cellules A	Ghréline, Nestafine-1	Contrôle de l'appétit, relargage de l'hormone de croissance
Cellules G	Gastrine	Acidité et motilité digestive
Cellules D	Somatostatine	Sécrétion hormonale, motilité digestive, immunité muqueuse
Cellules L	GLP-1, GLP-2, PYY	Contrôle de l'appétit, motilité digestive, homéostasie énergétique
Cellules K	GIP	Sécrétion d'insuline
Cellules I	CCK	Contrôle appétit, motilité digestive, sécrétion acide biliaries, immunité muqueuse
Cellules enterochromafines	5-HT	Contrôle appétit, motricité et sécrétion digestive, immunité muqueuse
Cellules N	Neurotensine	Motilité digestive et immunité muqueuse
Cellules M	Motilines	Motilité digestive
Cellules S	Secretine	Acidité et homéostasie énergétique
Cellules Enterochromaffines like	Histamine	Acidité et immunité muqueuse
Cellules P	Leptine	Contrôle de l'appétit, absorption de nutriments, immunité muqueuse

Tableau 1 : principaux sous-types de cellules entero-endocrines (Yu et al. 2020)

La dispersion des CEE dans l'épithélium intestinal rend leur étude délicate. Historiquement, la fonction des CEE a été étudiée, indirectement, *in vivo*, en mesurant les

niveaux d'hormones dans le sang, suite à une stimulation lumineuse, par des nutriments (Goldspink, Reimann, et Gribble 2018). Cependant, de nombreuses hormones gastro-intestinales ont une demi-vie très courte, et les niveaux périphériques d'hormones plasmatiques ne reflètent donc pas forcément la fonction réelle des CEE (Kieffer, McIntosh, et Pederson 1995; Ye et al. 2021; Druce et al. 2009). Plusieurs lignées cellulaires ont donc été caractérisées, et sont utilisées pour étudier les CEE, en particulier en analysant leur libération d'hormones ainsi que les flux calciques. Les caractéristiques de ces lignées, ainsi que les limites de leurs utilisations, sont résumées dans le tableau II. A noter par ailleurs que, au-delà des limites propres à chaque lignée, il faut avoir en tête que ce type d'approche ne permet pas de modéliser la complexité de l'effet de stimuli alimentaires ou microbiotiques, sur la fonction des CEE, car elle ne reproduit pas parfaitement la complexité de l'environnement *in vivo*, qui implique des signaux provenant de cellules voisines, telles que les entérocytes, les vaisseaux sanguins, et les cellules immunitaires. Par ailleurs, la fonction des CEE peut aussi être étudiée *in vitro* grâce à des modèles de culture de cellules et d'organoïdes, en utilisant, par exemple, des enregistrements cellulaires électrophysiologiques, et des techniques d'imagerie calcique basées sur la fluorescence (Kaelberer et al. 2018; Reimann et al. 2008). Peu d'études ont réussi à étudier les CEE *in vivo*. A noter cependant l'étude de Ye et al. (Ye et al. 2021.) qui suggère une modulation des CEE induite par un repas riche en matières grasses, ou par la présence de microbiote intestinal, notamment par certaines bactéries (comme les bactéries du taxon *Acinetobacter*). Cette modulation de la sécrétion hormonale des CEE, par le microbiote, a également été mise en évidence sur modèle murin et zebrafish (Ye et al. 2021). Cependant, les mécanismes d'interaction entre CEE, et contenu de la lumière intestinale (dont le microbiote), ne sont pas encore complètement décrits (Gribble et Reimann 2019; Ye et al. 2021; Yu et al. 2020).

Lignée	Origine	Limites	Hormones/peptides
STC-1	Souris, Tumeur digestive	Peu transfectable Variabilité de réponse endocrinienne	PYY GLP-1, Neurotensine
NCI-H716	Homme, Adénocarcinome colon, ascite	Non adhérentes	GLP-1
GLUtag	Souris Tumeur colique	Réponse variable AGCC	GLP-1 CCK

Tableau II. Principales caractéristiques des 3 lignées de CEE couramment utilisées. AGCC : acides gras à chaîne courte ; CCK : cholécystokinine ; GLP-1 : glucagon-like peptide 1.

3.2 Propriétés neuronales des CEE

Des travaux récents suggèrent qu'en plus d'avoir un phénotype endocrinien, les CEE ont aussi un phénotype neuronal. Les premiers articles sur le sujet ont été publiés par l'équipe de Roger Liddle (Bohórquez et al. 2015; Yu et al. 2020). Ce groupe de recherche a montré que les CEE avaient des longs processus basaux, en forme de pseudopodes, appelés "neuropodes", ressemblant à des prolongements neuronaux, et que l'extrémité terminale de ces processus pourrait ressembler à une synapse, capable de créer une interface avec les neurones intestinaux et les cellules épithéliales (Bohórquez et al. 2015; Yu et al. 2020) (Figure 9). Plus précisément, les neuropodes des CEE présentent des caractéristiques semblables à celles des axones (présence de neurofilaments) et semblent, en plus, participer au mécanisme de sécrétion hormonal (Bohórquez et al. 2015; Yu et al. 2020). À noter que ces filaments ont aussi été mis en évidence dans certaines cellules en brosse de l'épithélium gastrique, un type de cellule épithéliale sensorielle, mais que leur fonction dans ces cellules reste à définir (Luciano, Groos, et Reale 2003). Par ailleurs, il faut noter que, dans les neurones, la quantité de neurofilaments détermine le calibre des axones, et que les souris porteuses d'une mutation dans le gène codant pour ces neurofilaments ont une diminution de diamètre axonal (Elder et al. 1998). De plus, étant donné que le diamètre des axones est proportionnel à la vitesse de conduction des influx électriques (Sakaguchi et al. 1993), il est possible que la quantité de neurofilaments, dans les CEE, puissent influencer le diamètre de leurs neuropodes, et la propagation des potentiels d'action. D'ailleurs, il a été démontré que l'activation de CEE de l'intestin grêle et du côlon, à leur pôle apical, pouvait déclencher une activité électrique, qui se propageait à leur pôle basal, et aboutissait à une sécrétion hormonale (Rogers et al. 2011). Plus récemment, il a été montré que la libération de 5-HT par les cellules entéro-endocrines pouvait stimuler les neurones afférents primaires intrinsèques du SNE, lesquels activent, par la suite, les neurones secondaires, assurant la régulation de la motilité intestinale (Yu et al. 2020). Cela renforce le rationnel en faveur d'un circuit neuronal et épithélial impliquant les CEE et le SNE (Yu et al. 2020). Outre cet aspect morphologique, l'existence d'un phénotype neuronal est renforcée par le fait que les CEE peuvent aussi exprimer des protéines neuronales pré et postsynaptiques (synapsine 1 et PSD-95 par exemple) (Bohórquez et al. 2015) et qu'elles font synapse avec des neurones vagues par une signalisation glutamatergique pour transduire des stimuli sensoriels (sucres et acides gras) en millisecondes (Kaelberer et al. 2018).

Finalement, pour certains auteurs, le terme « Cellules Entero Endocrines », qui rappelle les actions endocriniennes des CEE, ne reflète ni leurs propriétés neurosensorielles, ni leur capacité à former des neuropodes et des synapses, au sein d'un authentique circuit

neuroépithélial (Kaelberer et al. 2018). Les CEE ont d'ailleurs été renommées « Cellules Neuropodes » par ces auteurs (Kaelberer et al. 2018).

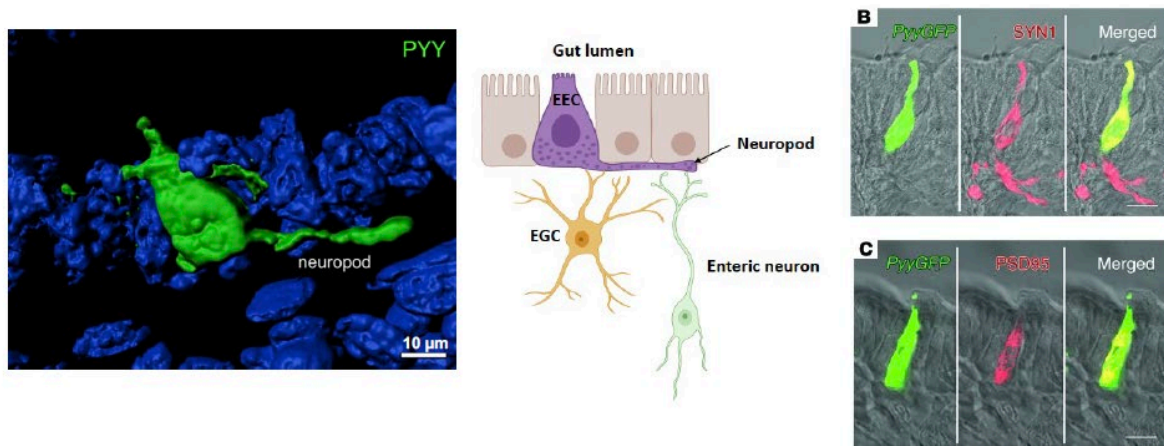


Figure 9. Propriétés neuronales des CEE. A gauche, l'existence de longs processus basaux, en forme de pseudopodes, appelés « neuropodes » font contact avec les neurones entériques et vagues. A droite, dans le colon de souris, les CEE expriment le marqueur présynaptique synapsine 1 (SYN1) et postsynaptique PSD95. Barre d'échelle : 10 μ m. D'après Bohórquez 2015 (Bohórquez et al. 2015).

4. Atteinte du tube digestif dans les protéinopathies du SNC

Nous l'avons vu en préambule, la Maladie de Parkinson (MP) est une maladie neurodégénérative prototypique de l'atteinte de l'axe-intestin. Dans ce chapitre, nous abordons cet aspect plus en détail, puis nous nous intéressons à deux autres protéinopathies particulièrement fréquentes, les tauopathies et les amyloïdopathie.

4.1 Tube digestif et synucléinopathie

Il est désormais bien établi que la MP n'est pas seulement une maladie du cerveau et de la substance noire, mais qu'elle est aussi une maladie digestive et du SNE (Braak et al. 2003; de Guilhem de Lataillade et al. 2020). Il est même envisageable d'évoquer une authentique synucléinopathie entérique dans le cadre de la MP, à partir des données suivantes (Figure 10) : (i) des lésions neuropathologiques typiques de la MP (dépôts d'alpha-synucléine évocateurs de corps de Lewy) sont observés dans les neurones entériques chez la quasi-totalité des sujets parkinsoniens dans les études autopsiques (Beach et al. 2010; 2021; Gelpi et al. 2014) (ii) les troubles de la motricité digestive (gastroparésie et constipation en particulier) sont particulièrement fréquents au cours de la maladie (Knudsen et al. 2017) (iii) l'alpha-synucléine

pathologique observée dans le tube digestif des sujets parkinsoniens est agrégée, hyperphosphorylée et tronquée, correspondant à des caractéristiques biochimiques en tout point identiques à celles observées dans le SNC (revue dans (de Guilhem de Lataillade et al. 2020)).

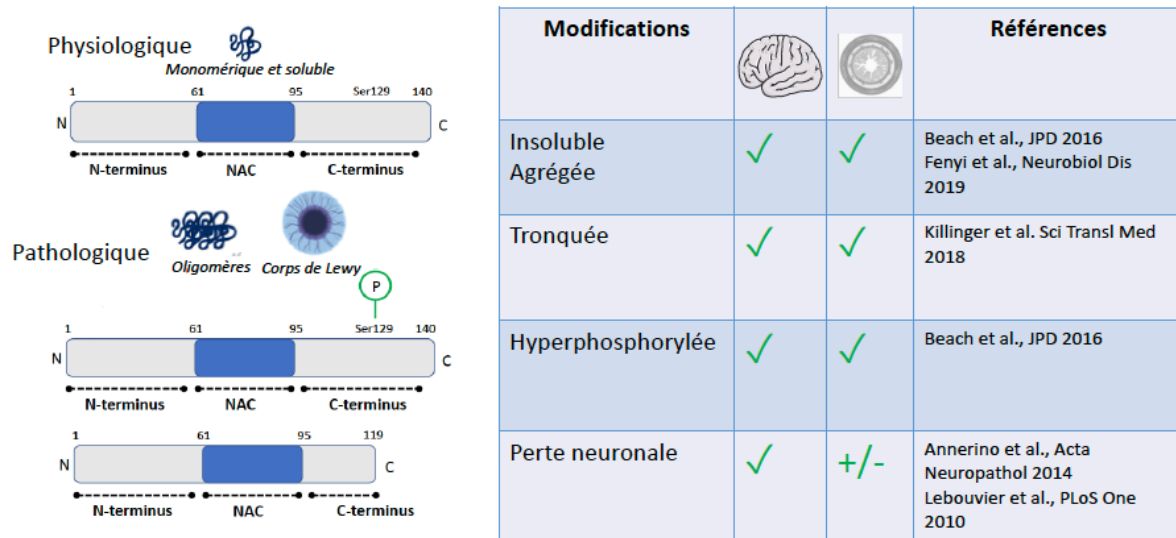


Figure 10. Comparaison de l'atteinte du SNC et du SNE au cours de la MP. En condition physiologique, l'alpha-synucléine est monomérique et soluble. Dans les corps de Lewy du SNC, elle est agrégée, hyperphosphorylée et tronquée. Les mêmes anomalies sont observées dans les lésions du SNE au cours de la MP. On notera toutefois l'absence de perte neuronale identifiée dans le SNE.

Il convient toutefois de souligner que, malgré les éléments listés précédemment, il n'y a pas d'études disponibles montrant l'existence d'une perte neuronale dans le tube digestif des sujets parkinsoniens. En effet, dans la substance noire cérébrale des patients atteints de MP, la présence d'agrégats d'alpha-synucléine s'accompagne d'une perte neuronale sévère, et les résultats clinico-pathologiques suggèrent fortement que les symptômes moteurs classiques de la maladie de Parkinson, tels que la bradykinésie et l'hypertonie, sont plus en rapport avec cette perte neuronale, qu'avec les dépôts d'alpha-synucléine (Greffard et al. 2006). Or, cela n'a pas été mis en évidence dans l'étude *post-mortem* la plus complète à ce jour, dans laquelle il n'y avait aucune différence de densité totale des neurones myentériques entre les témoins et les patients ayant une MP (Annerino et al. 2012). De plus, deux études complémentaires, et indépendantes (Lebouvier et al. 2010; Giancola et al. 2017), incluant des analyses immunohistochimiques de biopsies coliques de 58 patients ayant une maladie de Parkinson, et 30 cas témoins, ne trouvait aucune diminution majeure de la densité neuronale dans la MP. Ces données, bien que préliminaires, suggèrent que la perte neuronale entérique n'est pas une

caractéristique de la MP, même si ce résultat est limité par la difficulté de la quantification du nombre de neurones sous-muqueux, principalement en raison de l'architecture des plexus du SNE (Knowles et al. 2013; De Giorgio et al. 2016),

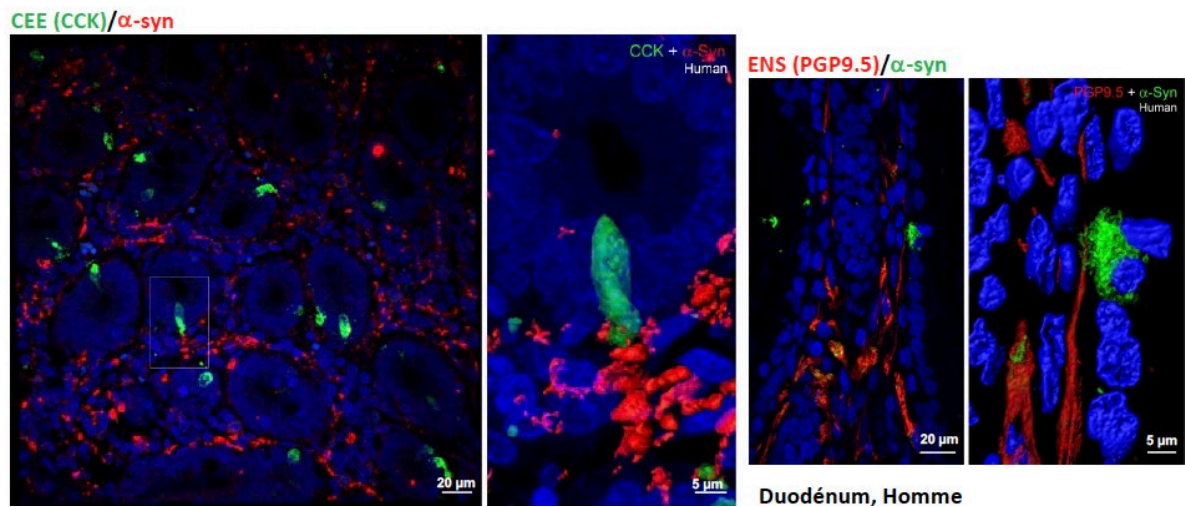


Figure 11. Expression de l'alpha-synucléine dans les CEE. A gauche, duodénum humain, sujet sans pathologie neurologique, immunomarquage CCK (cholécystokinine) en vert, d'une CEE. En rouge, marquage alpha-synucléine. A droite, les fibres nerveuses sont immunomarquées avec un anticorps anti-PGP9.5 (rouge) et une CEE ainsi que des fibres nerveuses sont aussi marquées par l'alpha-synucléine (vert). Ces données montrent que les CEE qui expriment l'alpha-synucléine font contact avec des neurones positifs pour l'alpha-synucléine. D'après Chandra et al (Chandra et al. 2017)

Plus récemment, un rôle des CEE a été envisagé dans la MP. Nous l'avons vu, les CEE ont non seulement un phénotype endocrinien mais aussi neuronal. Cela a logiquement conduit plusieurs équipes à étudier si les CEE exprimaient l'alpha-synucléine, avec comme hypothèse de recherche qu'elles pourraient initier le processus pathologique dans la MP, après contact avec un pathogène présent dans la lumière digestive. C'est en effet le cas, puisque l'alpha-synucléine est exprimée par les CEE, dans le duodénum et le colon humain, chez des sujets témoins, ainsi que chez la souris (Chandra et al. 2017; Casini et al. 2021) (Figure 11). Des données complémentaires, obtenues chez la souris, ont par ailleurs permis de montrer que les CEE immunoréactives pour l'alpha-synucléine étaient en contact avec des neurones entériques, eux aussi positifs pour l'alpha-synucléine (Chandra et al. 2017). Les principales lignées cellulaires utilisées pour l'étude des CEE, comme la lignée STC-1, expriment aussi l'alpha-synucléine. Enfin, deux travaux récents ont montré que le milieu conditionné avec la bactérie intestinale, *Akkermansia muciniphila*, et avec des acides gras à chaîne courte, augmentaient le niveau d'expression de l'alpha-synucléine dans la lignée STC-1 (Rodrigues et al. 2022; Hurley et al. 2023). Toutefois, bien que ces données soient intéressantes, il convient de noter qu'à notre

connaissance, il n'y a pas d'études neuropathologiques disponibles sur la présence d'alpha-synucléine pathologique dans le tube digestif dans la MP.

4.2 Tube digestif et tauopathie

Rappel sur les tauopathie du SNC

Les maladies caractérisées par une accumulation anormale de tau, appelées tauopathies, regroupent plus de vingt pathologies (Tableau III). Ces tauopathies peuvent être classées selon deux grands mécanismes d'apparition, en tauopathies primaires, où tau semble être le principal facteur impliqué dans le processus neurodégénératif, et en tauopathies secondaires, qui sont associées à d'autres pathologies comme les pathologies ischémiques et post-traumatiques (Arendt, Stieler, et Holzer 2016). Du point de vue neuropathologique, trois groupes de tauopathies sont décrits (Clavaguera, Duyckaerts, et Haïk 2020), en fonction du type d'isoformes pathologiques de la protéine tau présentes dans le SNC: les tauopathies 3R et 4R, les tauopathies 3R, et les tauopathies 4R (Tableau III).

Tauopathie avec présence de tau 3R et 4R	Tauopathie 4R	Tauopathie 3R
Maladie d'Alzheimer	Maladie à grains argyrophiles	Mutation MAPT (comme G272V, Q336R)
Sclérose Latérale Amyotrophique	Dégénérescence CorticoBasale	Dégénérescence Fronto Temporale
Tauopathie avec anticorps Anti-IgLON5	Parkinsonisme atypique de Guadeloupe	
Encephalopathie traumatique chronique	Tauopathie avec atteinte gliale globulaire	
Dégénérescence neurofibrillaire diffuse avec calcifications	Mutation MAPT (P301L)	
Trisomie 21	Paralysie Supra Nucléaire Progressive	
Démence familiale Anglaise	Parkinsonisme avec atteinte SLC9a	
Démence familiale Danoise	Tauopathie avec astrogliecytose	
Maladie de Gestmann-Straussler-Scheinker		
Mutation MAPT (V337M, 5406W)		
Dystrophie myotonique		
Maladie de Pick de type C		
Parkinsonisme post encéphalopathie		
Ataxie progressive		
Démence avec Dégénérescence neurofibrillaire isolée		

Tableau III : les différentes tauopathies adapté de Clavaguera, Duyckaerts et Haïk (Clavaguera, Duyckaerts, et Haïk 2020)

Plus récemment, la recherche a permis de mettre en évidence qu'en plus de la répartition de ces différentes isoformes, différentes morphologies d'inclusions pathologiques de tau dans les neurones pourraient caractériser différentes tauopathies (Taniguchi-Watanabe et al. 2016; Sexton et al. 2022; Shi et al. 2021). Par exemple, bien que l'accumulation de tau 4R soit constaté à la fois dans la Paralysie Supranucléaire Progressive (PSP), la Dégénérescence CorticoBasale (DCB) et la Maladie des Grains Argyrophiles (MGA), la DCB se caractérise par la formation

de "plaques astrocytaires" (filaments de tau 4R disposés en couronne dans les astrocytes), la PSP par la présence "d'astrocytes en touffes" (de longs et minces processus dans les astrocytes) et la MGA, par des inclusions granulaires argyrophiles dans les dendrites neuronales (Taniguchi-Watanabe et al. 2016; Shi et al. 2021).

L'apparition de la pathologie tau, dans différentes régions du cerveau, a été montrée comme se produisant de manière spécifique et stéréotypée dans plusieurs tauopathies, et a été attribuée à la vulnérabilité ou à la susceptibilité de différentes régions du cerveau à un processus de maladie particulier (Dm et Dj 2016). En plus de cette théorie de vulnérabilité régionale, certaines études, plus récentes, ont suggéré que la propagation de la tauopathie pourrait se produire de manière semblable à un prion, où des formes de tau pathologiques pouvaient être transférées des cellules donneuses à cellules receveuses (Clavaguera, Duyckaerts, et Haïk 2020; Mudher et al. 2017). Cependant, bien qu'un nombre croissant d'études soutiennent cette hypothèse de propagation « prion-like », plusieurs étapes de ce processus restent encore à préciser, et le rôle d'une éventuelle tauopathie entérique, dans l'apparition d'une maladie du SNC n'a pas été montré (Mudher et al. 2017; Sexton et al. 2022).

Généralités sur la protéine tau.

Dans le SNC, 6 isoformes différentes de tau sont décrites, après épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 du gène MAPT (Goedert et al. 1989) (Figure 1). Plus précisément, l'épissage alternatif des exons 2 et 3 du gène MAPT (exons N-terminaux 2 et 3) est responsable d'une modification de longueur de tau, *i.e.* soit l'ajout d'une séquence de 29 acides aminés (1N), soit l'ajout d'une séquence de 58 acides aminés (2N), soit l'absence d'ajout d'acides aminés supplémentaires (0N). Dans le compartiment de liaison aux microtubules, l'inclusion ou l'exclusion de l'exon 10 donne lieu à des isoformes comportant soit quatre domaines de liaison aux microtubules répétés (4R), soit trois domaines de liaison aux microtubules (3R). Finalement, les six isoformes de tau sont nommées par l'absence/présence de 1 à 2 domaines N terminaux, et par la répétition de 3 à 4 régions dans le domaine de liaison au microtubule : 0N3R, 0N4R, 1N3R, 1N4R, 2N3R et 2N4R (Figure 12). La longueur de la séquence des isoformes de tau varie donc entre 352 et 441 acides aminés, correspondant à un poids moléculaire entre 45 et 65 kDa, après migration par électrophorèse sur gel d'acrylamide (Drubin, Caput, et Kirschner 1984; Himmler et al. 1989).

Du point de vue fonctionnel, chaque isoforme de tau comprend 4 domaines principaux (la numérotation ci-après fait référence à l'isoforme humaine la plus longue de tau de 441 acides

aminés) (i) un domaine N-terminal (acides aminés 1 à 150) qui, bien qu'il ne se lie pas directement aux microtubules, joue un rôle dans leur espacement (J. Chen et al. 1992), (ii) un domaine riche en proline (acides aminés 151 à 243), qui participe à la signalisation cellulaire et aux interactions avec les autres protéines, en particulier celles contenant des domaines SH3 (comme les protéines kinases de la famille Src ou la sous-unité régulatrice de la phosphatidylinositol 3-kinase) (Reynolds et al. 2008), (iii) un domaine de liaison des microtubules (acides aminés 244 à 369), qui se compose de quatre motifs avec leurs régions flanquantes, par lesquelles tau lie et stabilise les microtubules (Mukrasch et al. 2007) et (iv) un domaine C-terminal (acides aminés 370 à 441), dont les rôles sont moins bien connus, mais qui pourrait influencer le niveau de phosphorylation de la protéine tau (Connell et al. 2001).

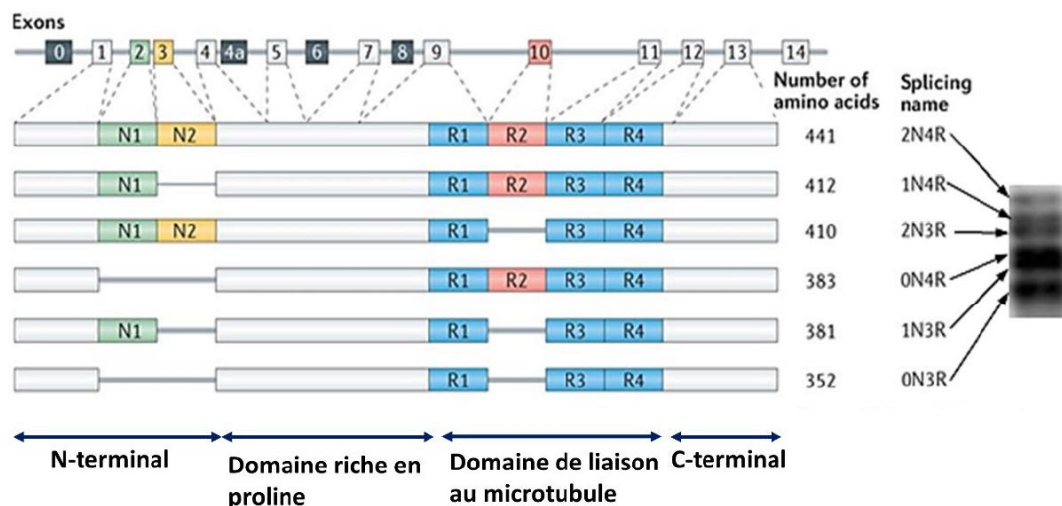


Figure 12. Épissage alternatif et domaines protéiques de Tau dans le SNC humain. Six isoformes de tau sont générées dans le SNC humain par épissage alternatif du gène MAPT. Les séquences d'acides aminés codées par les exons 2 et 3 dans la région N-terminale sont soit exclues (0N), soit incluses de manière différentielle, donnant lieu à des isoformes tau 1N (exon 2) ou 2N (exons 2 et 3). L'épissage alternatif de l'exon 10 dans le domaine de liaison des microtubules aboutit à la production des isoformes 3R ou 4R. La région centrale de tau comprend le domaine riche en proline. La région C-terminale est commune aux six isoformes tau du SNC humain. La migration sur gel de polyacrylamide des protéines recombinantes (6 isoformes) est montrée. Adapté de Wang et Mandelkow, 2016 (Wang et Mandelkow 2016)

La protéine tau a initialement été décrite comme une protéine intracellulaire et neuronale (Weingarten et al. 1975). En effet, dans les neurones, tau est principalement présente dans le compartiment axonal (Binder, Frankfurter, et Rebhun 1985) et, à un moindre degré, dans les compartiments somato-dendritiques (Kanaan et Grabinski 2021) et le noyau (Sultan et al. 2011; Violet et al. 2014). La localisation cellulaire variables des isoformes de tau dans les neurones pourrait refléter différentes fonctions physiologiques (Sotiropoulos et al. 2017). Ainsi,

l'isoforme 0N est fortement exprimée dans les corps cellulaires et les axones, l'isoforme 1N est fortement localisée dans le noyau, détectable dans les corps cellulaires et les dendrites, mais absente des axones, et l'isoforme 2N est fortement exprimée dans les axones et les corps cellulaires, et détectable dans les dendrites (Ittner et al. 2010).

L'expression des isoformes de tau dans le cerveau humain est régulée. En effet, alors que les six isoformes de la protéine sont présentes dans le SNC humain d'un adulte, chez le fœtus, seule l'isoforme 0N3R, la plus courte, est exprimée (Goedert, Neuron 1989). Par ailleurs, chez l'adulte, les isoformes 1N sont plus volontiers représentées (près de 60% des isoformes), et les isoformes 3R et 4R sont exprimées en quantité égale (Goedert et Jakes 1990). A noter que la répartition des isoformes peut varier seule les espèces. Par exemple, chez la souris adulte, les isoformes présentes dans le SNC ne sont quasiment que des isoformes 4R, et les isoformes 3R ne sont présentes que transitoirement, jusqu'à l'âge de 2 mois (Bullmann et al. 2010).

Même si la protéine tau est très majoritairement exprimée par les neurones, elle peut aussi être exprimée, en plus faible quantité, dans les cellules gliales (Papasozomenos et Binder 1987), que ce soit dans les astrocytes (Shin et al. 1991) ou les oligodendrocytes (LoPresti et al. 1995). Par ailleurs, il faut noter la présence d'une isoforme de tau, appelée « big tau », dans certains neurones des systèmes nerveux périphériques (Goedert, Spillantini, et Crowther 1992; Fischer 2023). Cette isoforme est appelée « big tau » car elle contient un domaine supplémentaire d'environ 250 acides aminés, faisant 110 kDa (Fischer 2023; Fischer et Baas 2020) (Figure 13). Cette isoforme est principalement décrite dans les neurones des ganglions vertébraux sympathiques, et dans les ganglions rachidiens, et peut co-exister avec les formes de plus bas poids moléculaire de la protéine (Georgieff et al. 1993).

En dehors des neurones du SNC et des systèmes nerveux périphériques, la protéine tau a également été décrite dans d'autres tissus et/ou types cellulaires comme les fibroblastes (Matsuyama et Bondareff 1994), le pancréas (Miklossy et al. 2010), le cœur (Gu, Oyama, et Ihara 1996), les poumons (Gu, Oyama, et Ihara 1996), les muscles squelettiques (Gu, Oyama, et Ihara 1996), ou encore les testicules (Gu, Oyama, et Ihara 1996). Par ailleurs, bien qu'initialement décrite comme purement intracellulaire et neuronale, plusieurs études indépendantes ont montré que la protéine tau pouvait être sécrétée en condition physiologique (Pooler et al. 2013) et ce, en l'absence de mort cellulaire (Dujardin et al. 2014; Takeda et al. 2015; Yipeng Wang et al. 2017). Par la suite, d'autres études ont mis en évidence que tau pouvait être absorbées et sécrété par les neurones via son interaction avec le récepteur LRP1

(*low-density Lipoprotein Receptor-related Protein 1*), à la surface de ces cellules neuronales (Rauch et al. 2020). Ces aspects cellulaires expliqueraient la diffusion prion-like de tau.

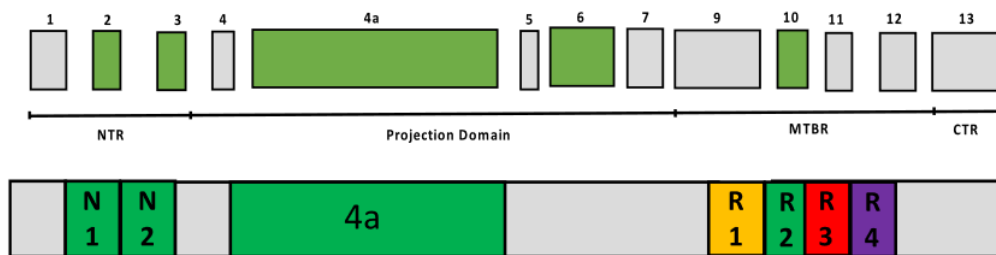


Figure 13 : La structure exonique de Big tau, avec (i) une région N-terminale (NTR), qui comprend les exons 2 et 3 (N1, N2) pouvant subir un épissage alternatif (ii) le domaine de projection, qui comprend les exons 4, 5, et, spécifiquement pour Big tau, la transcription de l'exon 4a de grande taille, (iii) les quatre domaines de liaison aux microtubules (MTBD), qui comprennent les exons 9 à 12, l'exon 10 étant soumis à un épissage alternatif, et (iv) la région C-terminale (CTR) de l'exon 13, d'après Fischer et al (Fischer et al. 2023; Fischer et Baas 2020).

Fonctions de la protéine tau

Principalement de localisation neuronale et axonale, tau joue un rôle important dans la promotion de la polymérisation, de l'assemblage et de la stabilité des microtubules, qui sont essentiels au transport axonal ainsi qu'au maintien de l'intégrité structurelle des neurones (Yipeng Wang et Mandelkow 2016; Weingarten et al. 1975; Sotiropoulos et al. 2017; Binder, Frankfurter, et Rebhun 1985; Kadavath et al. 2015; Kellogg et al. 2018). A noter que le fait que tau soit principalement reconnue en tant que protéine de liaison aux microtubules, a concentré les efforts de recherche sur sa fonction axonale de stabilisation des microtubules (Figure 14). Cependant, ces dernières années, d'autres fonctions biologiques potentielles ont été attribuées à la protéine tau (Sexton et al. 2022; Sotiropoulos et al. 2017). Par exemple, la protéine tau est présente dans le noyau, où elle pourrait protéger l'ADN contre les dommages induits par la peroxydation (Sjöberg et al. 2006; Maina et al. 2018; Mansuroglu et al. 2016). De plus, dans le cytoplasme, il a été montré que tau pouvait également affecter l'architecture du corps cellulaire, en agissant sur le cytosquelette d'actine, et sur la dynamique des microtubules (Sexton et al. 2022). Enfin, de nombreuses autres fonctions physiologiques de tau sont actuellement à l'étude, notamment ses rôles dans la modulation de la signalisation de l'insuline (Marciniak et al. 2017), la régulation de la myélinisation (Sotiropoulos et al. 2017; LoPresti et al. 1995; Lopes et al. 2016), et la régulation de l'apprentissage, de la mémoire et de la plasticité synaptique (Biundo et al. 2018).

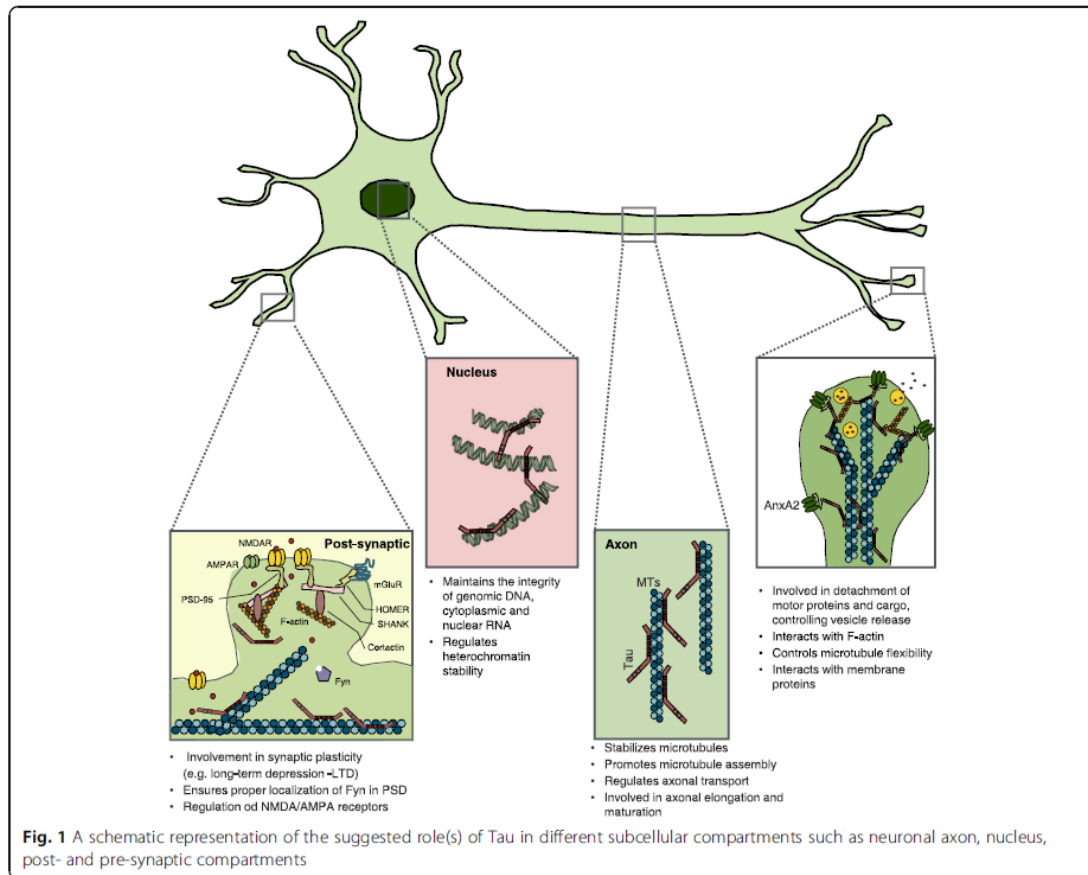


Figure 14 : localisation et fonction de la protéine tau dans les neurones : la localisation variable de tau est associée à différentes fonctions cellulaires, comme la protection de l'ADN contre les dommages, le maintien de l'architecture cellulaire, le transport axonal, et la plasticité synaptique (Sotiropoulos et al. 2017)

Modifications post-traductionnelles de la protéine tau

Que ce soit en condition physiologique ou pathologique, de très nombreuses modifications post-traductionnelles de tau ont été décrites, comme la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination et la troncation (Lindwall et Cole 1984; Wang et Mandelkow 2016; Spillantini et Goedert 2013).

La phosphorylation de tau est la modification post-traductionnelle qui a été, de loin, la plus étudiée. Tau contient 85 sites potentiels de phosphorylation, dont 45 résidus sérine, 35 thréonine et cinq résidus tyrosine (revue dans (Guo, Noble, et Hanger 2017) (Figure 15). L'ajout de groupements phosphates sur tau diminue son affinité pour la tubuline, comme cela a été montré en particulier pour les résidus sérine 262, 293, 324 et 356, qui sont chacun situés sur les 4 domaines de liaison aux microtubules (Drewes et al. 1995). Cette hyperphosphorylation peut favoriser le détachement de tau des microtubules, tau se retrouvant ainsi sous forme « libre » dans le cytosol. Ces formes libres de tau, hyperphosphorylées, peuvent s'agréger en filament hélicoïdaux (oligomère, polymère, fibrilles puis filaments) et, sont associées à l'apparition

d'une dysfonction neuronale, notamment axonale (Leroy et al. 2007), à l'origine du processus neurodégénératif neuronal, nommé Dégénérescences Neuro Fibrillaires (DNF) (Buée et al. 2000; Yipeng Wang et Mandelkow 2016; Brion et al. 2001).

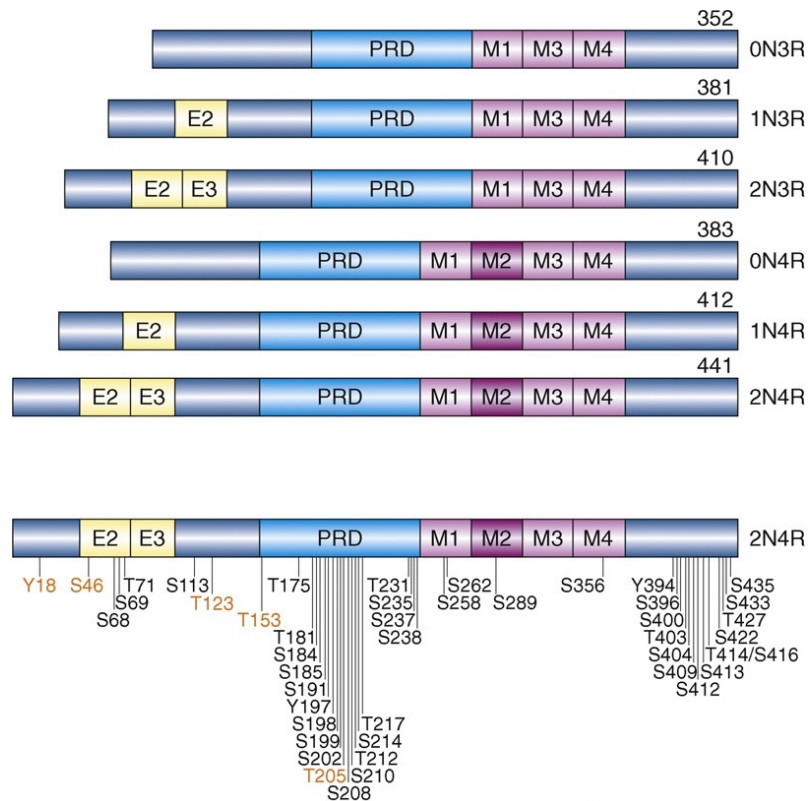


Figure 15. Principaux sites de phosphorylation de tau.

Les DNF sont des marqueurs neuropathologiques présents dans les cerveaux de patients atteints de plusieurs pathologies neurodégénératives. Elles sont constituées de protéine tau, associée aux microtubules, hautement phosphorylée, et agrégée, sous forme de filaments droits ou en hélice appariée (Goedert et al. 1989). Dans la Maladie d'Alzheimer, l'apparition des DNF dans le cerveau suit un schéma spatiotemporel prévisible, commençant, dans la majorité des cas, dans le cortex entorhinal. Ce schéma de diffusion de la tauopathie dans le cerveau des patients ayant une MA a été décrit pour la première fois par Braak en 1991, et sert d'ailleurs de base pour la classification de la pathologie tau dans la maladie d'Alzheimer, lors de l'examen post-mortem du cerveau (Braak et al. 2006). Plus précisément, les cerveaux de stade Braak I/II présentent une pathologie du tau limitée au cortex entorhinal, au thalamus et à la région CA1 de l'hippocampe ; au stade Braak III/IV, la pathologie se propage aux zones limbiques, et le dépôt de tau est présent dans l'amygdale, les ganglions de la base et la région CA4 de l'hippocampe ; au stade Braak V/VI, la pathologie est répandue dans l'hippocampe et est

présente dans le néocortex, et, au stade VI, pratiquement toutes les régions du cerveau sont touchées, à l'exception du cervelet (Braak et al. 2006). Fait intéressant, il a été mis en évidence que cette diffusion de la pathologie tau et des DNF dans le cerveau était plus en corrélation avec la gravité de la maladie que l'apparition et la diffusion des plaques de bêta-amyloïde, l'autre lésion neuropathologique décrite dans la MA (Duyckaerts et al. 1998; Giannakopoulos et al. 2003).

D'autres modifications post-traductionnelles de tau sont décrites, telles que l'acétylation, l'ubiquitination, et la troncation, et ont également été démontrées comme contribuant directement, ou indirectement, à des événements conduisant à la neurodégénérescence. Par exemple, des recherches examinant le rôle de l'ubiquitination dans la DCB, suggèrent que les modifications post-traductionnelles de tau pourraient jouer un rôle dans la diversité structurale de tau (Arakhamia et al. 2020). Généralement, comme pour la phosphorylation, les autres modifications post-traductionnelles de tau aboutissent à des protéines insolubles, tronquées, ou agrégées. Cela a été particulièrement étudié dans les tauopathies 4R (dépôts de tau d'isoforme 4R) telles que la PSP, la DCB et certains patient atteints de Dégénérescence Lobaire Fronto Temporale (DLFT) (Wray et al. 2008; Papegaey et al. 2016). En particulier, dans la PSP (Schmidt et al. 1996), une bande tronquée de tau de 35 kDa a été décrite (Wray et al. 2008), non reconnue par des anticorps spécifiques de l'extrémité amino-terminale ou de de tau 3R. Cela pourrait donc suggérer qu'il s'agisse d'un fragment tronqué en N-terminal de tau 4R (Wray et al. 2008). Par ailleurs, sur modèle murin, une faible expression de ce fragment tronqué induit une pathologie tau et l'apparition de DNF (Bondulich et al. 2016). A noter que la présence de formes tronquée de tau, a également été mis en évidence dans la MA, au sein des DNF, et que cela était aussi corrélé avec la progression de la maladie (Basurto-Islas et al. 2008).

Expression de la protéine tau dans le SNE

La première caractérisation de la protéine tau dans le SNE humain a été publiée en 1990 (Tam 1990). Une immunoréactivité tau était noté dans les plexus myentériques et sous-muqueux d'échantillons chirurgicaux d'intestin grêle et de côlon, provenant de six nourrissons et enfants. Des résultats comparables ont été observés dans l'intestin grêle du cochon d'Inde (Murofushi et al. 1989) et le long de l'ensemble du tractus gastro-intestinal de souris (Feng et al. 2018). Un travail collaboratif du laboratoire, publié en 2018, s'est intéressé de façon plus détaillée à la distribution de la protéine tau dans le SNE (Lionnet et al. 2018). Nous avons montré que les neurones du côlon humain adulte exprimaient principalement deux isoformes

de tau (0N4R et 1N3R), que ces isoformes étaient phosphorylées, en condition physiologique. Enfin, dans cette étude, et contrairement au SNC, tau ‘entérique’ était résistante à la déphosphorylation par la phosphatase lambda. Par ailleurs, des expériences complémentaires, réalisées sur culture primaire du SNE, ont montré que tau était aussi exprimée par les neurones entériques fœtaux de rat, et que sa phosphorylation pouvait être régulée (Lionnet et al. 2018).

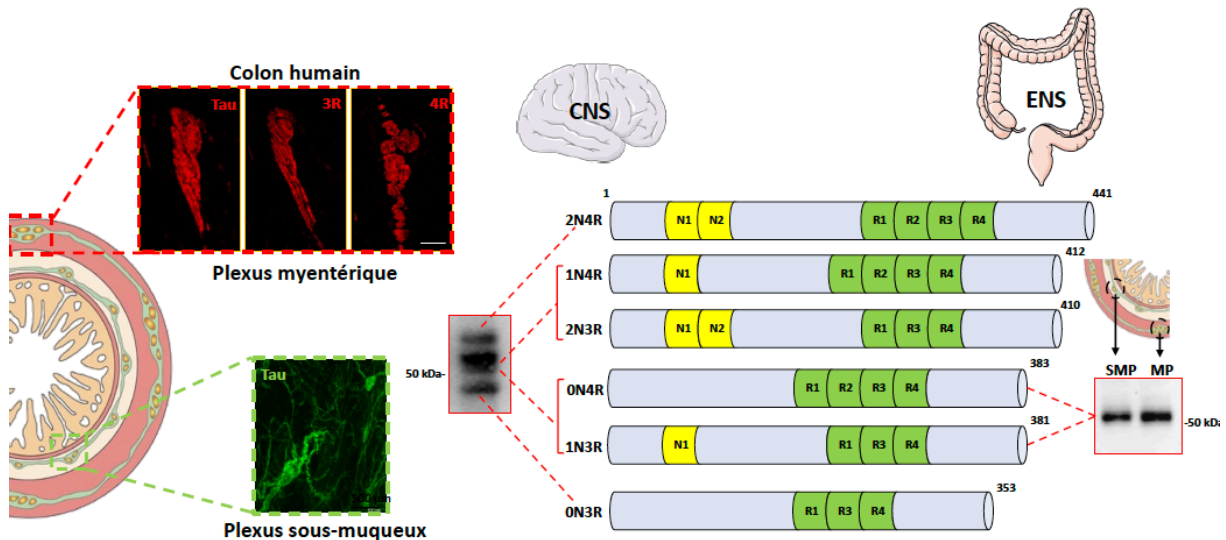


Figure 16. Expression de tau dans le SNE. A gauche, coupe transversale du côlon humain montrant les deux principaux plexus du SNE. Un anticorps tau total (Tau A0024) et des anticorps spécifiques des isoformes de tau 3R et 4R ont été utilisés pour détecter tau dans le plexus myentérique humain, barre d'échelle 50 µm. Le plexus sous-muqueux (sujet témoin) a été marqué à l'aide de l'anticorps tau total montrant l'architecture du plexus sous-muqueux caractérisée par des ganglions reliés entre eux via des fibres interganglionnaires. La barre d'échelle est de 500 µm. A droite, le profil d'expression des isoformes tau est différent entre le SNC et le SNE. L'anticorps tau total détecte une bande majeure migrant à 54 kDa dans les deux plexus correspondant à 1N3R et 0N4R et aux six isoformes tau dans le SNC (Lionnet et al., 2018).

Dans un contexte pathologique, la première étude sur tau dans le tube digestif de sujets avec MA a été publiée en 1993 (Shankle et al. 1993). Dans cette étude, des échantillons obtenus lors d'autopsies de l'ensemble du tractus digestif de 18 patients atteints de MA, 8 patients atteints de démence non-MA (dont 2 PSP), et 4 sujets témoins appariés en âge, ont été analysés par immunohistochimie, en utilisant l'anticorps Alz50, qui reconnaît une conformation anormale de tau (Carmel et al. 1996). Dans cette étude, résultat étonnamment, aucun marquage n'a été observé avec cet anticorps, que ce soit sur les témoins ou les sujets avec une tauopathie. Par la suite, il a fallu près de 20 ans avant que la présence éventuelle de formes pathologiques

de tau, dans le tube digestif, ne soit réexaminée. Une étude neuropathologique (confirmation du diagnostic après analyse du SNC) a été réalisée sur des sections de côlon sigmoïde de 26 patients atteints de PSP, 21 patients avec une MA, 3 patients atteints de DCB et 19 sujets témoins (Dugger et al. 2019; Dugger et al. 2016). L'analyse a été faite par immunohistochimie en utilisant des anticorps anti-tau total (HT7) et deux anticorps phosphospécifiques (AT8, qui reconnaît tau phosphorylée sur sérine 202/thréonine 205, et pT231) (Dugger et al. 2019; Dugger et al. 2016). Dans cette étude, et ce quel que soit l'anticorps utilisé, l'immunoréactivité la plus forte était observée dans le colon, principalement au niveau du plexus myentérique. Le marquage HT7 était observé dans la quasi-totalité des cas examinés (59/61), alors qu'une immunoréactivité pT231 et AT8 n'a été mise en évidence que chez 32 cas sur 59. Toutefois, point essentiel, les marquages pT231 et AT8 étaient comparables entre la MA, la PSP/CBD et les sujets témoins, et ne permettaient pas de distinguer les tauopathies entre elles, ni des témoins (Dugger et al. 2019). Dans une autre étude préliminaire réalisée au laboratoire, nous avons analysé, par western blot, les biopsies du côlon de 5 cas de PSP probable, en utilisant un anticorps spécifique de tau clivée par la caspase 3 (acide aspartique 421) et 2 anticorps phosphospécifiques (AT8 et PHF1 qui reconnaissent tau phosphorylée sur les résidus sérine et thréonine 202/205 et sérine 396/404, respectivement) (Lionnet et al. 2018). Dans cette étude, aucune différence n'était notée sur le niveau d'expression, de phosphorylation et de truncation de tau entre les lysats de biopsies de sujets PSP, de sujets atteints de MP et des témoins Lionnet et al. 2018). L'ensemble de ces données, bien que préliminaires, suggèrent donc que, contrairement à ce qui est observé dans les synucléinopathies, il n'y aurait pas de formes pathologiques de la protéine tau dans le SNE, et donc pas de tauopathie entérique. D'un point de vue physiopathologiques, ces données suggèrent également que, contrairement à l'alpha-synucléine dans la MP (Volpicelli-Daley et Brundin 2018; de Guilhem de Lataillade et al. 2020), tau n'a peut-être pas une forte propension à se propager vers, ou depuis la périphérie, ou, tout du moins, pas par l'intermédiaire du tractus gastro-intestinal (Wakabayashi et al. 2010; Geboes et Collins 1998).

4.3 Tube digestif et amyloïdopathie

L'accumulation de protéine amyloïde bêta (A β), en plaques amyloïdes extracellulaires, est un biomarqueur reconnu de la neurodégénérescence du SNC, impliqué dans l'apparition de maladie neurodégénérative, comme la MA (Jack et al. 2018; Dubois et al. 2021; Hampel, Cummings, et al. 2021). Cette accumulation d'A β implique un clivage anormal d'un récepteur

transmembranaire, appelé APP (Protéine Précurseur de l'Amyloïde), par des β et γ sécrétases (Hampel, Hardy, et al. 2021; Hampel, Cummings, et al. 2021). Chez les patients atteints de la MA, l'accumulation et l'agrégation des peptides A β dans le SNC forme des fibrilles d'A β et des plaques amyloïdes extracellulaires (Hampel, Hardy, et al. 2021; Hampel, Cummings, et al. 2021).

Plusieurs auteurs se sont intéressés à une possible présence de pathologie amyloïde dans le SNE. De études préliminaires ont rapporté une expression d'APP dans le SNE, suggérant une possible implication du SNE dans la pathologie amyloïde (Van Ginneken et al. 2011; Semar et al. 2013; Chalazonitis et Rao 2018; G. Liu et al. 2023). Par la suite, des études réalisées sur modèle murin (souris transgéniques surexprimant une forme mutante d'APP), ont mis en évidence une accumulation de A β dans les neurones entériques, une diminution de l'abondance des neurones entériques, et une dysmotilité entraînant une susceptibilité accrue à l'inflammation (Chalazonitis et Rao 2018; Puig et al. 2015). Une accumulation d'A β dans le SNE de souris avant l'apparition de dépôt dans le SNC a été montré dans des modèles de souris transgéniques (mutation d'APP) (Semar et al. 2013; Y. Sun et al. 2020). Cependant, ces résultats n'ont pas pu être systématiquement reproduits, et, notamment en l'absence de susceptibilité génétique aux dépôts amyloïdes (*i.e.* sans facteur de risque génétique de MA) (Van Ginneken et al. 2011). A noter cependant qu'une étude réalisée plus récemment a montré qu'un traitement par injection intra-gastrique d' A β , chez la souris, était associé à l'apparition de pathologie amyloïde centrale et au niveau de la muqueuse gastrique (Y. Sun et al. 2020). Finalement, comme pour la pathologie tau, même si des données préliminaires suggèrent une éventuelle voie de diffusion de la pathologie amyloïde du tractus gastro-intestinal via le cerveau, via le SNE, le niveau de preuve reste encore faible et, un autre mécanisme est suggéré, impliquant des protéines amyloïdes digestives d'origine bactérienne. En effet l'accumulation de protéine amyloïde, d'origine digestive, pourrait être causée par une perturbation du microbiote intestinal qui constitue une source significative de peptide amyloïdes d'origine bactérienne. Par exemple, il a été mis en évidence que certaines espèces bactériennes de l'intestin, telles que *E. coli*, pouvaient produire des peptides amyloïdes bactériens pour former un biofilm afin de survivre aux stimuli mécaniques et immunitaires (revue dans (Cryan et al. 2019; Kowalski et Mulak 2019)). Il faut noter cependant que ces peptides amyloïdes bactériens diffèrent des peptides amyloïdes du SNC, notamment par leur structure primaire, même s'ils présentent des similitudes dans leur structure tertiaire, avec les peptides impliqués dans les pathologies neurodégénératives (Zhao, Dua, et Lukiw 2015; Friedland 2015). Fait intéressant, et ce malgré

les différences de structure citées précédemment, il a été mis en évidence que des espèces digestives commensales pourraient déclencher un stress qui favoriserait une cascade d'oligomérisation/agrégation d'A β et l'apparition d'amyloïdopathie, et de même pour d'autres protéinopathies dans le SNC (Hetz et Saxena 2017; S. G. Chen et al. 2016). En particulier, l'étude menée par Chen et al (S. G. Chen et al. 2016) a mis en évidence, chez des rats exposés à *Escherichia coli* produisant des peptides amyloïdes, un dépôt d' α -synucléine à la fois dans l'intestin et le cerveau, associé à la présence d'une neuroinflammation centrale (microgliose et une astrogliose supérieure en comparaison à des rats exposés à des bactéries incapables de produire des peptides amyloïdes). Ce mécanisme inflammatoire d'apparition de l'amyloïdopathie du SNC, impliquant des peptides amyloïde d'origine bactérien, a aussi été retrouvé dans d'autres modèle animaux exposés à des bactéries produisant des peptides amyloïdes (Chen et al. 2016; Li et al. 2016). Finalement, toutes ces études suggèrent qu'une combinaison entre inflammation intestinale et modification de la composition du microbiote, en faveur d'espèce produisant des peptides amyloïdes, pourrait favoriser l'apparition d'amyloïdopathie cérébrale, et possiblement entérique, dans un contexte d'augmentation de la perméabilité des barrières intestinale et hémato-encéphaliques (Cryan et al. 2019; O'Toole et Jeffery 2018). Cependant, à ce jour, et à l'image de ce qui est décrit dans la pathologie tau entérique, l'existence d'une amyloïdopathie entérique nécessite des études complémentaires.

5. Objectifs et présentation des articles

Malgré l'intérêt grandissant pour le rôle de l'axe intestin-cerveau dans les maladies neurodégénératives, les données sur la protéine tau dans le SNE, et plus largement dans le tube digestif, ne sont encore que parcellaire. Les objectifs de ce travail de thèse ont donc été d'étudier :

1) l'expression et la phosphorylation de la protéine tau dans les CEE. En effet, comme cela a été précisé en introduction, des données préliminaires sur l'expression de l'alpha-synucléine dans les CEE sont d'ores et déjà disponibles, cependant, à notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à la protéine tau dans les CEE. **Le premier article** de cette thèse s'est donc attaché à cet aspect. Nous avons étudié l'expression des isoformes de tau dans les CEE de colon adulte humain ainsi que dans deux lignées de CEE, les GLUTag et les NCI-H716 ; dans une seconde série d'expériences, nous avons étudié les effets des AGCC sur la phosphorylation de tau dans les GLUTag.

2) l'expression et la phosphorylation de la protéine tau dans un contexte pathologique, i.e. modèle de Maladie de Crohn (MC), **dans le second article de cette thèse**. En effet, comme cela a été précisé en introduction, la MC est certes une maladie inflammatoire du tube digestif, mais elle est aussi associée à l'apparition d'une neuropathie entérique. Nous avons étudié le niveau d'expression de la protéine tau, sa phosphorylation et sa troncation dans le SNE (biopsies coliques et *full thickness*) de sujets atteints de MC, en comparant à des sujets témoins. Des expériences complémentaires ont été réalisées dans des cultures primaires de SNE et des souris invalidées pour le facteur de transcription Nrf2 afin d'identifier les voies de signalisations impliquées dans cette modification d'expression de tau.

6. Tau expression and phosphorylation in enteroendocrine cells



OPEN ACCESS

EDITED BY

Einar M. Sigurdsson,
New York University, United States

REVIEWED BY

Naruhiko Sahara,
National Institutes for Quantum
and Radiological Science and Technology,
Japan
Erin Congdon,
New York University, United States

*CORRESPONDENCE

Malvyne Rolli-Derkinderen
✉ malvyne.derkinderen@univ-nantes.fr
Pascal Derkinderen
✉ pascal.derkinderen@univ-nantes.fr;
✉ derkinderen@yahoo.fr

†These authors have contributed equally to this work and share first authorship

‡These authors have contributed equally to this work and share last authorship

RECEIVED 15 February 2023

ACCEPTED 17 May 2023

PUBLISHED 02 June 2023



CITATION

Chapelet G, Béguin N, Castellano B, Grit I, de Coppet P, Oullier T, Neunlist M, Blottière H, Rolli-Derkinderen M, Le Dr an G and Derkinderen P (2023) Tau expression and phosphorylation in enteroendocrine cells. *Front. Neurosci.* 17:1166848. doi: 10.3389/fnins.2023.1166848

COPYRIGHT

  2023 Chapelet, Béguin, Castellano, Grit, de Coppet, Oullier, Neunlist, Blottière, Rolli-Derkinderen, Le Dr an and Derkinderen. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Tau expression and phosphorylation in enteroendocrine cells

Guillaume Chapelet^{1†}, Nora B guin^{1†}, Blandine Castellano², Isabelle Grit², Pierre de Coppet², Thibault Oullier¹, Michel Neunlist¹, Hervé Blotti re², Malvyne Rolli-Derkinderen ^{1*‡}, Gwenola Le Dr an^{2‡} and Pascal Derkinderen ^{1*‡}

¹Nantes Université, INSERM, CHU Nantes, The Enteric Nervous System in Gut and Brain Disorders, Nantes, France, ²Nantes Université, INRAE, IMAD, CRNH-O, UMR 1280, PhAN, Nantes, France

Background and objective: There is mounting evidence to suggest that the gut-brain axis is involved in the development of Parkinson's disease (PD). In this regard, the enteroendocrine cells (EEC), which faces the gut lumen and are connected with both enteric neurons and glial cells have received growing attention. The recent observation showing that these cells express alpha-synuclein, a presynaptic neuronal protein genetically and neuropathologically linked to PD came to reinforce the assumption that EEC might be a key component of the neural circuit between the gut lumen and the brain for the bottom-up propagation of PD pathology. Besides alpha-synuclein, tau is another key protein involved in neurodegeneration and converging evidences indicate that there is an interplay between these two proteins at both molecular and pathological levels. There are no existing studies on tau in EEC and therefore we set out to examine the isoform profile and phosphorylation state of tau in these cells.

Methods: Surgical specimens of human colon from control subjects were analyzed by immunohistochemistry using a panel of anti-tau antibodies together with chromogranin A and Glucagon-like peptide-1 (two EEC markers) antibodies. To investigate tau expression further, two EEC lines, namely GLUTag and NCI-H716 were analyzed by Western blot with pan-tau and tau isoform specific antibodies and by RT-PCR. Lambda phosphatase treatment was used to study tau phosphorylation in both cell lines. Eventually, GLUTag were treated with propionate and butyrate, two short chain fatty acids known to sense EEC, and analyzed at different time points by Western blot with an antibody specific for tau phosphorylated at Thr205.

Results: We found that tau is expressed and phosphorylated in EEC in adult human colon and that both EEC lines mainly express two tau isoforms that are phosphorylated under basal condition. Both propionate and butyrate regulated tau phosphorylation state by decreasing its phosphorylation at Thr205.

Conclusion and inference: Our study is the first to characterize tau in human EEC and in EEC lines. As a whole, our findings provide a basis to unravel the functions of tau in EEC and to further investigate the possibility of pathological changes in tauopathies and synucleinopathies.

KEYWORDS

enteroendocrine cells, tau, short-chain fatty acids, gut-brain axis, tauopathies, gastrointestinal tract

Introduction

The enteroendocrine cells (EEC), which are scatterly distributed along the entire gastrointestinal (GI) mucosa representing around 1% of the total gut epithelium cell population, are key components of the gut-brain axis. They are classically regarded as specialized hormone-secreting cells with an apical surface that is exposed to gut lumen and a basal portion that contains secretory granules (Gribble and Reimann, 2019). Such an orientation allows EEC to respond to intraluminal signals such as nutrients or microbiota-derived metabolites. This aspect has been particularly well documented for short-chain fatty acids (SCFA), such as butyrate and propionate, which induce the release of the peptide hormone YY (PYY) (Larraufie et al., 2018). Morphologically, EEC were shown to exhibit neuron-like features including the expression of pre- and post-synaptic proteins together with the presence of neurite-like processes, called neuropods (Bohórquez et al., 2015). These neuropods are in close contact with the two components of the enteric nervous system (ENS), namely enteric glial cells (Bohórquez et al., 2014) and enteric neurons (Chandra et al., 2017) as well as vagal neurons (Kaelberer et al., 2018). The recent findings, which showed that EEC contain alpha-synuclein (Chandra et al., 2017), a presynaptic neuronal protein genetically and neuropathologically linked to Parkinson's disease (PD) led to the assumption that they might be involved in the development of PD. By facing the gut lumen and being directly connected with alpha-synuclein positive enteric neurons (Chandra et al., 2017), the EEC might be a key component of the neural circuit between the gut lumen and the brain for the bottom-up propagation of PD pathology as initially hypothesized by Braak et al. (2006) and more recently by Borghammer and Van Den Berge (2019).

Alpha-synuclein accumulates in a group of neurodegenerative diseases collectively known as synucleinopathies with PD being the most common, while the accumulation of tau is a defining feature of tauopathies classically found in the brains of patients with Alzheimer's disease (AD) or progressive supranuclear palsy (PSP) (Dugger and Dickson, 2017). Nevertheless, in numerous cases alpha-synuclein positive inclusions are also described in tauopathies and *vice versa*, suggesting a co-existence or crosstalk of these proteinopathies (Arai et al., 2001; Coughlin et al., 2019). Tau, like alpha-synuclein is expressed by enteric neurons (Lionnet et al., 2018), thereby suggesting that enteric tau might be involved in neurodegenerative disorders and/or enteric neuropathies (Derkinderen et al., 2021). In contrast to alpha-synuclein, no data are available about the distribution and phosphorylation pattern of tau isoforms in EEC. Here, we first examined the expression

levels of tau isoforms and their phosphorylation profile in full thickness segments of human colon and in EEC lines. We then studied the regulation of tau phosphorylation by SCFA in EEC. Our results show the presence of phosphorylated tau in both mouse and human colonic EEC and the expression of one main tau isoform in EEC lines. We also show that EEC tau is phosphorylated under basal condition and that its phosphorylation state can be modified by SCFA. These data provide the first detailed characterization of EEC tau in human adult colonic tissues and in cell lines. Further investigation of tau modifications in EEC in pathological conditions may provide valuable information about the possible role of EEC tau in neurodegenerative diseases.

Materials and methods

Human, mouse, and rat tissues

Specimens of human colon were obtained from eight neurologically unimpaired subjects who underwent colon resection for colorectal cancer (5 men, 71 ± 7.6 years). For all tissues specimens, sampling was performed in macroscopically normal segments of uninvolved resection margins. The sampling of human colon was approved by the Fédération des Biothèques of the University Hospital of Nantes, according to the guidelines of the French Ethics Committee for Research on Humans and registered under the no. DC-2008-402. Written informed consent was obtained from each subject. Hippocampi were taken from a 2-month-old wild type C57BL/6J mouse and sciatic nerve sections were taken from one pregnant Sprague-Dawley rats (used for the generation of primary culture of rat ENS in our lab) in order to identify tau isoforms in GLUtag cells and to serve as a positive control for big tau experiments, respectively. These samples were stored at -80°C until further analysis by Western blot.

EEC lines and reagents

NCI-H716 cells (ATCC, LGC Standards, Molsheim, France, CCL-251) were maintained in RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, France) whereas GLUtag (a gift from Professor Daniel J. Drucker of University of Toronto) and Caco-2 cells were maintained in DMEM (Gibco), all supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-Glutamine, 50 IU/ml penicillin and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin (all from Merck-Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) in a humidified incubator at 37°C with 5% of CO_2 . Propionate and butyrate were from Merck-Sigma.

Dephosphorylation of tissues and cell lysates

For dephosphorylation experiments, cells and hippocampi were homogenized in a buffer containing 100 mM NaCl and 50 mM Tris-Cl at pH 7.4 with 1% (v/v) IGEPAL® CA-630 (ThermoFisher, Saint-Herblain, France) and a protease inhibitors cocktail without EDTA (Roche, Neuilly sur Seine, France) using either a “Precellys 24” (Bertin technologies, St Quentin-en-Yvelines, France) tissue homogenizer and followed by sonication with “vibracell 75 186” device (Sonics, Newton, CT, USA). Homogenates were centrifuged at 16,100 g for 20 min at 4°C with an Eppendorf 5415R centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Germany), sonicated for 10 s and protein amounts normalized following a bicinchoninic acid protein assay (ThermoFisher). Samples were diluted to 1.0 mg/ml protein using homogenization buffer and incubated with 20 U/μl lambda phosphatase in MnCl₂ and enzyme buffer as supplied with the lambda protein phosphatase kit (New England Biolabs, Evry-Courcouronnes, France) for 3 h at 30°C. The reaction was stopped by the addition of sample buffer (Life Technologies) and heating to 95°C for 5 min. Control samples were treated identically without the addition of lambda phosphatase.

SDS-PAGE and Western blot

For dephosphorylation experiments, cells or tissues were processed as described above. For experiments that did not require dephosphorylation, cells or tissues were lysed in RIPA lysis buffer (Merck Millipore, Fontenay sous Bois, France) containing 2 mM orthovanadate (Merck-Sigma, Molsheim, France), phosphatase inhibitor cocktail II (Merck-Sigma) and a protease inhibitors cocktail (Merck-Sigma). Western blots were performed as we previously described using NuPAGE™ 10% Bis-Tris Protein Gels (Life Technologies). The primary anti-tau antibodies used are listed in [Table 1](#). β-Actin antibodies (Abcam, France, 1:1,000 dilution) were used as loading control. Tau ladder (six human tau recombinant isoforms, Sigma-Merck) was used to identify tau isoforms in NCI-H716 cells. For quantification, the relevant immunoreactive bands were quantified with laser-scanning densitometry and analyzed with Image Lab software (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) or ImageJ software (NIH; version 1.51). To allow comparison between different films, the density of the bands was expressed as a percentage of the average of controls. pThr205 tau immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of total tau, and expressed as percentage of controls.

Immunofluorescence

Human colonic tissues were embedded in paraffin using an embedding station (LEICA EG1150C) and sections (3 μm) were cut using a microtome (LEICA RM2255). The sections were deparaffinized by bathing twice in xylene (for 5 min each) and taken through graded concentrations of ethanol (100, 95, 70, and 50%, respectively, for 3 min each). After a rinse in distilled water, slides were washed in PBS and antigen retrieval was performed

using a Sodium Citrate solution (2.94 g Sodium Citrate Tribase; 1 L distilled water; 500 μl Tween 20; pH 6) at 95°C for 20 min. Slides were incubated in NH₄Cl (100 mM) for 15 min before incubation in PBS-0.5% triton X-100 (Merck-Sigma) for 1 h and blocking for 2 h in 10% (v/v) horse serum in PBS-0.5% triton X-100. Primary antibodies ([Table 1](#)) were incubated overnight at 4°C, and following washing, secondary antibodies were added for 2 h at room temperature. Secondary antibodies were anti-mouse Biotin (A24522, Thermo Fisher Scientific), Alexa Fluor 647-conjugated goat anti-rabbit (711-606-152, Jackson ImmunoResearch, Ely, UK), Alexa Fluor 568-conjugated Streptavidin (S11226, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-mouse (Molecular Probes, Thermo Scientific). DAPI (1:10,000) was added to counterstain nuclei. Tissues sections were mounted in Prolong Gold anti-fading medium (Molecular Probes, Thermo Scientific). Images were acquired with a Zeiss, Axio Imager M2m fluorescence microscope coupled to a digital camera (Axiocam 503 mono).

RNA extraction and RT-PCR

Total RNA extraction from EEC and Caco-2 cells was carried out using a QIAamp RNA Blood Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturer’s instructions. 1 μg RNA per sample was reverse transcribed using a Superscript III reverse transcriptase assay kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer’s instructions. To examine the alternate splicing of the microtubule binding domain repeat region encoded by exon 10, primers were used that specifically recognize mouse or human exons 9 and 11 as described by [Duff et al. \(2000\)](#). Primer sequences were: mouse exon 9F 5'-CCCCCTAAGTCACCATCAGCTAGT, mouse exon 11R 5'-CACTTTGCTCAGGTCCACCGGC, human exon 9F 5'-CTCCAAAATCAGGGGATCGC, human exon 11R 5'-CCTTGCTCAGGTCAACTGGT. Splicing around the N terminal insert domain encoded by exons 2 and 3 was detected using primers that recognize exons 1 and 5. Primer sequences used were: mouse exon 1F 5'-TCCGCTGTCTCTTCTGTGTC, mouse exon 5R 5'-TTCTCGTCATTTCTGTGCC, human exon 1F 5'-TGAACCAGGATGGCTGAGC, human exon 5R 5'-TTGTCATCGCTTCCAGTCC. Annealing temperatures were 64°C (all MAPT primers), 62°C (M1F/M5R) and 68°C (M9F/M11R). Thirty-five reaction cycles were used for all. Mouse and human-specific RT-PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis. Products corresponding to exon 10+ tau mRNA (4R) are 390 base pairs (bp), while products corresponding to exon 10- mRNA (3R) are 297 bp. RT-PCR products containing tau mRNA with exons 2 and 3 (2N) are 428 bp, 2 + 3- mRNA products (1N) are 341 bp, and 2–3- mRNA products (0N) are 253 bp.

Statistics

All quantitative data shown are mean ± standard error of the mean (SEM). Mann–Whitney test or Kruskal–Wallis then Dunn’s multiple comparisons tests were performed for two or multiple groups comparison, respectively. Differences were deemed statistically significant if $p < 0.05$. GraphPad Prism software version

9.1.1 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, United States) was used for statistical analyses and for designing figures.

Results

Human colonic EEC express tau

To determine if tau is expressed in EEC, we examined chromogranin A and glucagon-like peptide 1 (GLP-1)-containing cells of the human colon. Chromogranin A is an acidic glycoprotein located in secretory vesicles of endocrine cells, which is classically used as a pan-EEC marker (Wilson and Lloyd, 1984), whereas GLP-1 is a marker of L-type EEC (Eissele et al., 1992), the most abundant EEC population in the human colon (Latorre et al., 2016). Using the pan-tau antibody A0024, we identified tau in GLP-1-positive cells in the epithelial lining (Figure 1A). When human colonic tissue was immunolabelled with isoform-specific tau antibodies, we showed that 3R-tau was expressed in chromogranin A immunoreactive cells (Figure 1B); no specific staining was observed when a 4R-tau was used (data not shown). Tau phosphorylation at multiple serine and threonine sites is the predominant mechanism by which its biological activity is regulated (Guo et al., 2017). We therefore examined the phosphorylation state of tau with a phospho-specific antibody that detect tau phosphorylated at Ser396 and showed that phospho-tau was observed within chromogranin A-positive cells in colon epithelium (Figure 1C). Approximately 73 and 80% of chromogranin A immunoreactive cells in the colon contained 3R- and phosphorylated-tau, respectively (Table 2). When taken together, these results show that tau is expressed and phosphorylated in EEC in human colon, with 3R-tau likely being most abundant isoforms.

Tau is expressed and phosphorylated in EEC lines

There are multiple cell lines used as models for EEC research, including GLUTag, a mouse endocrine tumor-adherent cell line and NCI-H716, a human-derived suspension cell line. These two cell lines have been widely used as models for GLP-1-producing

L-cells and proved to be useful for *in vitro* screening bioassays (Goldspink et al., 2018). As a first approach, we compared the banding pattern on Western blots of total tau as evaluated with the A0024 pan-tau antibody between non-dephosphorylated lysates of GLUTag cells and hippocampus of 2-month-old mouse. Total tau antibody detected several bands in 2-month-old mouse brain migrating between 50 and 60 kDa (Figure 2A). In GLUTag cells, the observed banding pattern was markedly different with a doublet of 48 and 50 kDa bands, the latter showing the most intense labeling (Figure 2A). In adult mouse brain, primary CNS/ENS neurons and neuronal cell lines, tau isoforms are phosphorylated on multiple tau and serine residues resulting in reduced electrophoretic mobility on SDS-PAGE compared to non-phosphorylated tau (Goedert et al., 1992a; Davis et al., 1995; Lionnet et al., 2018). In order to determine the phosphorylation state of tau in GLUTag cells, cell lysates treated or not with lambda phosphatase (Davis et al., 1995) were analyzed by Western blot using three different pan-tau antibodies. Treatment with lambda phosphatase caused tau dephosphorylation, as evidenced by a significant downward shift in mobility of the tau doublet detected with either the pan-Tau A0024, D1M9X, or Tau-1 (Figure 2B). Of note, this downward shift was associated with increased Tau immunoreactivity when the Tau-1 antibody was used (Figure 2B). These findings are in line with previous observations showing that Tau-1 binds preferentially to tau when dephosphorylated at serine residues 195, 198, 199, and 202 (Liu et al., 1993; Szendrei et al., 1993). In order to determine which tau isoforms are expressed in GLUTag cells, we used two commercially available isoform-specific tau antibodies directed against 3R and 4R-tau, which have been shown to be highly specific in a recent comprehensive study that tested the specificity of tau antibodies using immunoblotting (Ercan et al., 2017). GLUTag lysates were compared to dephosphorylated brain samples (hippocampus of 2-month-old wild-type mice), which express all 4R isoforms and to a lesser extent the 0N3R isoform (McMillan et al., 2008; Liu and Götz, 2013; Figure 2C). After dephosphorylation, the 3R and 4R antibodies detected one single band in cell lysates that comigrated with 0N3R and 0N4R in the hippocampus, respectively (McMillan et al., 2008; Liu and Götz, 2013; Figure 2C). When taken together, these results show that 0N3R and 0N4R are the two main tau isoforms that are expressed in GLUTag cells and these two isoforms are phosphorylated under basal conditions.

TABLE 1 The name, specificity, epitope, source, and dilution of the antibodies used in this study are shown.

Name	Specificity	Epitope (a.a.)	Source and dilution
A0024 Tau	All tau isoforms	243–441 (2N4R)	Dako, rp (WB 1:1,000; IF 1:500)
Tau-1	All tau isoforms	189–207 (2N4R)	Merck, mm, clone PC1C6 (WB 1:2,000; IF 1:500 biotin)
D1M9X	All tau isoforms	Around D430 (2N4R)	Cell Signaling, rm #46687 (WB 1:1,000)
Anti tau RD3	3R tau Isoforms	267–282 (2N3R)	Merck, mm, clone 8E6 (WB 1:1,000; IF 1:500)
Anti tau RD4	4R tau isoforms	275–291 (2N4R)	Merck, mm, clone 1E1/A6 (WB 1:1,000)
Anti 4R-tau	4R tau isoforms	Around 273 (2N4R)	Cell Signaling, rm #30328 (WB 1:2,000; IF 1:200)
PHF13	Tau @ S396	Tau @ S396	Cell Signaling, mm (WB 1:1,000; IF 1:200, biotin)
pThr205	Tau @ T205	Tau @ T205	Abcam, rm, #EPR2403(2) (WB 1:1,000)
ChrA	SP-1 chromogranin A		Spring Bioscience, rp, #E1520 (IF: 1:1,000)
Glp-1	C-term Glp-1		Santa Cruz, gp, #7782 (IF 1:200)

a.a., amino-acids; IF, immunofluorescence; GP, goat polyclonal; MM, mouse monoclonal; RM, rabbit monoclonal; RP, rabbit polyclonal; WB, Western blot.

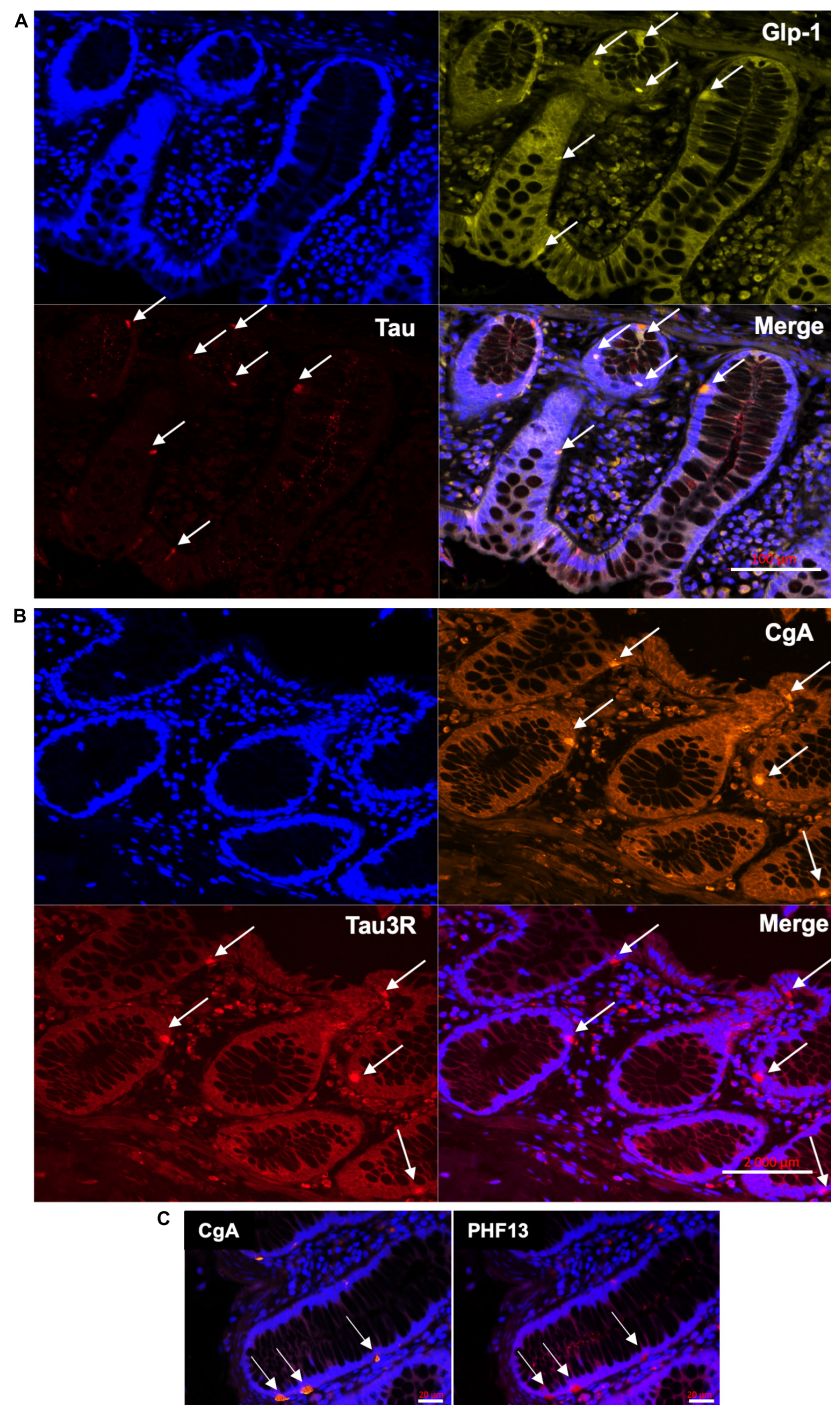


FIGURE 1

Distribution of tau in the epithelial lining in adult human colon. **(A)** Total tau antibody A0024 (Table 1) was used to detect tau in epithelium lining of human colonic samples (arrows). An antibody specific to Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) was used to specifically label L-type EEC (arrows). DAPI was used to counterstain nuclei. Scale bar is 100 μm. **(B)** Isoform-specific antibody (tau RD3, Table 1) was used to detect 3R-tau and an antibody specific to chromogranin A (CgA) was used to specifically label EEC (arrows). DAPI was used to counterstain nuclei. Scale bar is 2 mm. **(C)** Human colonic samples were co-labeled with an antibody specific for tau phosphorylated at Ser396 (PHF13, Table 1) and an antibody specific to chromogranin A (CgA). Arrows show cells immunoreactive for both PS396 and CgA. DAPI was used to counterstain nuclei. Scale bar is 20 μm. Representative photomicrographs are shown.

Similar experiments were conducted with the NCI-H716 cell line. Treatment with lambda phosphatase caused tau dephosphorylation, as evidenced by a significant downward shift in mobility of the tau doublet detected when the pan-tau A0024

antibody was used (Figure 2D). After dephosphorylation, this tau doublet at 50 and 55 kDa comigrated with 0N3R and 1N3R/0N4R from the tau human ladder (Figure 2D). The isoform specific 3R antibody detected one major band at 58 kDa and a fainter one

around 55 kDa in dephosphorylated samples that comigrated with 1N3R and 0N3R isoforms of recombinant human tau, respectively (Figure 2D). No major bands were observed when the 4R-tau antibody was used (data not shown). As a whole, these results show that 1N3R and to a lesser extent 0N3R are the two main isoforms expressed in NCI-H716 cell.

“Big” or peripheral tau is a tau isoform specifically expressed in the peripheral nervous system, including sciatic nerve (Taleghany and Oblinger, 1992). It differs from the 2N4R tau isoform by a 254 amino-acid insert located in the amino-terminal half and migrates at 110 kDa on SDS/PAGE (Goedert et al., 1992b). As shown in Supplementary Figure 1, the uncropped images of the Western blots performed from Figure 2 with total tau antibodies (A0024, D1M9X, and Tau-1) did not show any additional bands at 110 kDa in either GLUTag and NCI-H716 cells, thereby suggesting that EEC do not express big tau. Additional experiments were performed with Tau-1 antibody, which has been previously shown to detect big tau (Davis and Johnson, 1999) and rat sciatic nerve to serve as positive controls (Taleghany and Oblinger, 1992). Tau-1 detected the expected low molecular weight tau isoforms around 50 kDa in GLUTag cells, however, a 110 kDa migrating band was only observed with rat sciatic nerve lysates (Figure 2E).

To further refine the analysis of tau isoforms in EEC, tau expression was analyzed at the mRNA level. To this end, RNA from both GLUTag and NCI-H716 was reverse transcribed to cDNA and amplified with PCR. The human epithelial cell line Caco-2 was used for comparison. Primers were designed, based on those previously described by Duff et al. (2000), to detect splicing of human and mouse tau exons 2, 3, and 10. This allowed amplification of products corresponding to 0N tau in GLUTag, 1N (and to a lesser extent 2N) in NCI-H716 (Figures 3A, B). No transcripts were observed in Caco-2 cells. Transcripts of 3R tau were also observed in GLUTag and NCI-H716, but not in Caco-2 cells when inclusion of exon 10 was assessed using primers specific to human tau exons 9 and 11 (Figure 3). Thus, the results obtained at the mRNA level confirm those obtained at the protein level and show that 0N3R and 1N3R are the main isoforms expressed by GLUTag and NCI-H716 cells, respectively. They also show that human intestinal epithelial cells do not express tau.

Tau phosphorylation is regulated by SCFA in EEC lines

Short-chain fatty acids act as ligands for G protein coupled receptors, which are expressed in EEC, where they mediate hormone release, such as PYY and GLP-1 (reviewed in Martin-Gallausiaux et al., 2021). The phosphorylation of tau at multiple serine and threonine sites has been described in both developing and adult brain and is the predominant mechanism by which tau

functions are regulated (Guo et al., 2017). This logically led us to study the effects of SCFA on tau phosphorylation in EEC. To this end, GLUTag cell lines were treated with 1 mM of either propionate or butyrate at different time points from 10 to 180 min and cell lysates were analyzed by Western blot with an antibody specific for tau phosphorylated at Thr205. Treatment with propionate or butyrate for 180 min caused tau dephosphorylation at Thr205 when compared to control conditions (Figures 4A, B), without significant changes in tau expression (Figures 4A, B).

Discussion

Tau is a microtubule-associated protein for which the physiological functions are still a topic of intense investigation (Guo et al., 2017). Additionally, in pathological conditions tau is a key player in the pathogenesis of several diseases collectively referred to as tauopathies including AD and PSP (Guo et al., 2017). In the adult brain, tau is classically described as a neuronal protein specifically localized and highly enriched in axons but precise localization studies showed that tau distribution in the mature CNS is more widespread than initially thought, with expression in the somatodendritic compartment of neurons as well as in glial cells (Kanaan and Grabinski, 2021). Besides the CNS, the presence of tau has been demonstrated in several non-neuronal cells, such as monocytes (Kim et al., 1991), lymphocytes (Kvetnoy et al., 2000), testicular spermatids (Ashman et al., 1992), podocytes (Vallés-Saiz et al., 2022), pancreatic beta cells (Maj et al., 2016) as well as in peripheral neurons, including enteric neurons (Lionnet et al., 2018). Here, we show for the first time that tau is expressed in EEC, not only in the adult human colon but also in two EEC lines, namely GLUTag and NCI-H716.

Earlier studies showed that EEC exhibit neuronal features with the presence of axon-like basal processes and the expression of neuronal proteins such as synapsin 1, PGP9.5 and neurofilaments (Bohórquez et al., 2014, 2015). Our identification of tau in EEC further expands the neuronal repertoire of EEC and echoes recent publications which showed that alpha-synuclein is also expressed in EEC (Chandra et al., 2017; Casini et al., 2021; Amorim Neto et al., 2022). The observation that alpha-synuclein EEC lie in close proximity to alpha-synuclein-expressing enteric neurons led Liddle and collaborators to posit that the EEC might be critically involved in the circuit between the gut lumen and the brain for the bottom-up propagation of PD pathology (Chandra et al., 2017). Our current findings together with our previous data showing that enteric neurons express tau (Lionnet et al., 2018) suggest that such a scenario could also occur in tauopathies. It could thus be suggested that an hitherto unidentified substance from the gut lumen could induce changes in tau conformation in EEC, leading to a prion-like spreading of tau from EEC to enteric neurons, as

TABLE 2 Estimation of tau- and phospho-tau-expressing EEC.

	Samples (n)	Crypts (n)	CgA+ (n)	CgA+/crypt	Tau+/CgA+ (%)
Tau3R	5	191	238	1.24 ± 0.52	73 ± 18
PHF13	6	617	507	0.82 ± 0.47	80 ± 13

The number (n) of tissue samples, colonic crypts, and chromogranin A immunoreactive cells (CgA+) that were analyzed are shown. The last column shows the percentage of cells immunoreactive for Tau3R and PHF13 relative to chromogranin A immunoreactive cells.

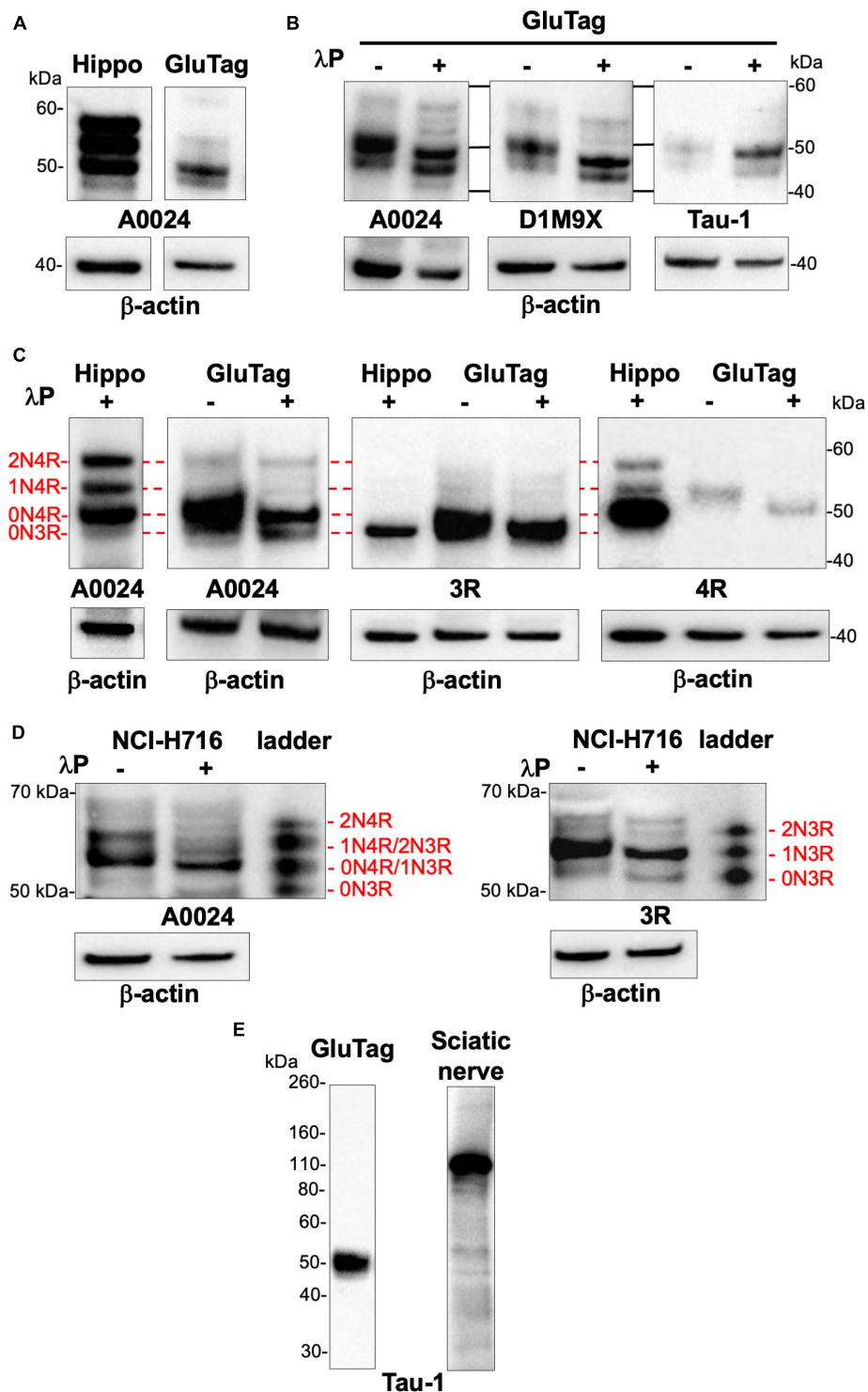
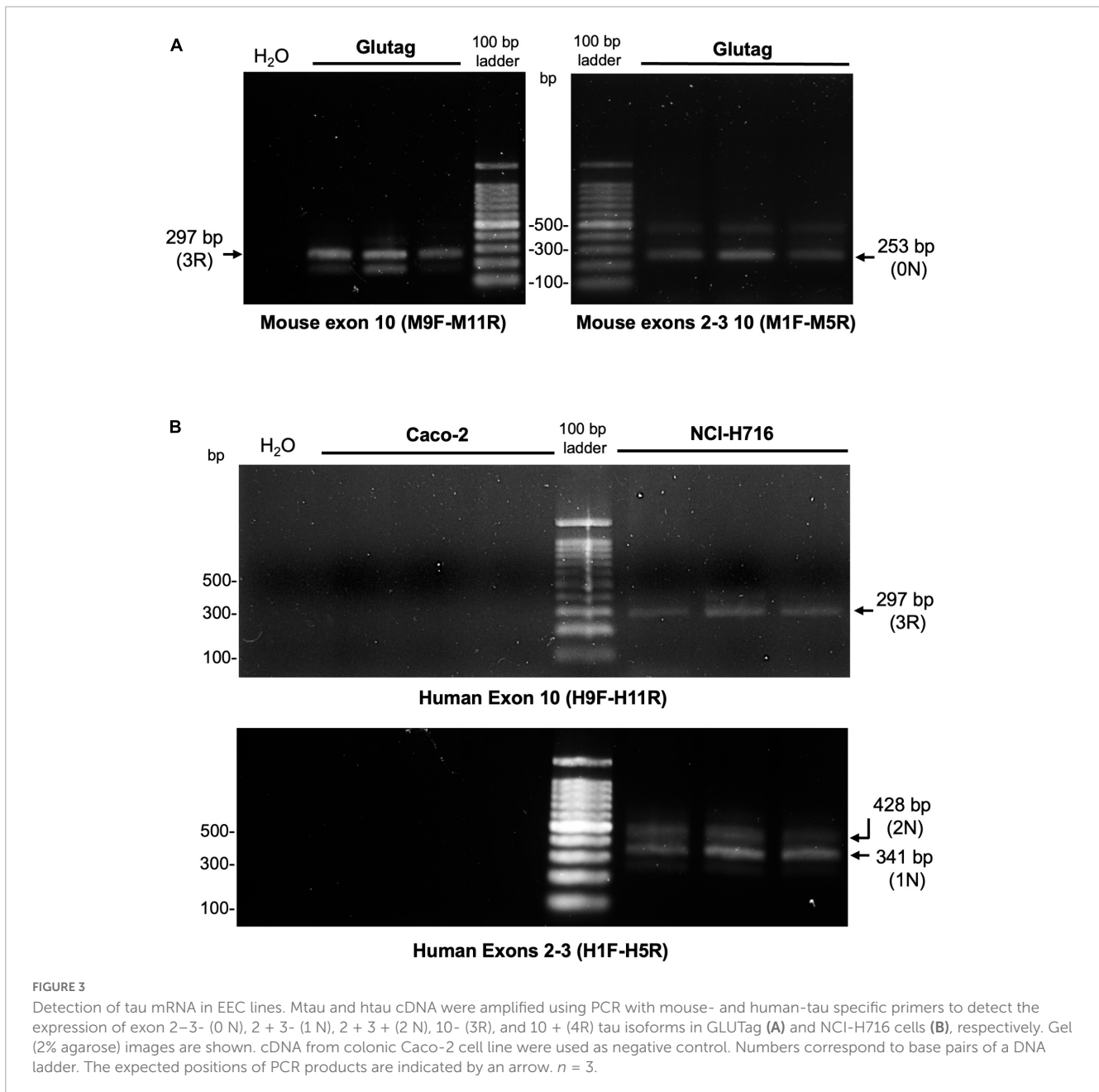


FIGURE 2

Tau protein isoforms and phosphorylation in EEC lines. (A) Hippocampus (2-month-old mice, Hippo) and GLUTag cell lysates were subjected to immunoblot analysis using the pan-Tau antibody A0024. (B) Lysates of GLUTag cell were treated (+) or not (-) with lambda phosphatase (λ P) before immunoblotting with the pan-tau antibodies A0024, D1M9X, and Tau-1. (C) GLUTag cells lysates were treated (+) or not (-) with lambda phosphatase (λ P) before immunoblotting with the tau isoform-specific antibodies 3R and 4R and the pan-tau antibody A0024. Hippocampus lysate from 2-month old mice dephosphorylated with lambda phosphatase (λ P+), which contains all 4R isoforms and 0N3R isoform (McMillan et al., 2008; Liu and Götz, 2013) was used as a ladder to determine mouse tau isoform profile in GLUTag cells; the red lines show comigration. (D) NCI-H716 cell lysates were treated (+) or not (-) with lambda phosphatase (λ P) before immunoblotting with the tau isoform-specific antibody 3R and the pan-tau antibody A0024. Tau ladder, which contains all 6 dephosphorylated human tau isoforms was used to determine tau isoform profile. (E) GLUTag cells lysates were subjected to immunoblot analysis using Tau-1 antibody. Rat sciatic nerve lysates were used as positive control to detect big tau. In all experiments, β -actin immunoblot was used as a loading control. The results shown in panels (A,C) are representative of 3 and 2 independent experiments, respectively. The results shown in panel (B) are representative of 7, 2, and 3 independent experiments for A0024, DM19X, and Tau-1 antibodies, respectively. The results shown in panels (D,E) are representative of 3 and 2 independent experiments, respectively.



already described between CNS neurons (Clavaguera et al., 2009; Frost et al., 2009). It should be however borne in mind that, unlike PD and synucleinopathies (De Guilhem De Lataillade et al., 2020), all existing studies suggest that pathological tau species are not observed in the gut of subjects with either AD or PSP (Shankle et al., 1993; Lionnet et al., 2018; Dugger et al., 2019). Further studies are therefore necessary to determine if pathological tau species are present in the gut of patients with tauopathies, either in enteric nerves or EEC (Derkinderen et al., 2021). Regarding the EEC, the identification of these potential pathological tau species in the gut could greatly benefit from novel approaches, for example by combining laser capture microdissection of EEC (Blatt and Srinivasan, 2008) with ultrasensitive amplification techniques of aggregated proteins such as real-time quaking-induced conversion (Wu et al., 2022).

Six isoforms of tau are expressed in adult human brain by alternative splicing from a single gene. Regulated inclusion of exons 2 and 3 yields tau isoforms with 0, 1, or 2 N-terminal inserts (0N, 1N, and 2N, respectively), whereas exclusion or inclusion of exon 10 leads to expression of tau isoforms with three (3R) or four (4R) microtubule-binding repeats. The various splice combinations of tau are thus abbreviated-0N3R, 0N4R, 1N3R, 1N4R, 2N3R, 2N4R-encoding six proteins isoforms ranging from 352 to 441 amino acids in length (Goedert and Jakes, 1990). In the current study, we identified 0N3R/0N4R and 0N3R/1N3R as the two main tau isoforms expressed in GLUTag and NCI-H716 cell lines. The reasons why EEC lines only express a subset of tau isoforms remains to be determined but the observation showing that the intracellular sorting of tau in different cell compartments is isoform-dependent may provide a clue (Liu and Götz, 2013). It has been indeed

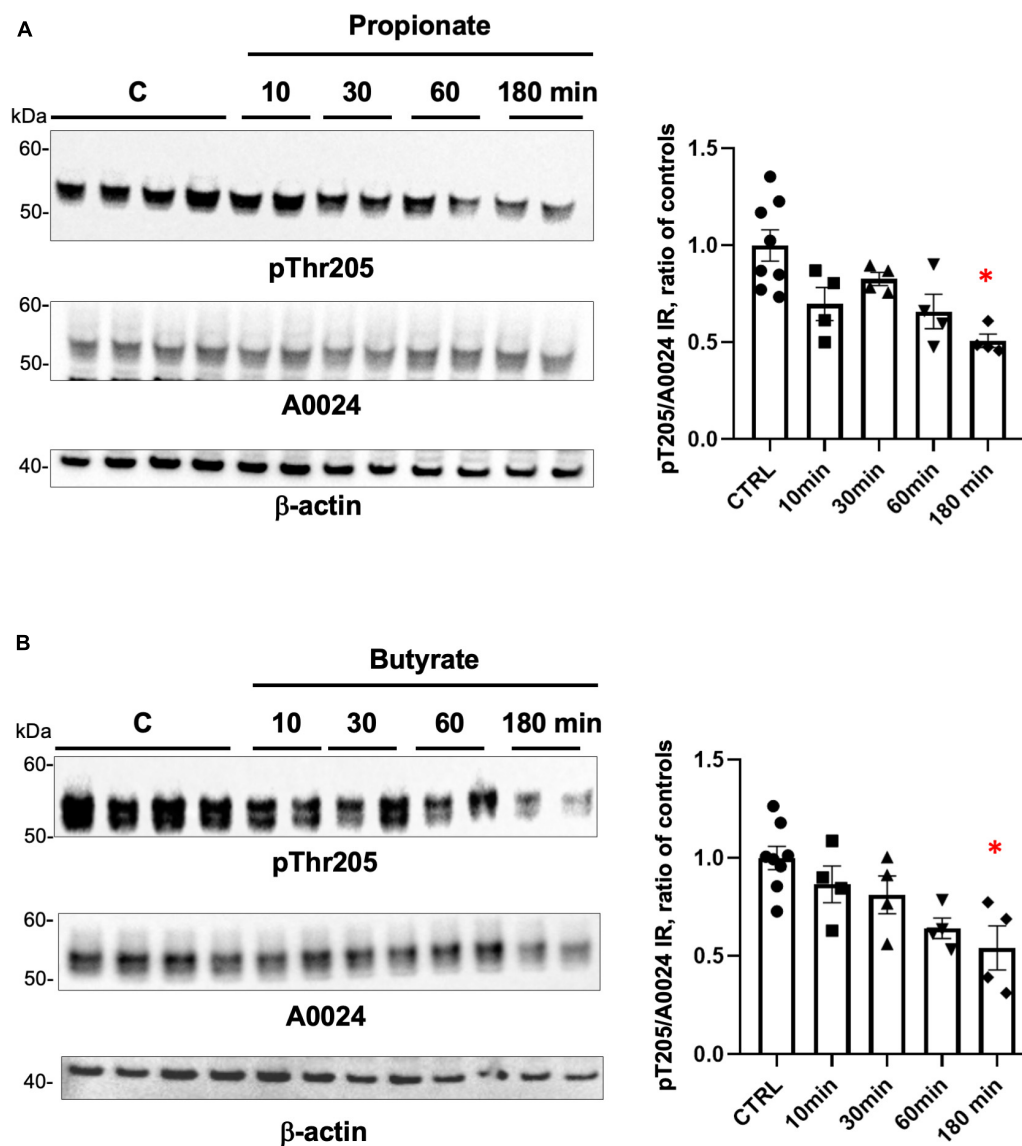


FIGURE 4

Regulation of tau phosphorylation by SCFA in GLUTag cells. (A) GLUTag cells were treated with 1 mM propionate for the indicated periods of time. Cell lysates were subjected to immunoblot analysis using antibodies against tau phosphorylated at Thr205 (pThr205) and total tau (A0024). Membranes were also probed with an anti-β-actin antibody to ensure equal protein loading. pThr205 immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of total tau (A0024), and expressed as ratio of controls. Data correspond to mean ± SEM ($n = 4-8$, n indicates the number of wells; * $p < 0.05$, 180 min-treated vs control). (B) GLUTag cells were treated with 1 mM butyrate for the indicated periods of time. Cell lysates were analyzed as in panel (A) and quantification was performed as in panel (A). Data correspond to mean ± SEM ($n = 4-8$, n indicates the number of wells; * $p < 0.05$, 180 min-treated vs. control).

reported that 0N, 1N and 2N isoforms are primarily localized to the cell bodies, nucleus, and axons, respectively (Liu and Götz, 2013), thereby suggesting that tau in EEC lines is primarily cytoplasmic. In order to properly compare the isoform profile of tau between human adult brain and EEC from human adult colon, it would have been useful to study in more detail tau isoforms in human EEC. We were however unable to do so for two main reasons: first, apart from 3R and 4R antibodies, other specific antibodies for 0N, 1N, and 2N isoforms did not work well for immunohistochemistry on paraffin sections, at least in our hands; second, in contrast to our previous research on the ENS, the use of frozen colonic sections for Western blot analysis was not possible because of the sparse

distribution of EEC along the intestinal epithelium (Lionnet et al., 2018). Again, this precise characterization could benefit from laser microdissection approaches (Blatt and Srinivasan, 2008).

The phosphorylation of tau at multiple serine and threonine sites is the predominant mechanism by which tau functions are regulated (Guo et al., 2017). Dephosphorylation of tau from EEC lines produced a downward shift demonstrating that EEC-tau is, like CNS tau, phosphorylated (Hanger et al., 2002). Using a phospho-specific antibody, we further showed that tau was phosphorylated at Thr205 in GLUTag cells under basal condition and that phosphorylation at this residue was regulated by SCFA. What can be the role of tau and the consequences

of tau phosphorylation from a functional point of view? In this regard, it is tempting to compare our findings to those obtained in pancreatic β -cells. EEC and pancreatic β -cells share similar pathways of differentiation during embryonic development (Ryu et al., 2018). Remarkably, like EEC, pancreatic β -cells, also express tau (Maj et al., 2016; Wijesekara et al., 2018) and several studies showed that tau is critically involved in pancreatic β -cells function, insulin secretion and glucose homeostasis (Maj et al., 2016; Wijesekara et al., 2018). One might therefore suggest that, EEC-tau similarly regulates the secretion of peptide-hormones and that such a regulation is mediated via tau phosphorylation. Further experiments performed after silencing tau in EEC will be needed to answer this question.

Conclusion

In conclusion, we have characterized tau in the human colon and in EEC lines and we show that EEC tau phosphorylation can be regulated by SCFA. The data we have acquired on tau in EEC strongly supports additional future studies aimed at expanding our knowledge of peripheral pathology in tauopathies and at deciphering the physiological role of tau in CEE.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by the Fédération des Biothèques of the University Hospital of Nantes, according to the guidelines of the French Ethics Committee for Research on Humans and registered under the no. DC-2008-402. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

References

- Amorim Neto, D. P., Bosque, B. P., Pereira de Godoy, J. V., Rodrigues, P. V., Meneses, D. D., Tostes, K., et al. (2022). Akkermansia muciniphila induces mitochondrial calcium overload and α -synuclein aggregation in an enteroendocrine cell line. *iScience* 25:103908. doi: 10.1016/j.isci.2022.103908
- Arai, Y., Yamazaki, M., Mori, O., Muramatsu, H., Asano, G., and Katayama, Y. (2001). Alpha-synuclein-positive structures in cases with sporadic Alzheimer's disease: Morphology and its relationship to tau aggregation. *Brain Res.* 888, 287–296. doi: 10.1016/S0006-8993(00)03082-1
- Ashman, J. B., Hall, E. S., Eveleth, J., and Boekelheide, K. (1992). Tau, the neuronal heat-stable microtubule-associated protein, is also present in the cross-linked microtubule network of the testicular spermatid manchette. *Biol. Reprod.* 46, 120–129. doi: 10.1095/biolreprod46.1.120
- Blatt, R., and Srinivasan, S. (2008). Defining disease with laser precision: Laser capture microdissection in gastroenterology. *Gastroenterology* 135, 364–369. doi: 10.1053/j.gastro.2008.06.054
- Bohórquez, D. V., Samsa, L. A., Roholt, A., Medicetty, S., Chandra, R., and Liddle, R. A. (2014). An enteroendocrine cell-enteric glia connection revealed by 3D electron microscopy. *PLoS One* 9:e89881. doi: 10.1371/journal.pone.0089881
- Bohórquez, D. V., Shahid, R. A., Erdmann, A., Kreger, A. M., Wang, Y., Calakos, N., et al. (2015). Neuroepithelial circuit formed by innervation of sensory enteroendocrine cells. *J. Clin. Invest.* 125, 782–786. doi: 10.1172/JCI78361
- Borghammer, P., and Van Den Berge, N. (2019). Brain-first versus gut-first Parkinson's Disease: A hypothesis. *J. Parkinsons Dis.* 9, S281–S295. doi: 10.3233/JPD-191721

Author contributions

GC, NB, BC, IG, PC, and TO performed the experiments. MR-D managed the tissue sampling and biobanking. MR-D, GL, and PD supervised the study and wrote the final version of the manuscript. MN and HB provided critical feedback and helped shape the research. PD wrote the first draft of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Acknowledgments

We acknowledge the IBISA MicroPICell Facility (Biogenouest), Member of the National Infrastructure France-Bioimaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04) for confocal microscopy pictures.

Conflict of interest

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.

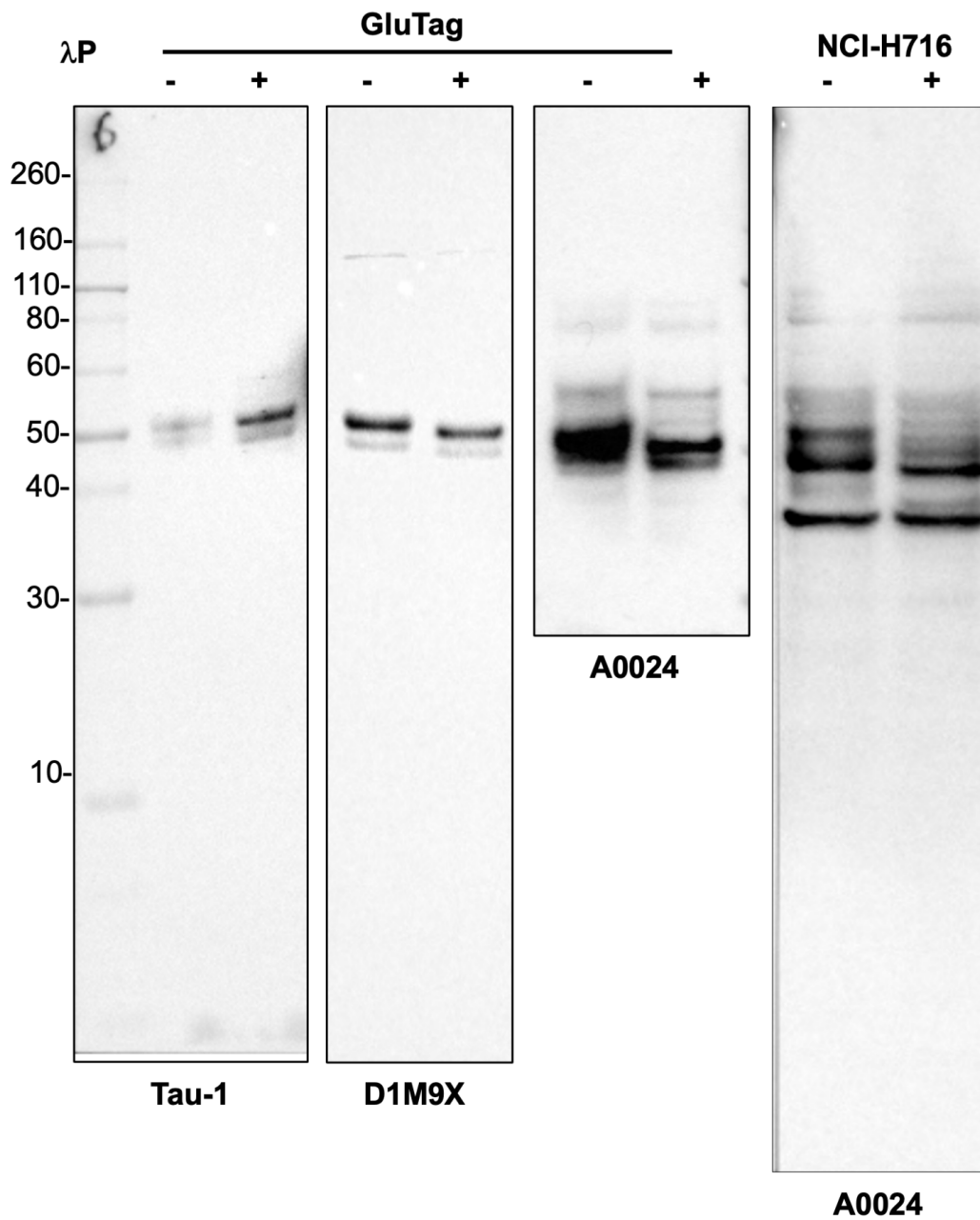
Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2023.1166848/full#supplementary-material>

- Braak, H., de Vos, R. A. I., 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. doi: 10.1016/j.neulet.2005.11.012
- Casini, A., Mancinelli, R., Mammola, C. L., Pannarale, L., Chirletti, P., Onori, P., et al. (2021). Distribution of α -synuclein in normal human jejunum and its relations with the chemosensory and neuroendocrine system. *Eur. J. Histochem.* 65:3310. doi: 10.4081/ejh.2021.3310
- Chandra, R., Hiniker, A., Kuo, Y.-M., Nussbaum, R. L., and Liddle, R. A. (2017). α -Synuclein in gut endocrine cells and its implications for Parkinson's disease. *JCI Insight* 2:92295. doi: 10.1172/jci.insight.92295
- Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R. A., Abramowski, D., Frank, S., Probst, A., et al. (2009). Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat. Cell Biol.* 11, 909–913. doi: 10.1038/ncb1901
- Coughlin, D., Xie, S. X., Liang, M., Williams, A., Peterson, C., Weintraub, D., et al. (2019). Cognitive and pathological influences of tau pathology in lewy body disorders. *Ann. Neurol.* 85, 259–271. doi: 10.1002/ana.25392
- Davis, D. R., Brion, J. P., Couck, A. M., Gallo, J. M., Hanger, D. P., Ladhani, K., et al. (1995). The phosphorylation state of the microtubule-associated protein tau as affected by glutamate, colchicine and beta-amyloid in primary rat cortical neuronal cultures. *Biochem. J.* 309(Pt 3), 941–949. doi: 10.1042/bj3090941
- Davis, P. K., and Johnson, G. V. (1999). Energy metabolism and protein phosphorylation during apoptosis: A phosphorylation study of tau and high-molecular-weight tau in differentiated PC12 cells. *Biochem. J.* 340(Pt 1), 51–58.
- De Guilhem De Lataillade, A., Lebouvier, T., Noble, W., Leclair-Visonneau, L., and Derkinderen, P. (2020). Enteric synucleinopathy: Real entity or only a trendy concept? *Free Neuropathol.* 1:26. doi: 10.17879/FRENEUROPATHOLOGY-2020-2920
- Derkinderen, P., Rolli-Derkinderen, M., Chapelet, G., Neunlist, M., and Noble, W. (2021). Tau in the gut, does it really matter? *J. Neurochem.* 158, 94–104. doi: 10.1111/jnc.15320
- Duff, K., Knight, H., Refolo, L. M., Sanders, S., Yu, X., Picciano, M., et al. (2000). Characterization of pathology in transgenic mice over-expressing human genomic and cDNA tau transgenes. *Neurobiol. Dis.* 7, 87–98. doi: 10.1006/nbdi.1999.0279
- Dugger, B. N., and Dickson, D. W. (2017). Pathology of neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9:a028035. doi: 10.1101/cshperspect.a028035
- Dugger, B. N., Hoffman, B. R., Scroggins, A., Serrano, G. E., Adler, C. H., Shill, H. A., et al. (2019). Tau immunoreactivity in peripheral tissues of human aging and select tauopathies. *Neurosci. Lett.* 696, 132–139. doi: 10.1016/j.neulet.2018.12.031
- Eissele, R., Göke, R., Willemer, S., Harthus, H. P., Vermeer, H., Arnold, R., et al. (1992). Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *Eur. J. Clin. Invest.* 22, 283–291. doi: 10.1111/j.1365-2362.1992.tb01464.x
- Ercan, E., Eid, S., Weber, C., Kowalski, A., Bichmann, M., Behrendt, A., et al. (2017). A validated antibody panel for the characterization of tau post-translational modifications. *Mol. Neurodegener.* 12:87. doi: 10.1186/s13024-017-0229-1
- Frost, B., Jacks, R. L., and Diamond, M. I. (2009). Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J. Biol. Chem.* 284, 12845–12852. doi: 10.1074/jbc.M808759200
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Cairns, N. J., and Crowther, R. A. (1992a). Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: Abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8, 159–168. doi: 10.1016/0896-6273(92)90117-v
- Goedert, M., and Jakes, R. (1990). Expression of separate isoforms of human tau protein: Correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J.* 9, 4225–4230.
- Goedert, M., Spillantini, M. G., and Crowther, R. A. (1992b). Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 1983–1987. doi: 10.1073/pnas.89.5.1983
- Goldspink, D. A., Reimann, F., and Gribble, F. M. (2018). Models and tools for studying enteroendocrine cells. *Endocrinology* 159, 3874–3884. doi: 10.1210/en.2018-00672
- Gribble, F. M., and Reimann, F. (2019). Function and mechanisms of enteroendocrine cells and gut hormones in metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* 15, 226–237. doi: 10.1038/s41574-019-0168-8
- Guo, T., Noble, W., and Hanger, D. P. (2017). Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol.* 133, 665–704. doi: 10.1007/s00401-017-1707-9
- Hanger, D. P., Gibb, G. M., de Silva, R., Boutajangout, A., Brion, J.-P., Revesz, T., et al. (2002). The complex relationship between soluble and insoluble tau in tauopathies revealed by efficient dephosphorylation and specific antibodies. *FEBS Lett.* 531, 538–542. doi: 10.1016/s0014-5793(02)03611-6
- Kaelberer, M. M., Buchanan, K. L., Klein, M. E., Barth, B. B., Montoya, M. M., Shen, X., et al. (2018). A gut-brain neural circuit for nutrient sensory transduction. *Science* 361:eaat5236. doi: 10.1126/science.aat5236
- Kanaan, N. M., and Grabinski, T. (2021). Neuronal and glial distribution of tau protein in the adult rat and monkey. *Front. Mol. Neurosci.* 14:607303. doi: 10.3389/fnmol.2021.607303
- Kim, H., Strong, T. V., and Anderson, S. J. (1991). Evidence for tau expression in cells of monocyte lineage and its in vitro phosphorylation by v-fms kinase. *Oncogene* 6, 1085–1087.
- Kvetnoy, I. M., Hernandez-Yago, J., Kvetnaia, T. V., Khavinson, V. K., Malinin, V. V., Yarilin, A. A., et al. (2000). Tau-protein expression in human blood lymphocytes: A promising marker and suitable sample for life-time diagnosis of Alzheimer's disease. *Neuro Endocrinol. Lett.* 21, 313–318.
- Larraufie, P., Martin-Gallausiaux, C., Lapaque, N., Dore, J., Gribble, F. M., Reimann, F., et al. (2018). SCFAs strongly stimulate PYY production in human enteroendocrine cells. *Sci. Rep.* 8:74. doi: 10.1038/s41598-017-18259-0
- Latorre, R., Sternini, C., De Giorgio, R., and Greenwood-Van Meerveld, B. (2016). Enteroendocrine cells: A review of their role in brain-gut communication. *Neurogastroenterol. Motil.* 28, 620–630. doi: 10.1111/nmo.12754
- Lionnet, A., Wade, M. A., Corbillé, A.-G., Prigent, A., Paillusson, S., Tasselli, M., et al. (2018). Characterisation of tau in the human and rodent enteric nervous system under physiological conditions and in tauopathy. *Acta Neuropathol. Commun.* 6:65. doi: 10.1186/s40478-018-0568-3
- Liu, C., and Götz, J. (2013). Profiling murine tau with 0N, 1N and 2N isoform-specific antibodies in brain and peripheral organs reveals distinct subcellular localization, with the 1N isoform being enriched in the nucleus. *PLoS One* 8:e84849. doi: 10.1371/journal.pone.0084849
- Liu, W. K., Moore, W. T., Williams, R. T., Hall, F. L., and Yen, S. H. (1993). Application of synthetic phospho- and unphospho-peptides to identify phosphorylation sites in a subregion of the tau molecule, which is modified in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 34, 371–376. doi: 10.1002/jnr.490340315
- Maj, M., Hoermann, G., Rasul, S., Base, W., Wagner, L., and Attems, J. (2016). The microtubule-associated protein tau and its relevance for pancreatic beta cells. *J. Diabetes Res.* 2016:1964634. doi: 10.1155/2016/1964634
- Martin-Gallausiaux, C., Marinelli, L., Blottière, H. M., Larraufie, P., and Lapaque, N. (2021). SCFA: Mechanisms and functional importance in the gut. *Proc. Nutr. Soc.* 80, 37–49. doi: 10.1017/S0029665120006916
- McMillan, P., Korvatska, E., Poorkaj, P., Evstafjeva, Z., Robinson, L., Greenup, L., et al. (2008). Tau isoform regulation is region- and cell-specific in mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 511, 788–803. doi: 10.1002/cne.21867
- Ryu, G. R., Lee, E., Kim, J. J., Moon, S.-D., Ko, S.-H., Ahn, Y.-B., et al. (2018). Comparison of enteroendocrine cells and pancreatic β -cells using gene expression profiling and insulin gene methylation. *PLoS One* 13:e0206401. doi: 10.1371/journal.pone.0206401
- Shankle, W. R., Landing, B. H., Ang, S. M., Chui, H., Villarreal-Engelhardt, G., and Zarow, C. (1993). Studies of the enteric nervous system in Alzheimer disease and other dementias of the elderly: Enteric neurons in Alzheimer disease. *Mod. Pathol.* 6, 10–14.
- Szendrei, G. I., Lee, V. M., and Otvos, L. (1993). Recognition of the minimal epitope of monoclonal antibody Tau-1 depends upon the presence of a phosphate group but not its location. *J. Neurosci. Res.* 34, 243–249. doi: 10.1002/jnr.490340212
- Taleghany, N., and Oblinger, M. M. (1992). Regional distribution and biochemical characteristics of high molecular weight tau in the nervous system. *J. Neurosci. Res.* 33, 257–265. doi: 10.1002/jnr.490330209
- Vallés-Saiz, L., Peinado-Cahuchola, R., Ávila, J., and Hernández, F. (2022). Microtubule-associated protein tau in murine kidney: Role in podocyte architecture. *Cell Mol. Life Sci.* 79:97. doi: 10.1007/s00018-021-04106-z
- Wijesekara, N., Gonçalves, R. A., Ahrens, R., De Felice, F. G., and Fraser, P. E. (2018). Tau ablation in mice leads to pancreatic β cell dysfunction and glucose intolerance. *FASEB J.* 32, 3166–3173. doi: 10.1096/fj.201701352
- Wilson, B. S., and Lloyd, R. V. (1984). Detection of chromogranin in neuroendocrine cells with a monoclonal antibody. *Am. J. Pathol.* 115, 458–468.
- Wu, L., Wang, Z., Lad, S., Gilyazova, N., Dougharty, D. T., Marcus, M., et al. (2022). Selective detection of misfolded tau from postmortem Alzheimer's Disease brains. *Front. Aging Neurosci.* 14:945875. doi: 10.3389/fnagi.2022.945875



Supplementary figure 1. Uncropped western blots showing the absence of big tau in EEC

7. Tau accumulates in Crohn's disease gut

RESEARCH ARTICLE

Tau accumulates in Crohn's disease gut

Alice Prigent¹ | Guillaume Chapelet^{1,2} | Adrien De Guilhem de Lataillade^{1,3} |
 Thibault Oullier¹ | Emilie Durieu¹ | Arnaud Bourreille¹ | Emilie Duchalais¹ |
 Kévin Hardonnière⁴ | Michel Neunlist¹ | Wendy Noble⁵ | Saadia Kerdine-Römer⁴ |
 Pascal Derkinderen^{1,3} | Malvyne Rolli-Derkinderen¹

¹Inserm, TENS, The Enteric Nervous System in Gut and Brain Diseases, IMAD, Université de Nantes, Nantes, France

²Clinical Gerontology Department, CHU Nantes, Nantes, France

³Department of Neurology, CHU Nantes, Nantes, France

⁴Inserm, Inflammation, Microbiome and Immunosurveillance, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France

⁵Department of Basic and Clinical Neuroscience, Institute of Psychiatry, Psychology and Neuroscience, Maurice Wohl Clinical Neuroscience Institute, King's College London, London, UK

Correspondence

Pascal Derkinderen, Inserm U1235 Nantes, TENS, The Enteric Nervous System in Gut and Brain Diseases, IMAD, Université de Nantes, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes, France.

Email: pascal.derkinderen@chu-nantes.fr; derkinderenp@yahoo.fr

Funding information

centre d'entraide et de coordination des associations de parkinsoniens (CECAP); Parkinsonien de Vendée (FFGP)

Abstract

A sizeable body of evidence has recently emerged to suggest that gastrointestinal (GI) inflammation might be involved in the development of Parkinson's disease (PD). There is now strong epidemiological and genetical evidence linking PD to inflammatory bowel diseases and we recently demonstrated that the neuronal protein alpha-synuclein, which is critically involved in PD pathophysiology, is upregulated in inflamed segments of Crohn's colon. The microtubule associated protein tau is another neuronal protein critically involved in neurodegenerative disorders but, in contrast to alpha-synuclein, no data are available about its expression and phosphorylation patterns in inflammatory bowel diseases. Here, we examined the expression levels of tau isoforms, their phosphorylation profile and truncation in colon biopsy specimens from 16 Crohn's disease (CD) and 6 ulcerative colitis (UC) patients and compared them to samples from 16 controls. Additional experiments were performed in full thickness segments of colon of five CD and five control subjects, in primary cultures of rat enteric neurons and in nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf2) knockout mice. Our results show the upregulation of two main human tau isoforms in the enteric nervous system (ENS) in CD but not in UC. This upregulation was not transcriptionally regulated but instead likely resulted from a decrease in protein clearance via an Nrf2 pathway. Our findings, which provide the first detailed characterization of tau in CD, suggest that the key proteins involved in neurodegenerative disorders such as alpha-synuclein and tau, might also play a role in CD.

KEYWORDS

alpha-synuclein, Crohn's disease, enteric nervous system, Nrf2, Tau

Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; CD, Crohn's disease; EGTA, ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid; ENS, enteric nervous system; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GI, gastrointestinal; MAPT, microtubule-associated protein tau; NDP52, nuclear dot protein 52 kDa; Nrf2, nuclear factor erythroid 2-related factor; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PD, Parkinson's disease; PSP, progressive supranuclear palsy; RPS6, ribosomal protein S6; SDS, sodium dodecyl sulfate; SNCA, synuclein alpha; TBS, tris-buffered saline; UC, ulcerative colitis.

Alice Prigent, Guillaume Chapelet, and Adrien De Guilhem de Lataillade contributed equally to this work.

Pascal Derkinderen and Malvyne Rolli-Derkinderen Co-senior authorship.

1 | INTRODUCTION

Crohn's disease (CD) is a type of inflammatory bowel disease, which is characterized by chronic remitting and relapsing inflammation of the entire gastrointestinal (GI) tract. Although the precise etiology of CD is unknown, it is generally accepted that it develops through an exaggerated immune response to luminal antigens in genetically susceptible individuals leading to intestinal epithelium inflammation and damage.¹ The pathological process in CD is, however, not limited to the epithelial lining but extends to all components of the GI wall including the enteric nervous system (ENS) whose structure and neurochemical phenotype are altered during active CD.² The major structural abnormalities thus far described in CD include architectural alterations of the plexuses, nerve hypertrophy, and hyperplasia along with alterations of neuronal cell bodies.^{3,4} Regarding neurochemical phenotype, the two most comprehensive studies found an increased number of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive nerve cell bodies in both the myenteric and submucosal plexuses.^{5,6}

The ENS structure and neurochemistry resemble that of the CNS, therefore, pathogenic mechanisms that give rise to CNS disorders might also lead to ENS dysfunction, and *vice versa*.⁷ Over the past two decades, progress in molecular genetics and neuropathology enabled a better understanding of the pathogenesis of neurodegenerative disorders. The observation that abnormal protein accumulation is characteristic of particular disease sets has led to a neuropathological classification according to the composition of the abnormal protein aggregates. The most common neurodegenerative disorders are now classified based on the abnormal accumulation of alpha-synuclein⁸ or tau,⁹ and hence referred to as synucleinopathies (with Parkinson's disease (PD) being the prototypical type) or tauopathies (with Alzheimer's disease (AD) being the most common), respectively.^{10,11} It should be noted, however, that the pathological distinction among these disorders is sometimes not so clear as the co-occurrence of alpha-synuclein and tau deposits has been reported in PD.¹² Several independent studies have shown that enteric neurons, like their CNS counterparts, also express alpha-synuclein¹³⁻¹⁵ and tau^{16,17} and we recently demonstrated that alpha-synuclein is upregulated in inflamed segments of Crohn's colon.¹⁸ These latter findings, together with the results of recent epidemiological^{19,20} and genetical studies,²¹ support the existence of a close relationship between Parkinson's and CD. In contrast to alpha-synuclein, no data are available about the expression and phosphorylation patterns of enteric tau in CD. Here, we examined the expression levels of tau isoforms, their phosphorylation profile and truncation in colon biopsy specimens from CD patients and compared them to samples from controls. Additional

experiments were performed in primary cultures of rat enteric neurons and in nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf2) knockout mice. Our results show the upregulation of two main human tau isoforms in the ENS in CD, which results from a decrease in protein clearance via an Nrf2 pathway. Our findings, which provide the first detailed characterization of tau in CD, suggest that the key proteins involved in neurodegenerative disorders such as alpha-synuclein and tau, might also play a role in CD, and provide mechanistic insights into the events underlying tau and alpha-synuclein accumulation in CD gut.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Participants and human tissues

A total of 38 subjects participated in this study, 16 CD and 6 ulcerative colitis (UC) patients as well as 16 healthy controls who had a normal colonoscopy for colorectal cancer screening (All 6 UC patients, 10/16 CD patients, and 10/16 controls from the current study had their biopsies previously analyzed in 18 for the expression levels of alpha-synuclein). The study protocol was approved by the local Committee on Ethics and Human Research (*Comité de Protection des Personnes Ouest VI*). Written informed consent was obtained from each patient and from each normal volunteer before the endoscopic procedure. All procedures were performed according to the guidelines of the French Ethics Committee for Research on Humans and registered under the no. DC-2008-402. CD and UC patients had four routine biopsies (two in an inflamed and two in a non-inflamed area) taken during the course of a colonoscopy and stored in RA1 buffer (Macherey Nagel, Hoerd, France) until further analysis. For controls, six routine biopsies were taken and also stored in RA1 buffer.²² The inflammatory status of CD and UC biopsies was confirmed by qPCR for TNF- α and IL1- β (Figure S1A).

Samples from five additional CD patients and five controls were used for immunohistochemistry and sarkosyl extraction experiments. FFPE full thickness segments of colon containing the myenteric plexus were obtained from three CD patients and three controls subjects who underwent colonic resection for disease management and nonobstructive colorectal carcinoma, respectively, were used for immunohistochemistry experiments. Frozen full thickness segments of colon from two additional CD patients and two controls were used for sarkosyl extraction experiments. For all control tissues, sampling was performed in macroscopically normal segments of uninvolved resection margins.

Samples of frozen temporal cortex from two postmortem human brains, one with AD and one devoid of neurodegeneration were obtained from the Neuropathology Department of

Angers (Dr Franck Letournel) to serve as a control in sarkosyl extraction experiments.

2.2 | Primary cultures of rat ENS

Primary cultures of rat ENS were generated and cultured as previously described.²³ Cells were treated with 10 μ M of sulforaphane or MG132 (both from Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) for 12 hours.

2.3 | Knockout mice

Nrf2^{-/-} mice were provided by the RIKEN BRC according to an MTA to Prof S. Kerdine-Römer.²⁴ Mice were housed in a pathogen-free facility and handled in accordance with the principles and procedures outlined in Council Directive 86/609/EEC. Genotyping was performed by PCR using genomic DNA that was isolated from tail snips as described.²⁴

2.4 | Protein extraction and Western blot

Two biopsies per patient stored in RA1 buffer were pooled and lysed using the “Precellys 24” tissue homogenizer (Bertin technologies, St Quentin-en-Yvelines, France) followed by sonication with “vibracell 75 186” device (Sonic, Newton CT, USA). Protein and RNA extractions were performed with NucleoSpin Triprep Kit (Macherey-Nagel).

The total proteins were precipitated and prepared for Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) using protein precipitator and resuspension buffer PSB/TCEP (Protein solving buffer and (tris(2-carboxyethyl)phosphine) TCEP reducing agent) from the NucleoSpin Triprep Kit. The elution fraction containing RNA was further used for PCR analysis (see below). Cells (primary culture of rat ENS) and tissues from mice (distal colon) were lysed in RIPA lysis buffer (Merck Millipore, Fontenay-sous-Bois, France) containing phosphatase inhibitor cocktail II (Sigma) and protease inhibitors cocktail (Roche, Neuilly-sur-Seine, France). Equal amounts of tissue or cell lysates were separated and analyzed by Western blot as previously described.¹⁸ Tau protein ladder (Sigma) was used in some experiments as a control. The primary antibodies used are listed in Table 1. Mouse monoclonal anti-PGP 9.5 antibody was used as a pan-neuronal marker (Table 1) and membranes were reprobated with mouse monoclonal anti- β -actin antibody (Table 1) to confirm equal protein loading. For quantification, the relevant immunoreactive bands were quantified with laser-scanning densitometry and analyzed with NIH Image J software. To allow comparison between different films, the density of the bands was expressed as a percentage of the average of controls.

2.5 | Immunohistochemistry

Fixed human tissues from three CD patients and three controls were included in paraffin using an embedding station

TABLE 1 The name, specificity, epitope, source, and dilution of the antibodies used in this study are shown

Name	Specificity	Epitope (a.a)	Source and dilution
A0024 Tau	All tau isoforms	243-441 (2N4R)	Dako, rp (WB 1:1,000; IHC 1:500)
TAU-5	All tau isoforms	210- 241 (2N4R)	Thermo Fisher, mm (WB 1:1,000)
Anti tau RD3	3R tau Isoforms	267-282 (2N3R)	Merck, mm, clone 8E6 (WB 1:1,000)
Anti tau RD4	4R tau isoforms	275-291 (2N4R)	Merck, mm, clone 1E1/A6 (WB 1:1,000)
Anti tau T22	Tau oligomers	NS	Merck, rp (WB 1:2,000; IHC 1:1,000)
PHF13	Tau @ S396	Around Tau @ S396	Cell Signaling, mm (WB 1:1,000)
Tau-421	Truncated tau	Around D421	Merck, mm (WB 1:1,000)
MAP2	MAP2 A,B,C,D	NS	Cell Signaling, rp (WB 1:1,000)
Synapsin I	Synapsin	Around S9	Cell Signaling, rp (WB 1:2,000)
α -synuclein	α -synuclein	NS	Abcam, MJFR1, rm (WB 1:1,000)
GFAP	All GFAP isoforms	Full length GFAP cow	Dako, rp (IHC 1:5,000)
Nrf2	Nrf2	aa 37-336	Santa Cruz, rp (IHC 1:500)
β III-tubulin	β III-tubulin	400 to C-terminus	Abcam, rm (WB 1:1,000, IF 1:500)
PGP 9.5	UCHL1/PGP 9.5	15 aa near the C-terminus	Cedarlane, rp (WB 1:2,000)
β -actin	β -actin	16 aa, N-terminus	Sigma, mm (WB 1:10,000)

Abbreviations: aa, amino-acids; IHC, immunohistochemistry; mm, mouse monoclonal; NS, not specified; rm, rabbit monoclonal; rp, rabbit polyclonal; WB, western blot.

(MICROM MICROTECH STP120, Brignais, France) and sections (5 μm) were performed using a microtome (MICROM HM355S). Immunohistochemistry was performed as described previously¹⁸ using the primary antibodies listed in Table 1. For quantification, analyses were performed with the ImageJ software (NIH, Bethesda, MD). Fluorescence immunohistochemical signals were recorded from each specimen of the control and CD group, respectively. Each myenteric ganglion was marked and the mean grey value (integrated density/ μm^2 ganglionic tissue) was determined.

2.6 | Sarkosyl extraction and ultracentrifugation

For sarkosyl extraction of tau, tissues were homogenized in 50 mM of Tris-buffered saline (TBS, pH 7.4) containing 2 mM of ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), 1 mM of sodium orthovanadate, 10 mM of sodium fluoride, 1 mM of phenylmethylsulfonyl fluoride, and 10% (w/v) sucrose (all from Sigma). Samples were centrifuged at 12 000 *g* for 20 minutes at 4°C to remove cells debris and 10% (v/v) sarkosyl was added to the resultant supernatant to give a final concentration of 1% (v/v). Samples were mixed for 30 minutes at room temperature (20°C), then, centrifuged at 100 000 *g* for 1 hour at 20°C. The supernatant (sarkosyl-soluble tau) was collected and the pellet (sarkosyl-insoluble tau) was washed twice with 1% (v/v) sarkosyl. Proteins in the samples were resolved by PAGE and processed for immunoblotting as described in the Western Blot section.

2.7 | RT-PCR

RNA extraction was performed with NucleoSpin Triprep Kit (Macherey-Nagel) in two-pooled biopsies (see Western Blot section). One μg purified mRNA was denatured and processed for reverse transcription using Superscript III reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Saint-Herblain, France). PCR amplifications were performed using the Absolute Blue SYBR green fluorescein kit (Roche) and run on a StepOnePlus system (Thermo Fisher). The following primers were used: Microtubule-associated protein tau (MAPT), forward: 5'AGAGTCCAGTCGAAGATTGGGTC3'; reverse: 5'GGGTTTCAATCTTTTTATTTCTCC3'. Synuclein alpha (SNCA), forward: 5'CCAAAGAGCAAGTGACAAATGTTG3'; reverse: 5'AGCCAGTGGCTGCTGCAAT3'. TNF- α , forward: 5'CCCAGTGACAAGCCTGTAG3'; reverse: 5'TGAGGTACAGGCCCTCTGAT3'. IL-1 β , forward: 5'GAGCAACAAGTGGTGTCTCC3'; reverse: 5'TTGGGATCTACTCTCCAGC3'. Ribosomal protein S6 (RPS6), forward: 5'AAGCACCAAGATTCAGCGT3'; reverse: 5'TAGCTCCTTCATTCTCTTGGC3'.

2.8 | Statistics

All data shown are mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using GraphPad software version 8.00 (San Diego California, USA). Between-group comparisons were performed using an independent sample *t* test (Mann-Whitney test), Kruskal-Wallis, or Chi-squared test. For association between two variables, Spearman's correlation was performed. Differences were deemed statistically significant when $P < .05$.

3 | RESULTS

The main clinical features of the study population are shown in Figure S1B. CD patients were significantly younger than controls (Figure S1B).

3.1 | Tau expression is increased in Crohn's disease but not in ulcerative colitis

We first analyzed the expression levels of tau in colonic biopsies of CD and controls by Western blot. A significant 8- and 4-fold increase in tau protein expression was observed in the inflamed area of CD patients when compared to controls, after normalization to PGP 9.5, and β -actin, respectively (Figures 1A and S2). By contrast, no significant differences were observed when the non-inflamed area was compared to controls (Figures 1A and S2) and when biopsies of UC patients, either in the inflamed or non-inflamed area were compared to controls (Figure S2). There were no correlations between the expression levels of tau, age, and disease duration (Figure S2). We have recently shown that 1N3R and 0N4R are the two main tau isoforms expressed in the adult human ENS and that these two isoforms are phosphorylated under physiological conditions.¹⁶ Using 3R and 4R isoform-specific antibodies, we found that both 1N3R and 0N4R tau isoforms were upregulated in the inflamed area in CD (Figure 1B). We next examined the phosphorylation state of tau with a phospho-specific antibody that detect tau phosphorylated at Ser396. After normalizing to total tau, the amount of phosphorylated tau was not different between CD samples and controls (Figures 1C and S2). Truncated tau is present in the pathological deposits observed in CNS tauopathies, including progressive supranuclear palsy (PSP) and AD.²⁵ In order to determine whether tau is C-terminally truncated in the enteric neurons in CD, colonic biopsies were analyzed using a monoclonal antibody that specifically recognizes tau cleaved at Asp421 by caspase-3. After normalizing to total tau, the amount of truncated tau was dramatically decreased in CD inflamed area when compared

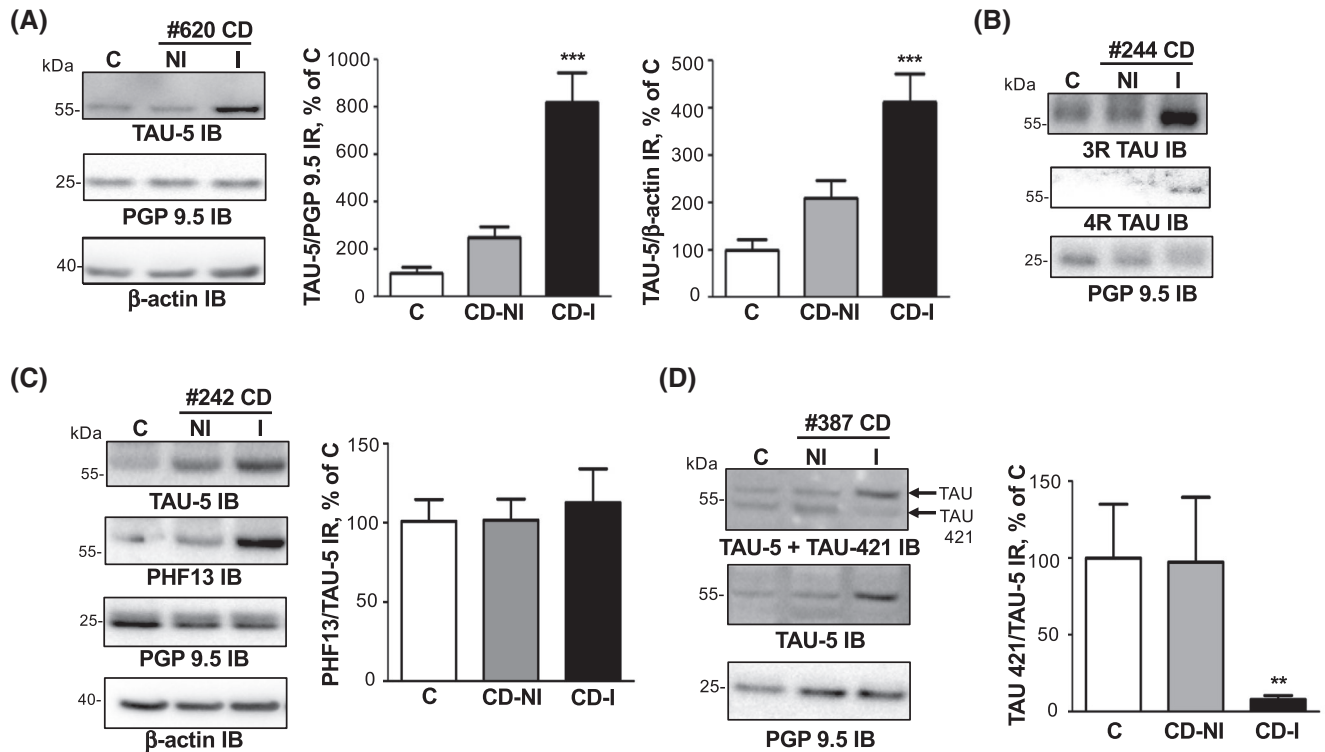


FIGURE 1 Expression levels, phosphorylation state, and truncation of tau protein in colonic biopsies from patients with Crohn's disease. A, Colonic biopsy lysates from 16 Crohn's disease (CD) patients and 16 controls (C) (see Figure S1 for subject details) were immunoblotted with total tau (TAU-5 IB), PGP 9.5 (PGP 9.5 IB), and β -actin (β -actin IB) antibodies. For CD patients, biopsies taken in non-inflammatory (NI, NI-CD) and inflammatory areas (I, I-CD) were analyzed separately. A representative immunoblot is shown (raw immunoblots are provided in Figure S2). Tau-immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of PGP 9.5 and β -actin and expressed as percentage of controls. Data correspond to mean \pm SEM of 16 samples for C and CD, $***P < .001$. B, Representative immunoblots showing the expression of 3R and 4R tau using specific isoforms antibodies (eight CD and eight C were analyzed). C, Colonic biopsies lysates from 10 CD patients (#242, 243, 244, 248, 528, 539, 409, 461, 533, and 620) and 10 C (#190, 191, 192, 193, 194, 195, 330, 344, 345, and 377) were immunoblotted with total tau (TAU-5 IB), tau phosphorylated at serine 396 (PHF13 IB), PGP 9.5 (PGP 9.5 IB), and β -actin (β -actin IB) antibodies. A representative immunoblot is shown (raw immunoblots are provided in Figure S2). Phosphorylated tau immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of total tau, and expressed as percentage of controls. Data correspond to mean \pm SEM of 10 samples for C and CD. D, Colonic biopsies lysates from 16 CD and 16 C were immunoblotted with total tau (TAU-5 IB), truncated tau at Asp 421 (TAU-421), and PGP 9.5 (PGP 9.5 IB) antibodies. In the upper panel, the membrane was probed with both TAU-5 and TAU-421 antibodies. A representative immunoblot is shown (raw immunoblots are provided in Figure S2). TAU-421 immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of total tau, and expressed as percentage of controls. Data correspond to mean \pm SEM of 16 samples for CD and C, $**P < .01$.

to either non-inflamed area or controls (Figures 1D and S2). Additional immunohistochemistry experiments were performed to examine the localization and the expression levels of tau in the myenteric plexus. Colonic myenteric plexus showed intense tau immunoreactivity in both neuronal cell bodies and processes, which nearly completely overlapped beta-tubulin immunostaining (Figure 2A). Quantification of the immunofluorescence showed increased tau immunoreactivity in CD myenteric plexus as compared to controls (Figure 2B). When taken together, these results show that tau expression is increased in both the submucosal and myenteric plexus in CD, without changes in its phosphorylation status. In addition, and despite the relatively small sample size of UC patients, our findings also suggest that unlike CD the expression levels of tau are unaltered in UC.

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

Tau cleaved by caspase-3 at Asp421 is more prone to aggregation and acts as a nidus for aggregation of full-length tau.^{26,27} To examine whether tau upregulation is associated with protein aggregation, we used T22, a recently developed tau oligomer-specific antibody.²⁸ As expected, this antibody detected slower migrating tau bands in AD brain when compared to control brain (Figure S3A). However, no difference in the banding pattern was observed when this antibody was used to compare biopsy lysates from CD and controls (Figure S3B). In CNS tauopathies, the biochemical characterization of pathological tau involves well-standardized protocols based on the use of sarkosyl²⁹

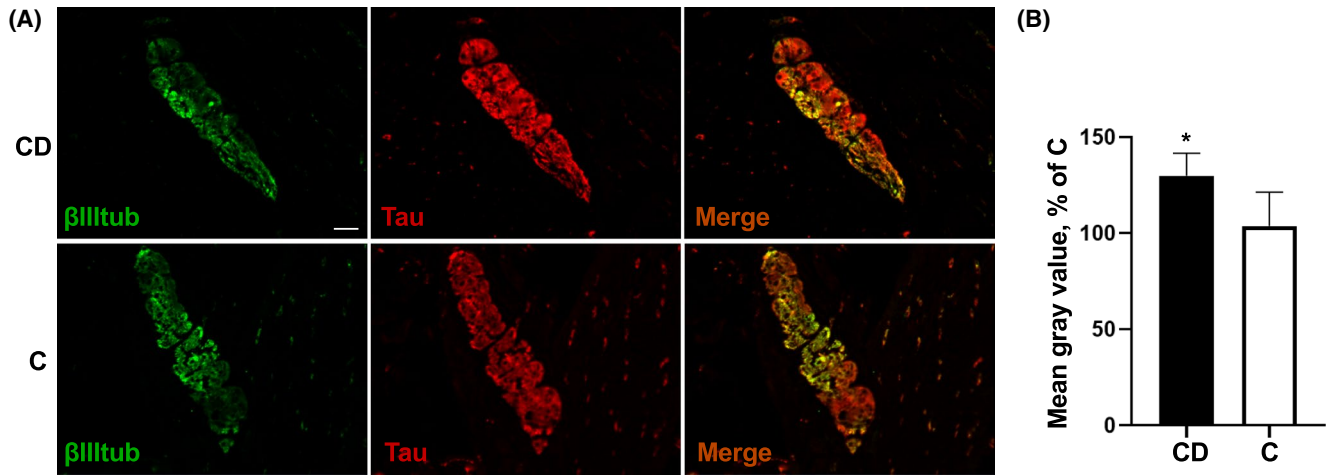


FIGURE 2 Localization and expression levels of tau in the myenteric plexus in Crohn's disease and controls. A, Total tau antibody A0024 (Tau) was used to detect tau in the myenteric ganglia in three CD and three control subjects; beta III-tubulin (β III tub) antibody was used to specifically label neurons. Representative photomicrographs of one CD patient and one control (C) are shown. Scale bar is 50 μ m B, Quantitative analysis of tau immunofluorescence in the myenteric plexus of three C and three CD. Data are shown as corrected mean grey value normalized to controls and presented as mean \pm SEM, $n = 18$, and 17 myenteric ganglia for C and CD, respectively, $*P < .05$

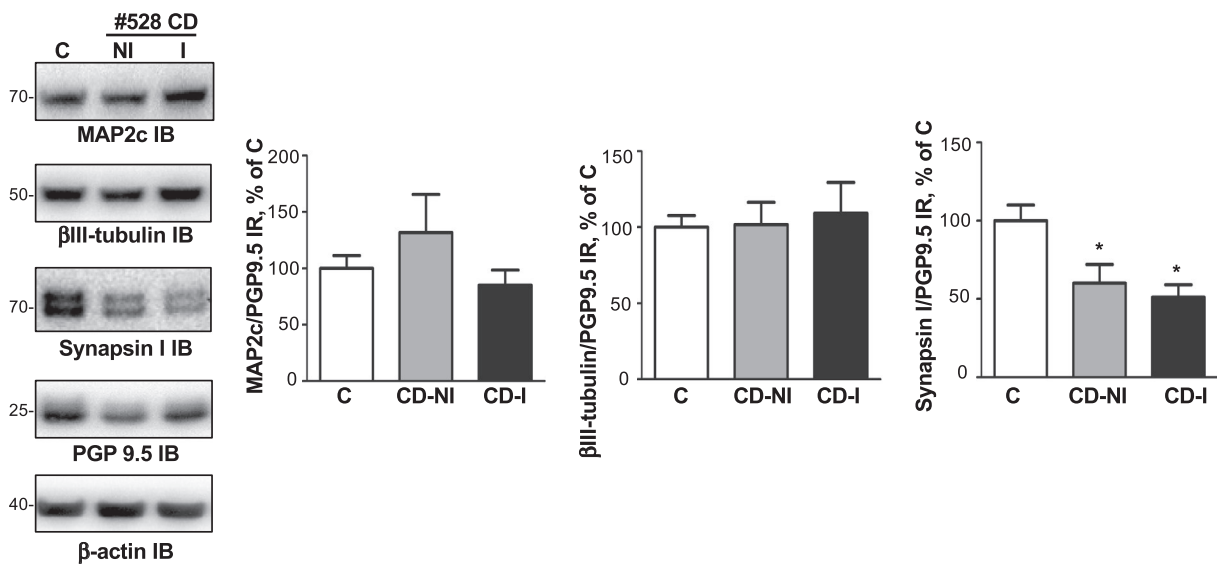


FIGURE 3 Expression levels of MAP2c, synapsin I, and β -III tubulin in colonic biopsies from patients with Crohn's disease. Colonic biopsy lysates from six CD patients (#242, 243, 244, 248, 528, and 539) and six controls (C) were immunoblotted with MAP2c (MAP2c IB), synapsin I (Synapsin I IB), and β -III tubulin (β -actin IB) antibodies. MAP2c, synapsin I, and β -III tubulin immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of PGP9.5, and expressed as percentage control. Data correspond to mean \pm SEM of six samples for C and CD ($*P < .05$)

(Figure S3C). Using this method along with the T22 antibody, we showed that the levels of sarkosyl-insoluble tau was increased in AD when compared to control brain (Figure S3D). In contrast, no sarkosyl-insoluble tau was detected in the GI tract samples from either CD patients or control subjects (Figure S3D). These data suggest that tau upregulation in CD is not associated with more aggregation.

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

To determine whether the upregulation of tau is specific to this microtubule associated protein, we analyzed the expression levels of its sequence homologue MAP2c along with two of its interacting proteins, β III-tubulin, and synapsin

I.^{30,31} Unlike tau, the amounts of MAP2c and β III-Tubulin were not different between CD and controls (Figure 3). By contrast, synapsin I expression was significantly decreased in samples of CD colon when compared to controls (Figure 3).

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

We next sought to determine the mechanisms by which tau is upregulated in CD. Using RT-PCR, we found a decrease in tau mRNA in inflamed-CD samples as compared to controls (Figure 4A). In addition, we did not observe any difference between CD and controls when samples were analyzed by Western Blot for the amounts of TRIM 28, a transcriptional regulator that modulates both alpha-synuclein and tau levels³² (Figure S4A). These results demonstrate that the higher amount of tau observed in CD does not result from an increase in tau transcription and suggest that other mechanisms such as modulation in tau proteostasis might be involved. A sizeable body of evidence have shown that tau could be degraded through the proteasome/ubiquitin pathway or turned over by the autophagy-lysosome pathway.³³ We first investigated the possible role of the proteasome/ubiquitin pathway by analyzing ubiquitin immunoreactivity in whole biopsy lysates by Western blot. The banding pattern was markedly different between CD and controls, with some stronger immunoreactive bands around 15, 25, 35, and 50-60 kDa being observed in inflamed CD samples (Figure S4B). To further investigate the possible contribution of the proteasome to the degradation of tau in enteric neurons, we examined the levels of tau in primary culture of rat ENS in the presence of the

proteasome inhibitor MG132. In line with our previous results, primary cultures of rat ENS express four tau isoforms (0N3R, 1N3R/0N4R, and 2N3R), which migrate as a triplet of 50, 53, and 58 kDa bands on Sodium dodecyl sulfate (SDS) PAGE.¹⁶ Treatment with MG132 decreased the amount of all these tau isoforms (Figure S4C) thereby suggesting that proteasome inhibition is not involved in tau upregulation in enteric neurons.

A recent study showed that the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) decreased the levels of tau by inducing the autophagy adaptor protein nuclear dot protein 52 kDa (NDP52) (also known as CALCOCO2) in CNS neurons.³⁴ When we analyzed the expression levels of Nrf2 and NDP52 in the GI tract, we found significantly lower amounts in CD inflamed samples (Figure 4B). These findings suggest that a downregulation of the Nrf2/NDP52 pathway is involved in tau accumulation in CD inflamed segments. To further investigate the possible role of Nrf2 in enteric tau accumulation, we used a two-pronged approach. First, we treated primary culture of ENS with the Nrf2 activator sulforaphane. We showed that Nrf2 is primarily expressed by enteric glial cells and to a lesser extent by enteric neurons (Figure 5A) and that treatment with sulforaphane induced a significant decrease in the expression levels of all tau isoforms (Figure 5B), without changing its phosphorylation status (Figure 5B). Second, we performed additional experiments in Nrf2-knockout mice, which accumulate tau in their brains in an age-dependent manner.³⁴ When we examined the levels of total and phosphorylated tau in the GI tissues of these mice, we observed a 2-fold increase in tau protein expression in the distal colon of 21-week-old Nrf2 knockout mice in comparison with wild-type mice (Figure 5D). No changes were observed in the distal colon of 11-week-old mice (Figure 5C). Tau

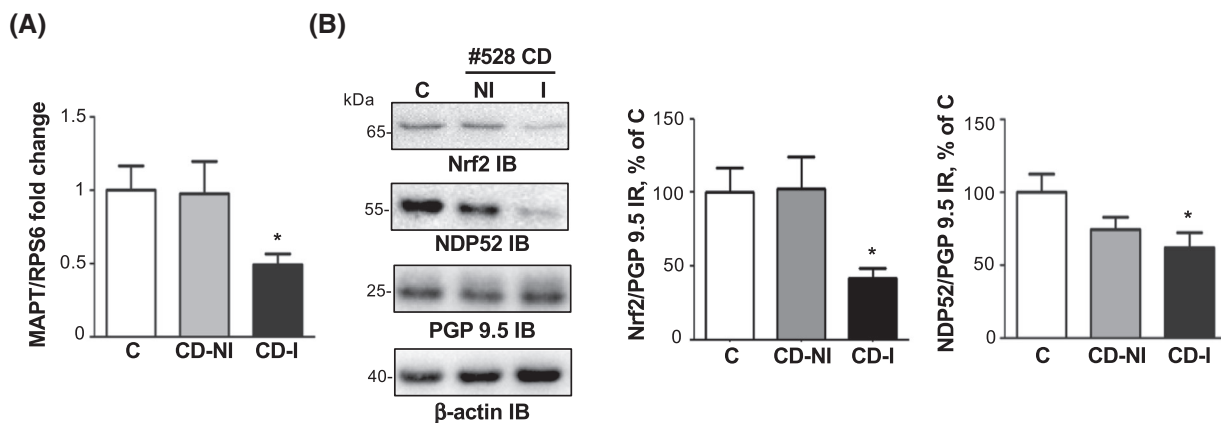


FIGURE 4 Transcriptional regulation of tau and Nrf2/NDP52 expression in Crohn's disease. A, Quantitative PCR analysis of tau mRNA (MAPT) in colonic biopsy from all 16 CD patients (CD-NI and CD-I) and all 16 controls. Values represent mean \pm SEM (n = 16 samples per condition; **P* < .05) B, Expression levels of Nrf2 and NDP52 in CD. Colonic biopsy lysates from eight CD patients (#242, 243, 244, 248, 517, 528, 539, and 620), and eight controls (C) were immunoblotted with Nrf2 (Nrf2 IB), NDP52 (NDP52 IB), PGP 9.5 (PGP 9.5 IB), and β -actin (β -actin IB) antibodies. Nrf2 and NDP52 immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of PGP9.5, and expressed as percentage control. Data correspond to mean \pm SEM of eight samples for C and CD (**P* < .05)

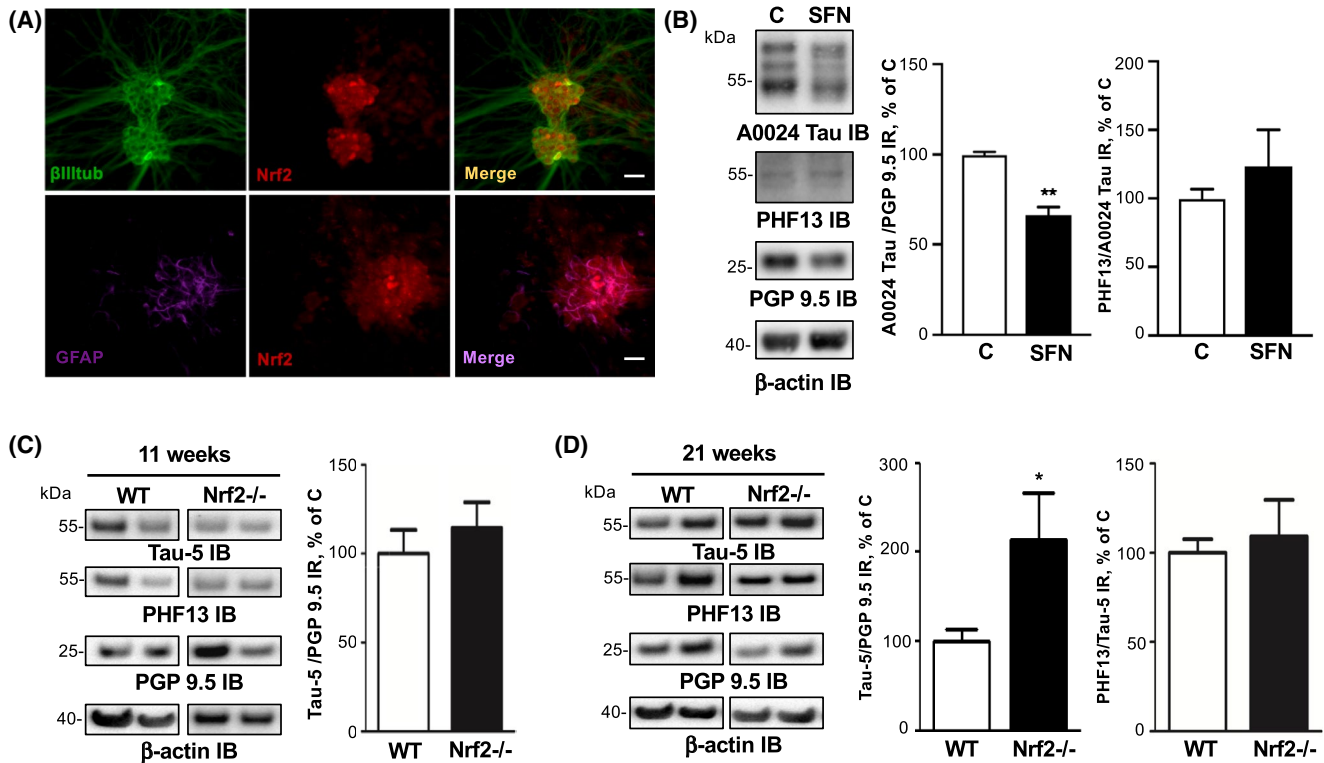


FIGURE 5 Role of Nrf2 in the regulation of enteric tau expression A, Distribution and localization of Nrf2 in primary ENS culture. Primary culture of rat ENS at 14 days in vitro were immunolabeled with anti-Nrf2, anti-βIII tubulin, and anti-GFAP antibodies. Scale bar is 100 μm for the upper panel and 50 μm for the lower panel B, Effects of sulforaphane on the expression levels of tau in primary culture of rat ENS. After 14 days in culture, primary cultures of rat ENS were treated with vehicle (PBS, control) or 10 μM of sulforaphane (SFN). Cell lysates were immunoblotted with total tau (A0024 Tau IB), tau phosphorylated at serine 396 (PHF13 IB), PGP 9.5 (PGP 9.5 IB), and β-actin (β-actin IB) antibodies. Total tau and phosphorylated tau immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of PGP9.5, and total tau, respectively, and expressed as percentage of controls. Values represent mean ± SEM (n = 8; treated vs control; ***P* < .01) C, D, Distal colon lysates obtained from Nrf2^{-/-} (11-week-old, two male and one female; 21-week-old, three male) or wild-type (WT, 11 months old, three male; 21-week-old, one female and two male) mice were immunoblotted with total tau (TAU-5 IB), tau phosphorylated at serine 396 (PHF13 IB), PGP 9.5 (PGP 9.5 IB), and β-actin (β-actin IB) antibodies. Total tau and phosphorylated tau immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of PGP9.5 and total tau, respectively, and expressed as percentage of controls (**P* < .05)

phosphorylation levels were similar between Nrf2 knockout mice in comparison with wild-type mice, regardless of age (Figure 5C,D). Taken together, these findings show that tau upregulation in CD gut is not transcriptionally regulated but instead likely results from a decrease in protein clearance via an Nrf2 pathway.

3.5 | Alpha-synuclein and tau are similarly regulated in CD

We previously used the colonic samples from 10/16 CD patients and 10/10 controls to show that alpha-synuclein was upregulated in CD inflamed area.¹⁸ We extend these previous findings by showing that alpha-synuclein mRNA expression is downregulated in CD (Figure 6A) and that it correlated with the amount of tau mRNA (Figure 6B). Such a positive correlation was also observed at the protein level (Figure 6C). Finally, we showed that, as with tau, treatment of primary

culture of ENS with sulforaphane-induced reduction of alpha-synuclein and that the expression of alpha-synuclein was higher in the distal colon of 21-week-old Nrf2 knockout mice when compared to wild-type mice (Figure 6D). Thus, alpha-synuclein and tau are similarly regulated in CD gut.

4 | DISCUSSION

We have recently shown that the isoform profile of tau differed between the ENS and the CNS, with 1N3R and 0N4R being the two main tau isoforms expressed in adult human enteric neurons.¹⁶ In addition, we did not observe any changes in tau expression, phosphorylation, or truncation of colonic samples from patients suffering from the prototypical tauopathy PSP. These results, along with the findings from a recent comprehensive autopsy survey¹⁷ strongly suggest that unlike PD, the pathological process in tauopathies such as AD and PSP is limited to the CNS and does not involve the ENS.

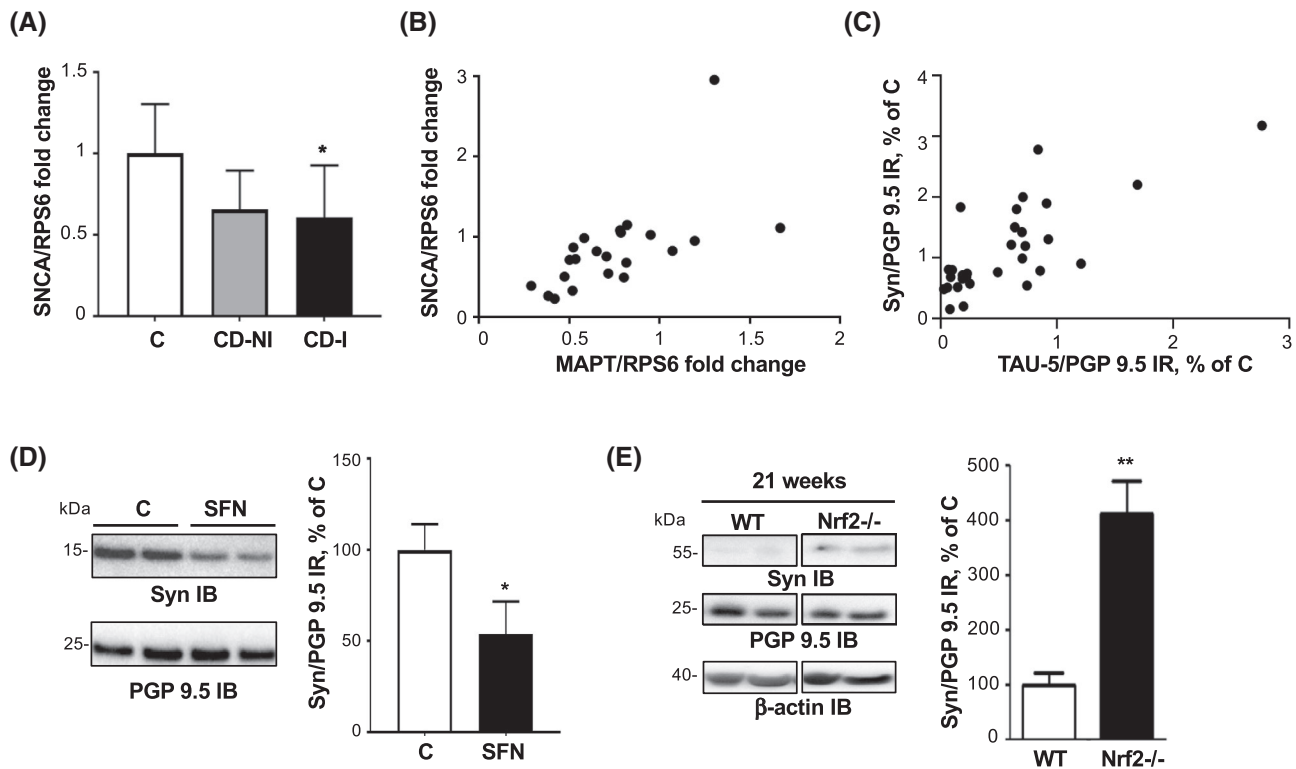


FIGURE 6 Expression level of enteric alpha-synuclein and its correlation with tau. A, Quantitative PCR analysis of alpha-synuclein mRNA (SNCA) in colonic biopsy from seven CD patients (CD-NI and CD-I, #248, 381, 409, 461, 539, and 620) and seven controls (#191, 194, 330, 335, 345, 377, and 477) B, Correlation between SNCA and MAPT mRNA expression levels in colonic biopsy from seven CD patients (CD-NI and CD-I, #248, 381, 409, 461, 539, and 620) and seven controls (#191, 194, 330, 335, 345, 377, and 477) ($r = 0.73$; $P < .0001$) C, Correlation between alpha-synuclein and tau protein expression levels in colonic biopsy from 10 CD patients (CD-NI and CD-I, #381, 387, 409, 436, 458, 461, 516, 517, 533, and 620) and 10 controls (#330, 335, 344, 345, 359, 377, 428, 430, 450, and 456) ($r = 0.67$; $P < .0001$) D, Effects of sulforaphane on the expression levels of alpha-synuclein in primary culture of rat ENS. After 14 days in culture, primary culture of rat ENS were treated with vehicle (PBS, control) or 10 μ M of sulforaphane (SFN). Cell lysates were immunoblotted with alpha-synuclein (Syn IB), PGP 9.5 (PGP 9.5 IB), and β -actin (β -actin IB) antibodies. Alpha-synuclein immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of PGP9.5, and expressed as percentage of controls. Values represent mean \pm SEM ($n = 6$; treated vs control; $*P < .05$) E, Distal colon lysates obtained from Nrf2^{-/-} (21-week-old, three male) or wild-type (WT; 21-week-old, one female and two male) mice were immunoblotted with alpha-synuclein (Syn IB), PGP 9.5 (PGP 9.5 IB), and β -actin (β -actin IB) antibodies. Alpha-synuclein immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of PGP9.5, and expressed as percentage of controls (** $P < .01$)

We therefore set out to examine the expression levels and phosphorylation state of tau in CD, an inflammatory bowel disease that has been consistently associated with ENS abnormalities.⁴ We found that the expression levels of enteric tau isoforms are dramatically increased in the colon of CD patients and that this upregulation is likely mediated through the Nrf2/NDP52 pathway. By contrast, no changes in the expression levels of tau was observed in UC.

The ENS may be involved in inflammatory bowel disease as a result of tissue injury, or via the effects of soluble mediators of the inflammatory process including cytokines, arachidonic acid metabolites, and oxygen-derived free radicals. Although changes in the morphology of the ENS have been described in both CD and UC, structural changes are more pronounced in CD than in UC (reviewed in 4,35). In this study, synapsin I, a neuronal phosphoprotein associated with the cytoplasmic surface of synaptic vesicles, was significantly

decreased in samples of CD colon. These findings are in line with previous observations that showed severe and extensive submucosal axonal necrosis in the ileum and colon in CD but not in UC.³⁶ This axonal necrosis may also explain the observed decrease in tau mRNAs, which are transported along the axon to be translated in situ in the axon terminals.³⁷

Numerous proteases, such as aminopeptidases, calpains, and caspases have been shown to proteolyze tau, however, most of these enzymes do not appear to be principally responsible for tau clearance. It is therefore unlikely that the sole decrease in tau truncation at Asp 421 in CD is sufficient to induce overexpression. The bulk of clearance of both physiological and pathological forms of tau is instead mediated by the proteasomal and autophagic degradative systems.^{33,38} While several reports suggested that tau could be degraded through the proteasome, others did not confirm this observation and even observed increased tau clearance

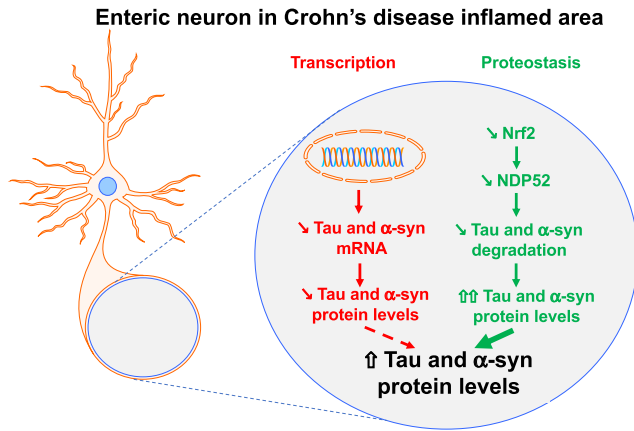


FIGURE 7 Proposed mechanisms for increased tau and alpha-synuclein expression in enteric neurons in CD. In the gut and more specifically in the ENS, both tau and alpha-synuclein are abundantly expressed in enteric neurons. Our current and previous findings show that, despite a decrease in their mRNA levels, both tau and alpha-synuclein proteins are upregulated in the ENS of CD patients. We propose that the decrease in mRNA observed in CD is counterbalanced and even overwhelmed by a marked fall in the degradation of both proteins (at least in part via a decreased activity of the Nrf2/NDP52 autophagic pathway), resulting in tau and alpha-synuclein proteins accumulation. Motifolio drawing toolkits (<http://www.motifolio.com/>) were utilized in the figure

in the presence of proteasome inhibitors in primary cortical neurons.^{34,39} Our findings obtained in primary cultures of ENS, which showed a decreased tau in the presence of the proteasome inhibitor MG132 are, therefore, in line with this latter observation. Although we could not exclude completely a role for other pathways, our data strongly indicate that the Nrf2/NDP52 autophagic pathway is involved in the accumulation of tau in CD (Figure 7). As the Nrf2 signaling system plays a key role in the maintenance of cellular homeostasis under stress, inflammatory, carcinogenic, and pro-apoptotic conditions, it seems quite logical to observe a decreased expression of Nrf2 in CD.⁴⁰ It should be however mentioned that, as far as we know, our study is the first to show that Nrf2 is downregulated in inflammatory bowel disease. Our observation reinforces the findings obtained in rodents, in which activating and/or upregulating Nrf2 alleviated DSS-induced colitis,^{41,42} thereby suggesting that reinforcing Nrf2 could be a potential therapeutic option for inflammatory bowel disease patients.

Hyperphosphorylation, truncation, and aggregation of tau are characteristic features of the pathological deposits observed in CNS tauopathies.³⁸ Using specific antibodies and sequential extraction/ultracentrifugation, we did not find evidence of tau pathological forms in the inflamed zone in CD (we even observed a decrease in the amount of truncated tau). These findings are in keeping with the ones we obtained with alpha-synuclein, which is overexpressed but not aggregated in the ENS in CD.^{18,43} One obvious limitation of our work

is that the neuronal density in the ENS is rather low and that most of the analyses for the current study were essentially restricted to the analysis of the submucosal plexus. We can therefore not rule out that the absence of overt pathological changes in tau in colonic samples from our CD patients may be due to this limited regional analysis and perhaps different findings would have been obtained had we examined larger GI samples or used more sensitive approach such as protein misfolding cyclic amplification.⁴⁴

The growing body of evidence suggesting that GI inflammation is involved in the development of PD recently led us to investigate the effects of inflammation on alpha-synuclein expression in primary culture of rat ENS.²³ We showed that two of the pro-inflammatory cytokines that are elevated in CD (Figure S1), namely TNF- α and IL-1 β , induced a down-regulation of alpha-synuclein expression at both mRNA and protein levels in enteric neurons.²³ Similar findings were observed when tau mRNA and protein were analyzed (our unpublished results). These observations are consistent with our current findings, which show a decrease of both alpha-synuclein and tau mRNA in the inflamed area in CD. They also suggest that the upregulation of alpha-synuclein and tau proteins in inflamed CD sample is not the mere consequence of inflammation on transcription and translation but likely results from a more complex process involving proteostasis regulation (Figure 7).

Our current and previous findings demonstrate that both tau and alpha-synuclein, which are critically involved in neurodegenerative disorders are upregulated in CD further reinforcing the possible link between inflammatory bowel disease and neurodegenerative disorders.⁴⁵ Some recent observations not only showed that PD and inflammatory bowel disease are epidemiologically,⁴⁶ but also genetically linked. The Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) gene, which has emerged as the gene most commonly associated with both familial and sporadic PD, has been subsequently identified by as a major susceptibility gene for CD.²¹ Quite interestingly, molecular and neuropathological links between tau and LRRK2 have also been demonstrated: (i) LRRK2 binds to and phosphorylates tau,^{47,48} (ii) tau is a prominent pathology in LRRK2 PD as well as in mice that overexpress mutated forms of LRRK2,^{49,50} and (iii) LRRK2 promotes tau accumulation and aggregation and enhances the neuronal transmission of tau in the mouse brain.^{47,51} It remains, however, to be determined why only a subset of patients with inflammatory bowel disease and GI inflammation will eventually develop a neurodegenerative disorder. A recent opinion paper has proposed that PD pathogenesis can be divided into three temporal phases: “triggers,” which set off the disease process in the brain and/or peripheral tissues, “facilitators” that help triggers access the nervous system or spread the pathology within the CNS and “aggravators,” which may for instance

increase alpha-synuclein spreading.⁵² In such a scenario, it can be suggested that GI inflammation may act as a facilitator.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by centre d'entraide et de coordination des associations de parkinsoniens (CECAP) and Parkinsonien de Vendée (FFGP) to AP, AGL, and PD.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no actual or potential conflict of interest.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

P. Derkinderen, M. Rolli-Derkinderen, Michel Neunlist, and S. Kerdine-Römer designed research; A. Prigent, G. Chapelet, A. De Guilhem de Lataillade, T. Oullier, E. Durieu, and K. Hardonnière performed research; A. Bourreille and E. Duchalais supervised biobanking; P. Derkinderen, M. Rolli-Derkinderen, and W. Noble wrote the paper.

REFERENCES

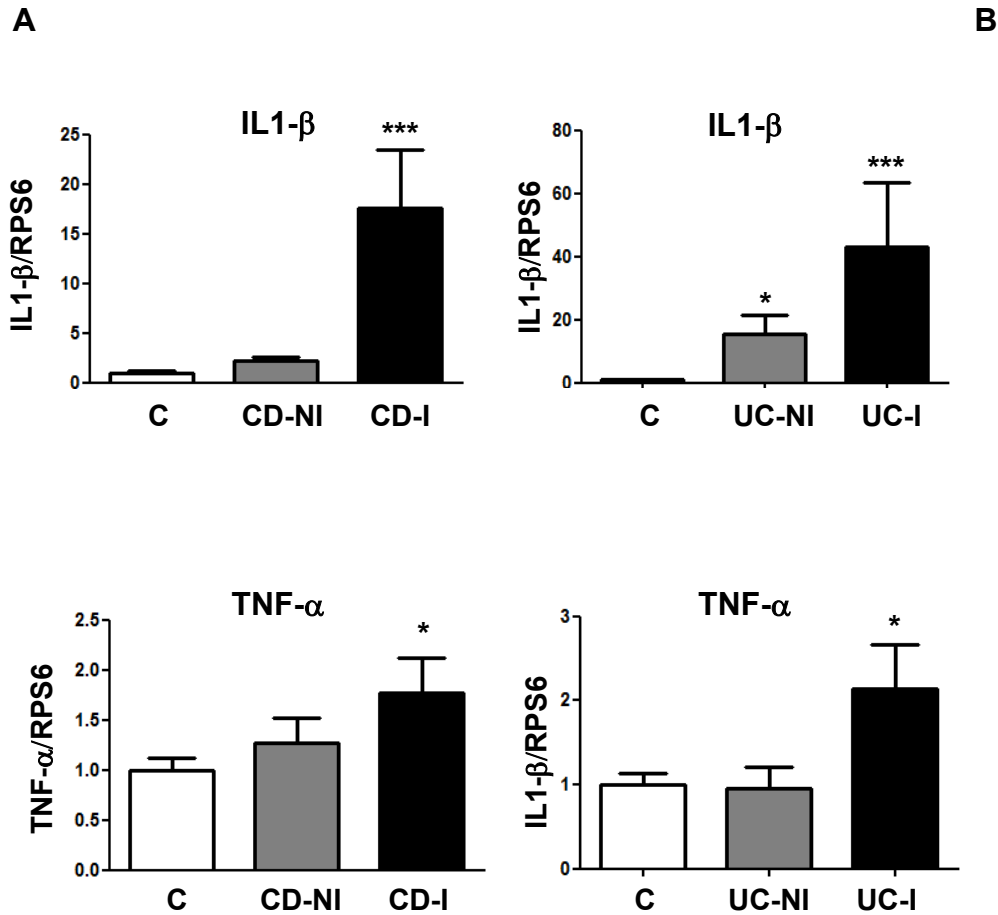
- Torres J, Mehandru S, Colombel J-F, Peyrin-Biroulet L. Crohn's disease. *Lancet*. 2017;389:1741-1755.
- Brierley SM, Linden DR. Neuroplasticity and dysfunction after gastrointestinal inflammation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11:611-627.
- Oehmichen M, Reifferscheid P. Intramural ganglion cell degeneration in inflammatory bowel disease. *Digestion*. 1977;15:482-496.
- Geboes K, Collins S. Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Neurogastroenterol Motil*. 1998;10:189-202.
- Belai A, Boulos PB, Robson T, Burnstock G. Neurochemical coding in the small intestine of patients with Crohn's disease. *Gut*. 1997;40:767-774.
- 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;13:255-264.
- Derkinderen P, Rouaud T, Lebouvier T, Bruley des Varannes S, Neunlist M, De Giorgio R. Parkinson disease: the enteric nervous system spills its guts. *Neurology*. 2011;77:1761-1767.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997;388:839-840.
- Brion JP, Flament-Durand J, Dustin P. Alzheimer's disease and tau proteins. *Lancet*. 1986;2:1098.
- Spillantini MG, Goedert M. Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci*. 1998;21:428-433.
- Galvin JE, Lee VM, Trojanowski JQ. Synucleinopathies: clinical and pathological implications. *Arch Neurol*. 2001;58:186-190.
- Sengupta U, Guerrero-Muñoz MJ, Castillo-Carranza DL, et al. Pathological interface between oligomeric alpha-synuclein and tau in synucleinopathies. *Biol Psychiatry*. 2015;78:672-683.
- Böttner M, Zorenkov D, Hellwig I, et al. Expression pattern and localization of alpha-synuclein in the human enteric nervous system. *Neurobiol Dis*. 2012;48:474-480.
- Preterre C, Corbillé A-G, Balloy G, Letournel F, Neunlist M, Derkinderen P. Optimizing western blots for the detection of endogenous α -synuclein in the enteric nervous system. *J Parkinsons Dis*. 2015;5:765-772.
- Corbillé A-G, Preterre C, Rolli-Derkinderen M, et al. Biochemical analysis of α -synuclein extracted from control and Parkinson's disease colonic biopsies. *Neurosci Lett*. 2017;641:81-86.
- Lionnet A, Wade MA, Corbillé A-G, et al. Characterisation of tau in the human and rodent enteric nervous system under physiological conditions and in tauopathy. *Acta Neuropathol Commun*. 2018;6:65.
- Dugger BN, Hoffman BR, Scroggins A, et al. Tau immunoreactivity in peripheral tissues of human aging and select tauopathies. *Neurosci Lett*. 2019;696:132-139.
- Prigent A, Lionnet A, Durieu E, et al. Enteric alpha-synuclein expression is increased in Crohn's disease. *Acta Neuropathol*. 2019;137:359-361.
- Lin J-C, Lin C-S, Hsu C-W, Lin C-L, Kao C-H. Association between Parkinson's disease and inflammatory bowel disease: a nationwide Taiwanese retrospective cohort study. *Inflamm Bowel Dis*. 2016;22:1049-1055.
- Weimers P, Halfvarson J, Sachs MC, et al. Inflammatory bowel disease and Parkinson's disease: a nationwide Swedish cohort study. *Inflamm Bowel Dis*. 2019;25:111-123.
- Hui KY, Fernandez-Hernandez H, Hu J, et al. Functional variants in the LRRK2 gene confer shared effects on risk for Crohn's disease and Parkinson's disease. *Sci Transl Med*. 2018;10.
- 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.
- Prigent A, Gonzales J, Durand T, et al. Acute inflammation down-regulates alpha-synuclein expression in enteric neurons. *J Neurochem*. 2019;148:746-760.
- Itoh K, Chiba T, Takahashi S, et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;236:313-322.
- Newman J, Rissman RA, Sarsoza F, et al. Caspase-cleaved tau accumulation in neurodegenerative diseases associated with tau and alpha-synuclein pathology. *Acta Neuropathol*. 2005;110:135-144.
- Gamblin TC, Chen F, Zambrano A, et al. Caspase cleavage of tau: Linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:10032-10037.
- Rissman RA, Poon WW, Blurton-Jones M, et al. Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. *J Clin Invest*. 2004;114:121-130.
- Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, et al. Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease. *FASEB J*. 2012;26:1946-1959.
- Greenberg SG, Davies P. A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:5827-5831.
- Littauer UZ, Giveon D, Thierauf M, Ginzburg I, Ponstingl H. Common and distinct tubulin binding sites for microtubule-associated proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:7162-7166.
- Liu C, Song X, Nisbet R, Götz J. Co-immunoprecipitation with tau isoform-specific antibodies reveals distinct protein interactions and highlights a putative role for 2N tau in disease. *J Biol Chem*. 2016;291:8173-8188.

32. Rousseaux MW, de Haro M, Lasagna-Reeves CA, et al. TRIM28 regulates the nuclear accumulation and toxicity of both alpha-synuclein and tau. *eLife*. 2016;5.
33. Chesser AS, Pritchard SM, Johnson GVW. Tau clearance mechanisms and their possible role in the pathogenesis of Alzheimer disease. *Front Neurol*. 2013;4:122.
34. Jo C, Gundemir S, Pritchard S, Jin YN, Rahman I, Johnson GVW. Nrf2 reduces levels of phosphorylated tau protein by inducing autophagy adaptor protein NDP52. *Nat Commun*. 2014;5:3496.
35. Lakhan SE, Kirchgessner A. Neuroinflammation in inflammatory bowel disease. *J Neuroinflammation*. 2010;7:37.
36. Dvorak AM, Onderdonk AB, McLeod RS, et al. Axonal necrosis of enteric autonomic nerves in continent ileal pouches. Possible implications for pathogenesis of Crohn's disease. *Ann Surg*. 1993;217:260-271.
37. Aronov S, Aranda G, Behar L, Ginzburg I. Visualization of translated tau protein in the axons of neuronal P19 cells and characterization of tau RNP granules. *J Cell Sci*. 2002;115:3817-3827.
38. Guo T, Noble W, Hanger DP. Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol*. 2017;133:665-704.
39. Krüger U, Wang Y, Kumar S, Mandelkow E-M. Autophagic degradation of tau in primary neurons and its enhancement by trehalose. *Neurobiol Aging*. 2012;33:2291-2305.
40. Bellezza I, Giambanco I, Minelli A, Donato R. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2018;1865:721-733.
41. Wang R, Luo Y, Lu Y, et al. Maggot extracts alleviate inflammation and oxidative stress in acute experimental colitis via the activation of Nrf2. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:4703253.
42. Zhang Y, Yan T, Sun D, et al. Rutaecarpine inhibits KEAP1-NRF2 interaction to activate NRF2 and ameliorate dextran sulfate sodium-induced colitis. *Free Radic Biol Med*. 2019;148:33-41.
43. Fenyi A, Leclaire-Visonneau L, Clairembault T, et al. Detection of alpha-synuclein aggregates in gastrointestinal biopsies by protein misfolding cyclic amplification. *Neurobiol Dis*. 2019;129:38-43.
44. Meyer V, Dinkel PD, Rickman Hager E, Margittai M. Amplification of tau fibrils from minute quantities of seeds. *Biochemistry*. 2014;53:5804-5809.
45. Rolli-Derkinderen M, Leclair-Visonneau L, Bourreille A, Coron E, Neunlist M, Derkinderen P. Is Parkinson's disease a chronic low-grade inflammatory bowel disease? *J Neurol*. 2019. <https://doi.org/10.1007/s00415-019-09321-0>.
46. Zhu F, Li C, Gong J, Zhu W, Gu L, Li N. The risk of Parkinson's disease in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Dig Liver Dis*. 2019;51:38-42.
47. Guerreiro PS, Gerhardt E, Lopes da Fonseca T, Bähr M, Outeiro TF, Eckermann K. LRRK2 promotes tau accumulation, aggregation and release. *Mol Neurobiol*. 2016;53:3124-3135.
48. Bailey RM, Covy JP, Melrose HL, et al. LRRK2 phosphorylates novel tau epitopes and promotes tauopathy. *Acta Neuropathol*. 2013;126:809-827.
49. Henderson MX, Sengupta M, Trojanowski JQ, Lee VMY. Alzheimer's disease tau is a prominent pathology in LRRK2 Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun*. 2019;7:183.
50. Melrose HL, Dächsel JC, Behrouz B, et al. Impaired dopaminergic neurotransmission and microtubule-associated protein tau alterations in human LRRK2 transgenic mice. *Neurobiol Dis*. 2010;40:503-517.
51. Nguyen APT, Daniel G, Valdés P, Islam MS, Schneider BL, Moore DJ. G2019S LRRK2 enhances the neuronal transmission of tau in the mouse brain. *Hum Mol Genet*. 2018;27:120-134.
52. Johnson ME, Stecher B, Labrie V, Brundin L, Brundin P. Triggers, facilitators, and aggravators: redefining Parkinson's disease pathogenesis. *Trends Neurosci*. 2019;42:4-13.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the Supporting Information section.

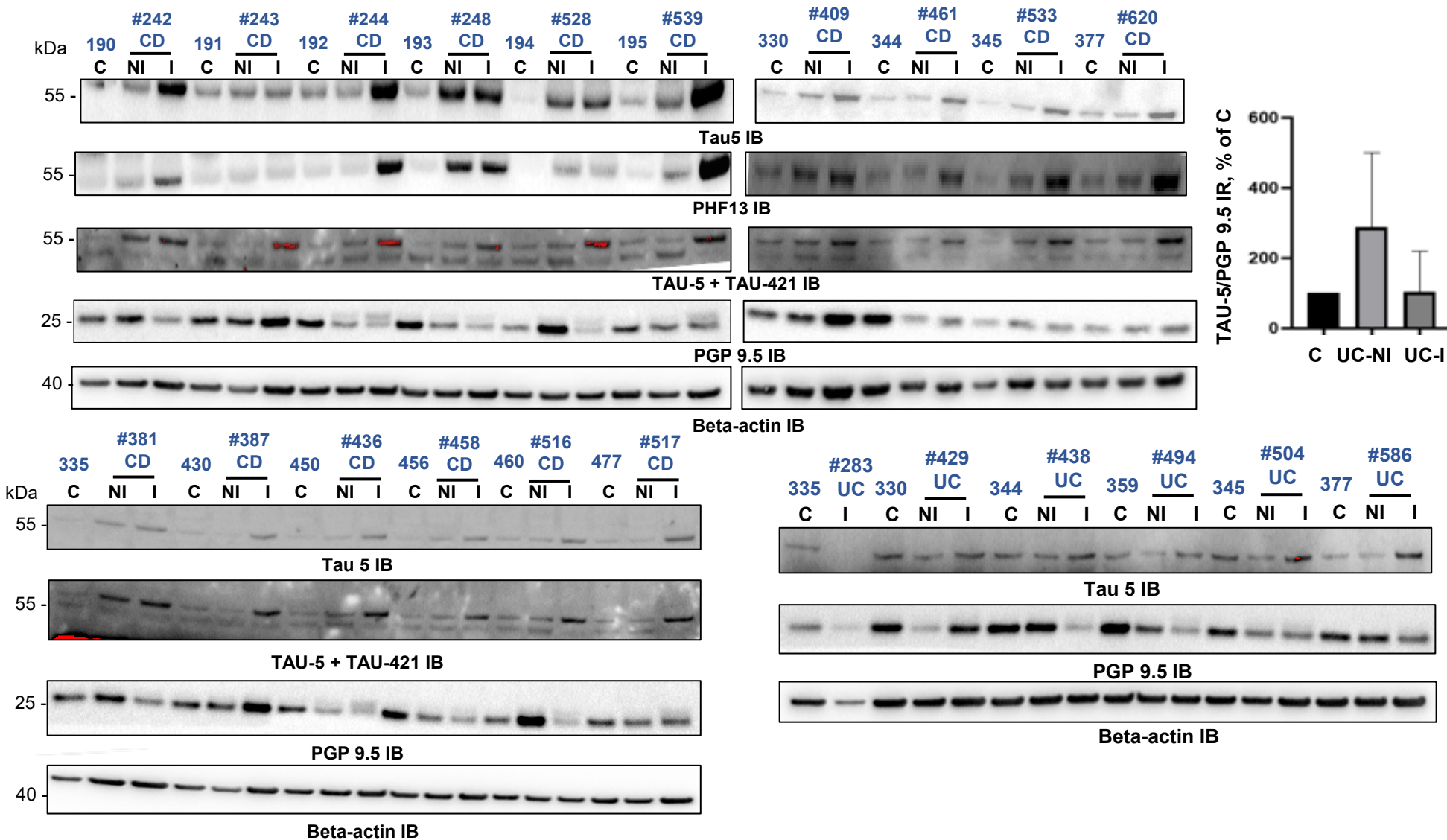
How to cite this article: Prigent A, Chapelet G, De Guilhem de Lataillade A, et al. Tau accumulates in Crohn's disease gut. *The FASEB Journal*. 2020;34: 9285–9296. <https://doi.org/10.1096/fj.202000414R>



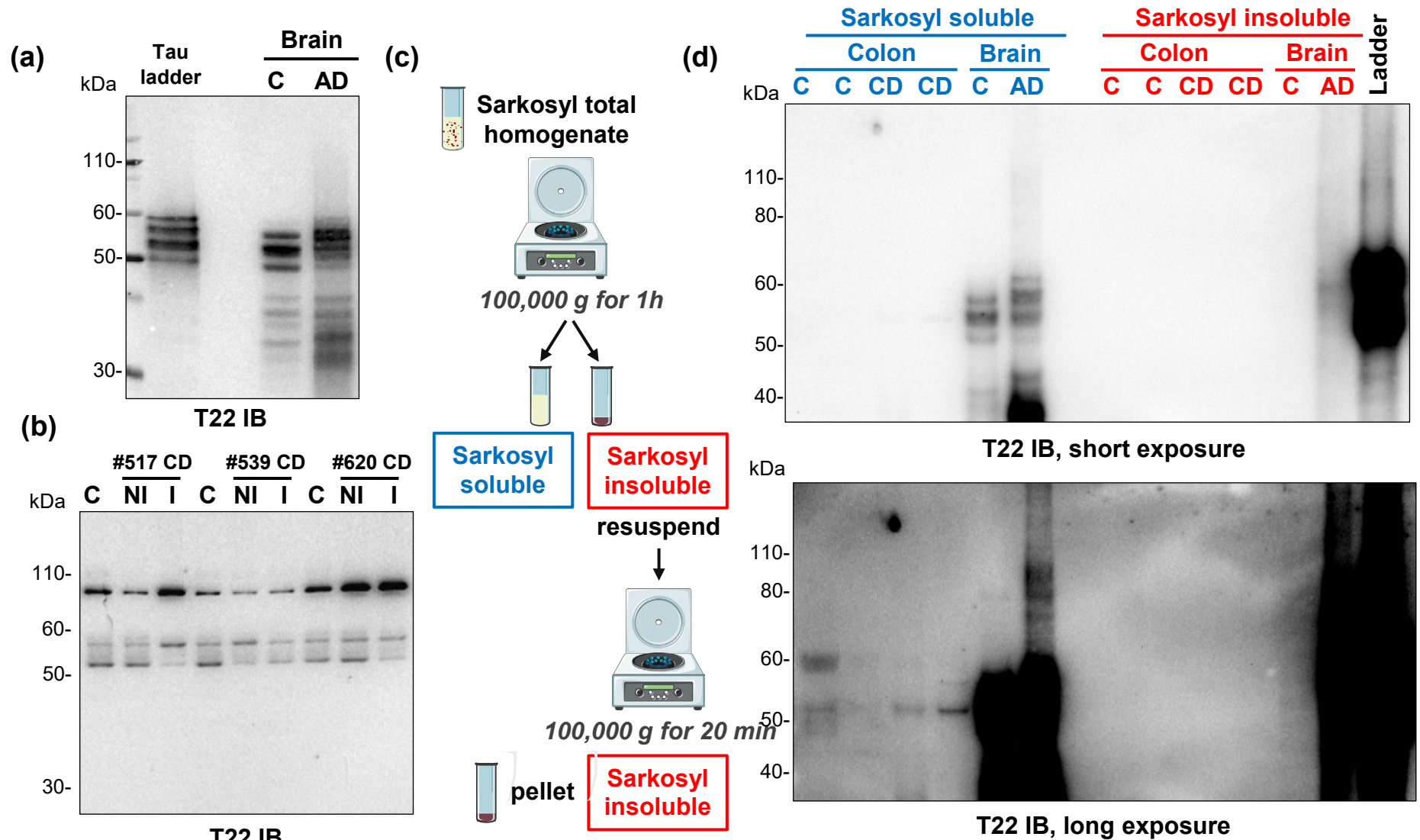
Supplementary Figure 1. A, Quantitative PCR analysis of IL1- β and TNF- α mRNA in colonic biopsy from all 16 CD patients (CD-NI and CD-I), all 6 UC patients (UC-NI and UC-I) and all 16 controls. Values represent mean \pm SEM (*p<0.05 ; ***p<0.001) **B,** Subjects' demographics and treatments. 5-ASA: 5-aminosalicylic acid; anti-TNF: anti-TNF-a; cortico: corticosteroids; IMS: immunosuppressive therapy; UC: ulcerative colitis; UNK: unknown. CD patients were significantly younger than controls (Age, mean \pm SD 33.6 \pm 9.5 vs 52.0 \pm 15.1, p< 0.001)

B

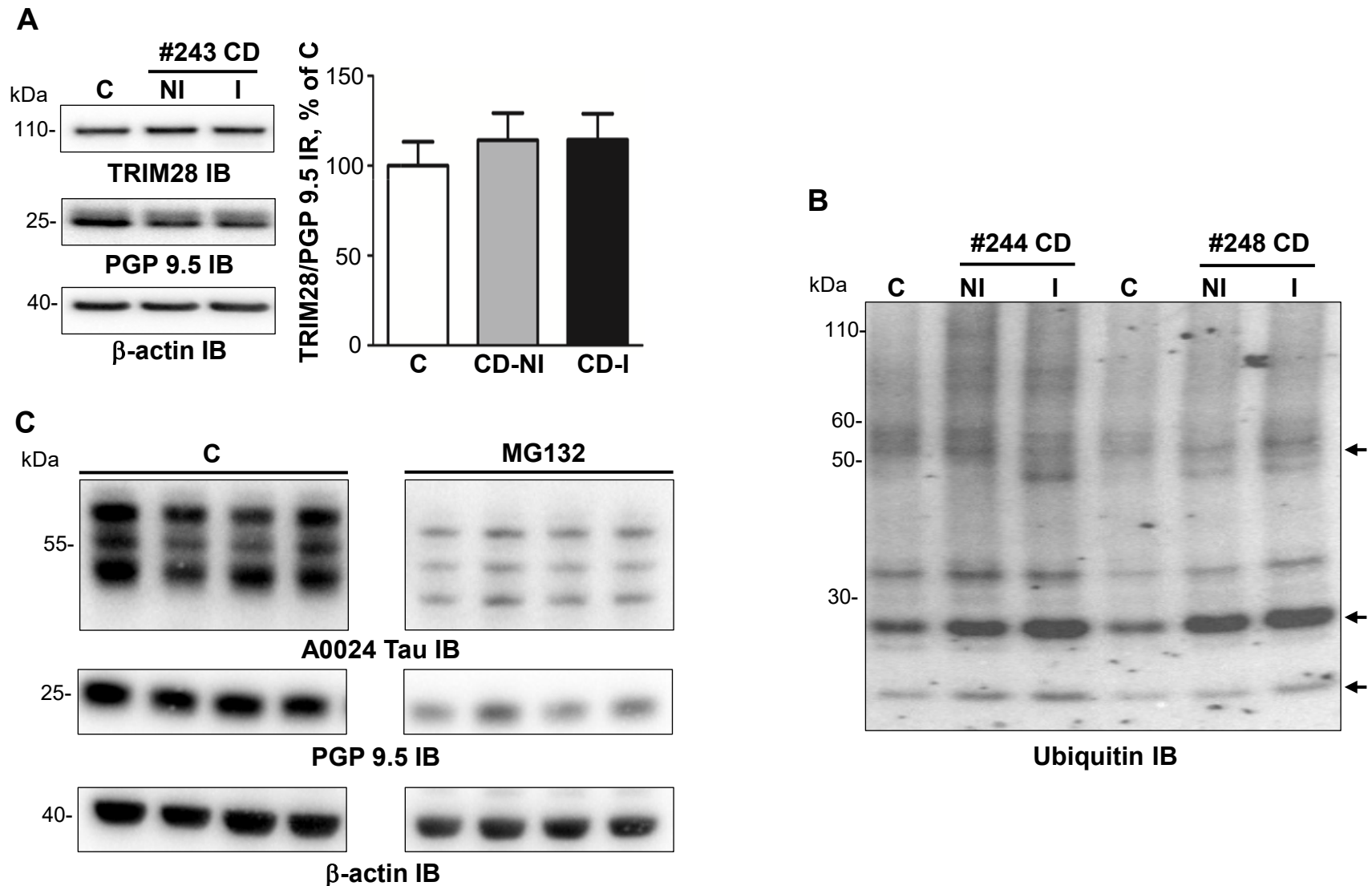
Patient #	Diagnosis	Age	Sex	Disease duration (y)	Treatment
242	CD	23	F	6	IMS
243	CD	52	F	8	cortico + 5-ASA
244	CD	31	M	3	IMS
248	CD	45	F	22	antiTNF
381	CD	34	M	8	IMS
387	CD	43	F	UNK	antiTNF
409	CD	34	M	UNK	antiTNF
436	CD	20	M	6	antiTNF
458	CD	38	F	UNK	None for 2 years
461	CD	35	M	6	antiTNF
516	CD	39	M	18	antiTNF - IMS
517	CD	22	M	8	antiTNF
528	CD	21	F	9	5-ASA
533	CD	24	M	7	antiTNF - IMS
539	CD	39	M	19	antiTNF+ IMS
620	CD	38	F	12	None for 2 years
283	UC	31	F	11	5-ASA
429	UC	45	M	UNK	IMS
438	UC	36	F	6	5-ASA
494	UC	37	F	3	antiTNF
504	UC	49	M	13	antiTNF - 5-ASA
586	UC	38	M	4	antiTNF - 5-ASA
190	Control	51	M	-	-
191	Control	64	M	-	-
192	Control	70	F	-	-
193	Control	72	F	-	-
194	Control	63	F	-	-
195	Control	61	F	-	-
330	Control	55	M	-	-
335	Control	73	F	-	-
344	Control	41	F	-	-
345	Control	48	F	-	-
377	Control	48	F	-	-
430	Control	41	F	-	-
450	Control	49	M	-	-
456	Control	47	F	-	-
460	Control	31	F	-	-
477	Control	18	F	-	-



Supplementary Figure 2. Raw immunoblot data for CD and UC patients and quantification for UC patients. No correlation was observed between the amount of tau (Tau5/PGP 9.5) and age (Table S1) for CD, $r_s=0.39$; $p=0.15$. No correlation was observed between the amount of tau (Tau5/PGP 9.5) and disease duration (Table S1) for CD, $r_s=0.17$; $p=0.57$



Supplementary figure 3. Analysis of sarkosyl-insoluble tau and oligomeric forms of tau in colonic biopsies from patients with Crohn's disease. (a) Lysates from control (C) and Alzheimer's disease (AD) brains served as controls to ensure that the immunoreactive pattern observed with T22 was different in AD brain when compared to control brain. (b) Colonic biopsy lysates from 3 CD patients (#517, 539 and 620) and 3 controls (C) were subjected to immunoblot analysis using Tau T22 antibody (c and d) Full thickness segments of colon from 2 CD and 2 controls along with samples of control (C) and Alzheimer's disease (AD) brains were separated into sarkosyl-soluble and insoluble fractions as described in the methods and in the diagram. Tau was analyzed by immunoblotting using Tau T22.



Supplementary Figure 4. **A**, Expression levels of TRIM28 in Crohn's disease. Colonic biopsy lysates from all 16 CD patients and all 16 controls were immunoblotted with antibodies against TRIM28 (TRIM28 IB), PGP 9.5 (PGP 9.5 IB) and β -actin (β -actin IB). TRIM28 immunoreactive bands were measured, normalized to the optical densities of PGP 9.5 and expressed as a percentage of the average of controls. **B**, Representative immunoblots of ubiquitin levels in biopsy lysates from CD patients and control subjects. The arrows show some of the bands whose levels varied between CD and controls. **C**, Primary culture of rat ENS were treated or not with 10 μ M MG132 for 12h and 15 μ g of cell lysates were subjected to immunoblot analysis using A0024 Tau, PGP 9.5 (PGP 9.5 IB) and β -actin (β -actin IB) antibodies.

8. Discussion

L'axe intestin-cerveau est impliqué dans le développement des maladies neurodégénératives et neuropsychiatriques (Cryan et al. 2019; Sampson et al. 2016; Chapelet et al. 2018; Friedland 2015), impliquant des voies de signalisation neurologiques, hormonales, métaboliques, et immunitaires (Borre et al. 2014; Cryan et al. 2019). Cependant, le rationnel en faveur de l'existence d'une tauopathie entérique (protéinopathies tau du SNE), pouvant favoriser l'apparition de la tauopathie dans le SNC, via l'axe intestin-cerveau, reste peu étayée de preuves expérimentales (Derkinderen et al. 2021). Ainsi, cette question de recherche se pose, surtout si l'on considère les liens forts mis en évidence entre apparition d'une autre protéinopathie, la synucléinopathie, au niveau du SNE, et le développement de synucléinopathie dans le SNC (Sengupta et al. 2015; de Guilhem de Lataillade et al. 2020). Comme l'interaction intestin-cerveau implique des voies de signalisation neurologiques, hormonales, métaboliques, et immunitaires (Borre et al. 2014; Yan Wang et Kasper 2014; Cryan et al. 2019), il nous a semblé intéressant, dans cette Thèse d'Université, d'étudier l'expression et la phosphorylation de tau dans les CEE en condition physiologique, et dans les neurones entériques, en condition inflammatoire (modèle de MC).

Notre première étude a montré que tau était exprimée dans les CEE de côlon humain adulte. Un co-marquage était observé lorsque les prélèvements de colon étaient analysés avec un anticorps anti-GLP-1 et un anticorps anti-tau total, qui reconnaît les 6 isoformes de la protéine tau humaine, montrant ainsi qu'une partie des CEE (cellules de type L) sont tau-positives. Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature qui montrent que les CEE de type L sont le sous-type le plus présent dans le colon ((K. Suzuki et al. 2018); revue dans (Latorre et al. 2016)). Il est à noter que ces CEE de type L sont aussi un des principaux sous-types à posséder des pseudopodes, ce qui laisse penser que des CEE tau-positives pourraient faire contact avec des neurones entériques ((Bohórquez et al. 2015), revue dans (Latorre et al. 2016)). Nous avons, dans un second temps, utilisé des anticorps spécifiques des isoformes de tau pour essayer de préciser les profils d'expression dans le tube digestif humain. Nous avons tout d'abord utilisé un anticorps spécifique des isoformes 3R, que nous avons déjà utilisé avec succès sur coupes en paraffine de tube digestif humain pour marquer les neurones du plexus myentérique colique (Lionnet et al. 2018). En utilisant un co-marquage avec un marqueur général des CEE, la chromogranine A, nous avons identifié que la grande majorité (3/4) des CEE du côlon humain étaient immunoréactives pour tau 3R. À noter, par ailleurs, que

l'utilisation d'un anticorps spécifique des isoformes 4R n'a pas permis d'obtenir un signal de bonne intensité, et reproductible, tout comme l'utilisation des anticorps spécifique des isoformes 0N, 1N et 2N (BioLegend[®], 2023.). Il n'est toutefois pas possible d'exclure que cet absence de marquage soit lié à un manque de sensibilité de ces anticorps (Ercan et al. 2017).

Comme cela a été évoqué en introduction, l'étude des CEE est rendue délicate en raison de leur distribution éparse dans le tube digestif et un grand nombre d'expériences utilisent des lignées de CEE (De Giorgio et al. 2016). Nous avons donc étudié l'expression de tau dans deux lignées de CEE, la lignée murine GLUTag et la lignée humaine NCI-H716, à la fois par Western Blot et PCR. Les résultats des deux approches ont été globalement cohérents en montrant que les GLUTag exprimaient préférentiellement les isoformes de bas poids moléculaire de tau, à savoir 0N3R et, à moindre degré, 0N4R, alors que 1N3R est l'isoforme la plus exprimée par les NCI-H716. Par ailleurs, les lignées de cellules épithéliales utilisées comme témoin n'exprimaient en revanche pas tau, ce qui confirme nos résultats d'immunohistochimie de colon humain qui ne montrait pas de marquage épithélial, en dehors des CEE. Ces observations, en particulier celles montrant que 1N3R est l'isoforme prédominante des cellules humaines NCI-H716, font écho à nos résultats obtenus sur les neurones entériques humains qui montrent que cette isoforme est aussi une des deux isoformes prédominantes des neurones entériques humains (Lionnet et al. 2018). Ceci pourrait suggérer que 1N3R serait l'isoforme de tau qui serait préférentiellement impliquée dans un scénario de passage de tau des CEE vers les neurones entériques (Derkinderen et al. 2021)

Nous avons montré que tau, dans les CEE, était phosphorylée en condition basale, que ce soit dans le colon humain ou dans les lignées cellulaires. En particulier, les CEE de côlon sont nettement immunoréactives lorsque l'anticorps PHF-13 (reconnait tau phosphorylée sur le résidu sérine 396) est utilisé, avec 80% des cellules chromogranines A qui sont aussi PHF-13 positives. Ici aussi, ces résultats font écho à ceux obtenus dans des biopsies coliques humaines de sujets indemnes de maladies neurodégénératives, dans lesquelles une immunoréactivité PHF-13 était observée en Western Blot (Lionnet et al. 2018). A première vue, ces résultats peuvent paraître surprenant car la phosphorylation de tau sur sa sérine 396 est habituellement considérée comme survenant en condition pathologique. En effet, l'anticorps monoclonal PHF-1 (le 'prédécesseur' du PHF-13), qui reconnaît tau phosphorylée sur sérine 396 et 404 (Otvos et al. 1994), a été initialement développé par l'équipe de Peter Davies, à partir d'une préparation de PHF (Greenberg et al. 1992). Toutefois, une phosphorylation de tau sur sérine 396 a aussi été décrite en condition physiologique dans le SNC, aussi bien dans des cultures primaires de neurones corticaux (Anderton et al. 1995), que dans des biopsies cérébrales de sujets dépourvus

de conditions neurodégénératives (Matsuo et al. 1994). Nos résultats permettent donc d'envisager que la phosphorylation de tau sur sérine 396 joue un rôle physiologique dans les CEE et les neurones entériques. Par ailleurs, l'utilisation de phosphatase lambda dans nos deux lignées de CEE a permis d'induire un '*shift*' des isoformes de la protéine tau en Western Blot. Cette accélération de la mobilité électrophorétique des isoformes de protéines tau montre que tau est phosphorylée en condition basale dans les lignées de CEE. L'utilisation d'un anticorps spécifique des formes déphosphorylées de tau, Tau-1 (Szendrei, Lee, et Otvos 1993) a permis de montrer que les résidus sérine 198, 199, 202 et 205 étaient phosphorylés en condition basale dans les GLUTag. Enfin, nous avons montré que les AGCC étaient capables de moduler la phosphorylation de tau sur le résidu sérine 205. Ceci suggère que tau des CEE seraient capable de 'sentir' le contenu de la lumière digestive par son état de phosphorylation. Il conviendra bien sûr de compléter ces résultats préliminaires en étudiant d'autres sites de phosphorylation de tau, et la réponse à plusieurs AGCC, en faisant une analyse dose-réponse, tout en validant que le traitement par AGCC est capable d'induire une sécrétion de tau.

Big-Tau est exprimée par certains neurones du systèmes nerveux périphériques (Goedert, Spillantini, et Crowther 1992; Fischer 2023), et peut co-exister avec les formes de plus bas poids moléculaire de la protéine (Georgieff et al. 1993). Même s'ils sont préliminaires et qu'ils nécessitent d'être confirmés, nos résultats étude suggèrent que la protéine Big-Tau n'est pas exprimée ni par les neurones entériques (Lionnet, Wade, et al. 2018) ni par les CEE.

Enfin, plus largement, nos résultats peuvent s'intégrer dans le rôle potentiel que pourraient avoir les CEE dans le développement des pathologies neurodégénératives. Nous l'avons vu, en montrant que les CEE expriment l'alpha-synucléine et qu'elles faisaient contact avec les neurones vagues, l'équipe de Roger Liddle a proposé qu'elles pourraient jouer un rôle dans le développement de la MP, en permettant un passage du processus pathologique de la lumière digestive vers les neurones entériques (Bohórquez et al. 2015; Yu et al. 2020). Dans un tel scénario, un pathogène non identifié entrainerait l'initiation du processus pathologique (agrégation de l'alpha-synucléine) dans les CEE, qui le transmettrait ensuite de proche en proche aux neurones entériques/vagues, pour ensuite gagner le SNC (Chandra et al., 2017). Dans ce contexte, la présence de tau dans les CEE pourrait être un cofacteur important puisque l'on sait que les co-pathologies tau-alpha-synucléine sont fréquentes (Spina et al. 2021) et que la présence de tau peut augmenter les formes pathologiques d'alpha-synucléine par *cross seeding* (Pan et al. 2022). Toutefois, pour séduisant que soit ce scénario, il est encore très hypothétique et nécessite encore de nombreuses expériences pour être conforté. Tout d'abord, il serait intéressant de faire des co-marquages tau et d'alpha-synucléine humaine dans le tube

digestif humain afin de connaître la proportion de neurones exprimant les 2 protéines. Ensuite, point essentiel, il reste à déterminer si des formes agrégées pathologique d'alpha-synucléine et de tau sont présentes dans les CEE des sujets parkinsoniens. Une de nos études en cours au laboratoire pourrait permettre de répondre à cette question (Agence Nationale de la Recherche, sélection des projets vague 3, 2023). Nous envisageons en effet d'utiliser une approche par *proximal ligation assay* pour détecter la présence d'alpha-synucléine dans des échantillons de colon humain de 16 sujets parkinsoniens et de 11 témoins (maladies neurodégénératives 'non-synucléinopathies) disponibles au laboratoire dans le cadre d'une collaboration (Gelpi et al. 2014). Cette technique vient d'être optimisée au laboratoire pour détecter les formes oligomériques d'alpha-synucléine dans les neurones entériques (la mise au point pour tau est en cours) (Roberts, Wade-Martins, et Alegre-Abarrategui 2015). Des résultats obtenus par l'équipe de Laura Parkkinen à Oxford suggèrent en effet qu'il serait possible de détecter de l'alpha-synucléine pathologique dans l'épithélium digestif et ce très probablement dans les CEE (Ruffmann et al. 2018). Il est à noter que lorsque cet article a été publié, ce marquage était considéré comme non-spécifique. Toutefois, les données obtenues sur les propriétés neuronales des CEE ces dernières années (Bohórquez et al. 2015; Yu et al. 2020) ainsi que la réanalyse des images d'immunohistochimie (aspect du marquage et morphologie cellulaire) suggèrent que cela n'est pas le cas (Figure 17).

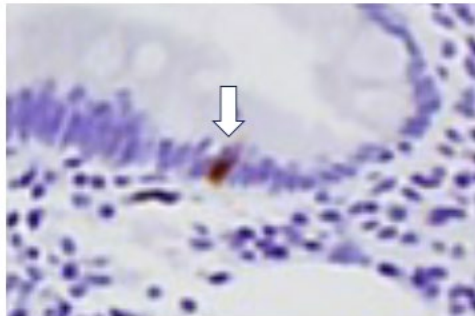


Figure 17. Probable présence d'alpha-synucléine agrégée dans une cellule de l'épithélium intestinal chez un sujet parkinsonien. Une biopsie colique d'un sujet parkinsonien (coupe en paraffine) a été analysée par immunohistochimie avec un anticorps spécifique des formes agrégées d'alpha-synucléine après pré-traitement par la protéinase K. Une cellule de l'épithélium est marquée (flèche blanche) ; ce marquage, considéré comme artéfactuel dans l'article publié en 2017 pourrait en fait correspondre à une CEE (Ruffmann et al. 2018).

Enfin, si ces données neuropathologiques sont convaincantes, il serait pertinent de les compléter par une approche cellulaire dans les cellules GLUTag et NCI-H716, en étudiant par exemple si un traitement de ces cellules par des cytokines pro-inflammatoires ou par du

lipopolysaccharide (tous deux augmentés dans le colon des parkinsoniens par rapport à des sujets témoins (Devos et al. 2013; Forsyth et al. 2011)) est capable d'induire l'agrégation de l'alpha-synucléine et/ou de tau en utilisant par exemple un technique *filter trap assay* qui a été optimisée au laboratoire (Oullier et al. 2020).

Notre seconde étude montre, pour la première fois, que le niveau d'expression de la protéine tau est augmentée dans le SNE de sujets atteints de MC, par rapport à des témoins, aussi bien dans le plexus sous-muqueux (biopsies digestives), que dans le plexus myentérique (échantillons *full thickness*). Les neurones entériques et les cellules gliales entériques (CGE) sont les deux principaux types cellulaires qui composent le SNE et ses plexus ; nos données antérieures (Lionnet et al. 2018) et certains de résultats non publiés du laboratoire montrent que l'expression de tau dans le SNE est limitée aux neurones, et que la protéine n'est pas présente dans les CGE, tant chez l'homme que chez le rongeur. Par conséquent, l'augmentation d'expression de tau observée dans le tube digestif des MC provient des neurones. Ces résultats font directement écho à une étude précédente du laboratoire qui avait montré que, tout comme tau, l'expression de l'alpha-synucléine est augmentée dans les neurones du plexus myentérique et sous-muqueux des sujets avec une MC (Prigent et al. 2020). Une analyse parallèle du niveau d'expression de tau et de l'a-synucléine dans les biopsies digestives des sujets avec une MC a permis de montrer une corrélation tant au niveau du messenger que de la protéine.

Quelle peut être la signification de cette *uprégulation* de la protéine tau dans le contexte de la MC ? Tout d'abord, en montrant la dérégulation de l'expression de tau (et de l'alpha-synucléine), nos résultats renforcent le fait que la MC n'est pas seulement une maladie inflammatoire du tube digestif, mais peut aussi être considérée comme une authentique neuropathie entérique (De Giorgio et al. 2016). Dans ce contexte, il est intéressant de noter que, parallèlement à l'augmentation d'expression de tau et de l'alpha-synucléine, une diminution du niveau de la synapsine 1 a été notée dans les biopsies prélevées en zones inflammatoires des sujets avec une MC. Cette régulation opposée entre le niveau d'expression de l'alpha-synucléine et de la synapsine 1 peut paraître contre intuitive car les deux protéines interagissent physiquement au niveau des terminaisons synaptiques pour régulent l'exocytose (Atias et al. 2019; Gao et al. 2023). Il peut toutefois être proposé que la baisse du niveau d'expression de la synapsine 1, une protéine purement présynaptique, pourrait être expliquée par les observations désormais anciennes qui ont montré une atteinte axonale marquée (parfois avec nécrose) dans des biopsies de sujets avec MC (Dvorak et al. 1993) et, qu'en revanche, l'éventuelle perte d'alpha-synucléine synaptique associée est compensée par une augmentation de l'expression

dans d'autres compartiments cellulaires des neurones entériques comme le soma (via la diminution de dégradation Nrf2/NDP52-dépendante) dans laquelle elle est aussi présente contrairement aux protéines spécifiques des vésicules synaptiques (Figure 18). Une telle hypothèse nécessitera des travaux complémentaires en étudiant, outre la synapsine 1 et l'alpha-synucléine, d'autres protéines synaptiques, comme la synaptobrevine et la synaptophysine, avec une approche immunohistochimique dans des tissus de sujets avec une MC.

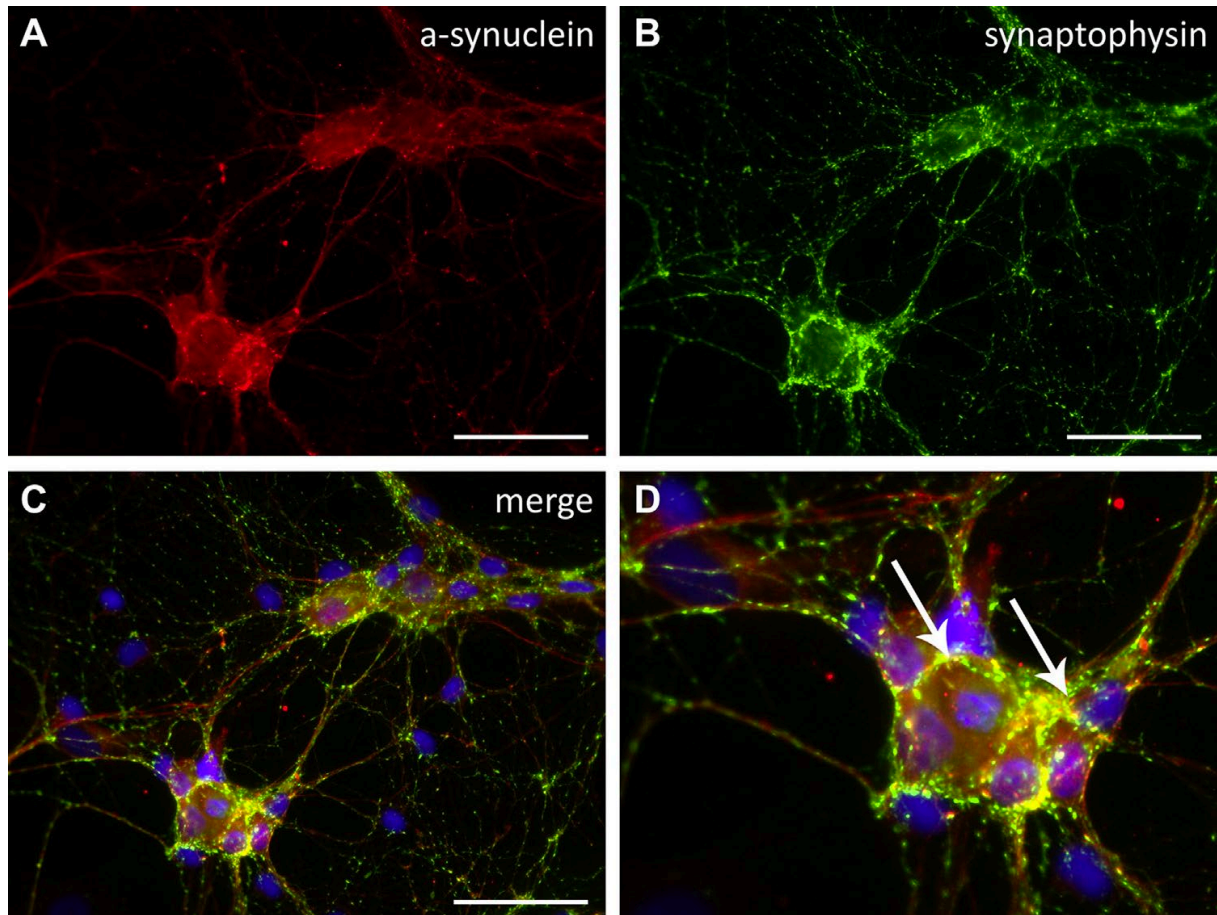


Figure 18. Co-localisation partielle de l'alpha-synucléine et de la synaptophysine dans des neurones de plexus myentérique en culture. Marquage alpha-synucléine (rouge, A) et d'une protéine spécifique des vésicules synaptiques, la synaptophysine (verte, B). En C et D, un co-marquage est noté dans les varicosités entourant les neurones (flèches blanches), mais on note la présence d'alpha-synucléine dans le soma des neurones. Coloration nucléaire avec DAPI (bleu). Barres d'échelle : 50 μ m. D'après Böttner (Böttner et al. 2015)

De façon plus générale, nos résultats semblent s'inscrire dans la continuité des observations épidémiologiques qui suggèrent une possible augmentation du risque de MP et de démence chez les sujets avec une MC (Torres et al. 2017; Liu et al. 2022; Huang et al. 2023; Bellenguez et al. 2022) et, par ailleurs, cela permettraient de fournir une base moléculaire et cellulaire à ces études épidémiologiques : l'augmentation de l'expression de tau et de l'alpha-

synucléine dans les neurones entériques, au cours de la MC, serait un événement initial du processus neurodégénératif, qui gagnerait ensuite le SNC, via l'innervation vagale, comme proposé initialement par Braak (Braak et al. 2003), puis par Borghammer (Borghammer 2023). Bien que séduisant, un tel scénario n'est probablement pas à retenir en l'état, et cela pour deux raisons principales. Tout d'abord, il est à noter que, bien que le lien supposé entre MC et MP reste tenu (Torres et al. 2017; N. Liu et al. 2022; Huang et al. 2023), puisqu'il n'expliquerait qu'un cas de MP supplémentaire sur 10 000 personnes ayant une MC. Or, dans nos études la quasi-totalité (15/16) des sujets avec une MC avaient une surexpression marquée de tau et de l'a-synucléine (voir en particulier les immunoblots de la Figure S2), ce qui laisse penser qu'un grand nombre, et non une infime proportion de patients MC, devrait développer, à terme, une MP. Deuxièmement et probablement de façon plus convaincante, au-delà de la simple surexpression, il n'y a pas de franc argument montrant que tau, ou que l'alpha-synucléine, est agrégée dans le SNE des sujets MC et ce, en utilisant différentes approches (extraction sarkosyl et ultracentrifugation pour tau ; *filter trap assay* et *protein misfolding cyclic amplification* ((Prigent et al. 2020; 2019; Fenyi et al. 2019).

Nous avons été relativement surpris de constater que l'augmentation de l'expression de tau et de l'alpha-synucléine n'était pas accompagnée d'une augmentation de leur ARN messenger (une diminution significative était même observée). Ceci nous a conduit à nous focaliser sur une diminution de la dégradation de tau et de l'alpha-synucléine comme pouvant être à l'origine de l'augmentation de l'expression de ces deux protéines. Même s'il est impossible d'écarter le fait que d'autres voies de dégradation de tau sont impliquées, nos données (biopsies de sujets MC, souris avec invalidation du gène codant pour Nrf2, et approche pharmacologique de culture primaire de SNE) suggèrent que la voie *Nrf2/NDP52* (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2/Nuclear Dot Protein 52*) est associée à l'augmentation de l'expression de tau, observée dans les neurones entériques au cours de la MC, comme cela a déjà été décrit dans les neurones centraux (Jo et al. 2014). En dehors cette publication sur tau dans le SNC, NDP52 a été principalement étudiée dans les tissus périphériques pour son rôle en tant que médiateur de l'autophagie impliqué dans l'élimination des bactéries présentes dans le cytoplasme comme *Salmonella typhimurium*, ou *Shigella flexneri* (Verlhac et al. 2015) deux bactéries dont l'infection est associée à un risque ultérieur plus important de développer une MC (Axelrad et al. 2020). Notre étude pourrait donc laisser envisager qu'une restauration de la voie Nrf2/NDP52 est une voie thérapeutique possible de la MC.

En conclusion, en dehors de quelques études préliminaires publiées au début des années 1990, nos travaux sont les premiers à s'intéresser plus précisément à la protéine tau dans le tube digestif et le SNE. Nous l'avons vu, pour ce qui est du versant pathologique, les données disponibles bien que parcellaires ne permettent de penser qu'il existe une atteinte en miroir du SNC au niveau du SNE dans les principales tauopathies centrales, que sont la MA (Shankle et al. 1993; Dugger et al. 2019) ou la PSP (Dugger et al. 2019; Lionnet et al. 2018). En revanche, comme nous avons pu l'observer, il existerait dans la MC une dysrégulation de tau, dans un contexte de neuroinflammation et de neuropathie entérique, qui suggère l'intérêt d'étudier tau, plus largement, dans un contexte de neuropathie entérique primaire ou secondaire. Par ailleurs, il serait aussi intéressant d'étudier le SNE et tau dans une autre maladie, la dystrophie myotonique de type 1, car c'est une maladie neuromusculaire 'systémique' qui s'accompagne d'une tauopathie du SNC et de troubles digestifs ((Fernandez-Gomez et al. 2019; Haensch et al. 2011). Pour ce qui est des CEE, il conviendra de déterminer si tau est agrégée dans ces cellules chez des sujets ayant une maladie neurodégénérative. En effet, les résultats négatifs obtenus sur les neurones entériques ne permettent pas de conclure, et à l'heure actuelle, il serait nécessaire de réaliser de nouveaux prélèvements afin notamment de réaliser une analyse de toutes les cellules épithéliales digestives (voir figure 17).

9. Références bibliographiques

Agence Nationale de la Recherche. 2023. <https://anr.fr/fileadmin/aap/2023/selection/aapg-2023-selection-vague-3> (consulté sur internet le 08/12/2023).

Ahlman, H., et null Nilsson. 2001. « The Gut as the Largest Endocrine Organ in the Body ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* :S63-68. https://doi.org/10.1093/annonc/12.suppl_2.s63.

Anderton, B. H., J. P. Brion, A. M. Couck, D. R. Davis, J. M. Gallo, D. P. Hanger, K. Ladhani, D. A. Latimer, C. Lewis, et S. Lovestone. 1995. « Modulation of PHF-like Tau Phosphorylation in Cultured Neurons and Transfected Cells ». *Neurobiology of Aging* 16 :389-97; discussion 398-402. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(94\)00160-3](https://doi.org/10.1016/0197-4580(94)00160-3).

Annerino, Dana M., Shawn Arshad, Georgia M. Taylor, Charles H. Adler, Thomas G. Beach, et James G. Greene. 2012. « Parkinson's Disease Is Not Associated with Gastrointestinal Myenteric Ganglion Neuron Loss ». *Acta Neuropathologica* 124 : 665-80. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1040-2>.

Arakhamia, Tamta, Christina E. Lee, Yari Carlomagno, Duc M. Duong, Sean R. Kundinger, Kevin Wang, Dewight Williams, et al. 2020. « Posttranslational Modifications Mediate the Structural Diversity of Tauopathy Strains ». *Cell* : 633-644.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.027>.

Arendt, Thomas, Jens T. Stieler, et Max Holzer. 2016. « Tau and Tauopathies ». *Brain Research Bulletin*: 238-92. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.08.018>.

Atias, Merav, Yaara Tevet, Jichao Sun, Alexandra Stavsky, Shani Tal, Joy Kahn, Subhojit Roy, et Daniel Gitler. 2019. « Synapsins Regulate α -Synuclein Functions ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* : 11116-18. <https://doi.org/10.1073/pnas.1903054116>.

Axelrad, Jordan E., Ken H. Cadwell, Jean-Frederic Colombel, et Shailja C. Shah. 2020. « Systematic Review: Gastrointestinal Infection and Incident Inflammatory Bowel Disease ». *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* : 1222-32. <https://doi.org/10.1111/apt.15770>.

Basurto-Islas, Gustavo, Jose Luna-Muñoz, Angela L. Guillozet-Bongaarts, Lester I. Binder, Raul Mena, et Francisco García-Sierra. 2008. « Accumulation of Aspartic Acid421- and Glutamic Acid391-Cleaved Tau in Neurofibrillary Tangles Correlates with Progression in Alzheimer Disease ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* : 470-83. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31817275c7>.

Bayliss, W. M., et E. H. Starling. 1899. « The Movements and Innervation of the Small Intestine ». *The Journal of Physiology* 24 (2): 99-143. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1899.sp000752>.

Beach, Thomas G., Charles H. Adler, Lucia I. Sue, Holly A. Shill, Erika Driver-Dunckley, Shyamal H. Mehta, Anthony J. Intorcia, et al. 2021. « Vagus Nerve and Stomach Synucleinopathy in Parkinson's Disease, Incidental Lewy Body Disease, and Normal Elderly Subjects: Evidence Against the "Body-First" Hypothesis ». *Journal of Parkinson's Disease* : 1833-43. <https://doi.org/10.3233/JPD-212733>.

Beach, Thomas G., Charles H. Adler, Lucia I. Sue, Linda Vedders, Lihfen Lue, Charles L. White Iii, Haru Akiyama, et al. 2010. « Multi-Organ Distribution of Phosphorylated Alpha-Synuclein Histopathology in Subjects with Lewy Body Disorders ». *Acta Neuropathologica* : 689-702. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0664-3>.

Beach, Thomas G., Anne-Gaëlle Corbillé, Franck Letournel, Jeffrey H. Kordower, Thomas Kremer, David G. Munoz, Anthony Intorcia, et al. 2016. « Multicenter Assessment of Immunohistochemical

Methods for Pathological Alpha-Synuclein in Sigmoid Colon of Autopsied Parkinson's Disease and Control Subjects ». *Journal of Parkinson's Disease* : 761-70. <https://doi.org/10.3233/JPD-160888>.

Histopathology in Subjects with Lewy Body Disorders ». *Acta Neuropathologica* : 689-702. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0664-3>.

Belai, A., P. B. Boulos, T. Robson, et G. Burnstock. 1997. « Neurochemical Coding in the Small Intestine of Patients with Crohn's Disease ». *Gut* : 767-74. <https://doi.org/10.1136/gut.40.6.767>.

Bellenguez, Céline, Fahri Küçükali, Iris E. Jansen, Luca Kleineidam, Sonia Moreno-Grau, Najaf Amin, Adam C. Naj, et al. 2022. « New Insights into the Genetic Etiology of Alzheimer's Disease and Related Dementias ». *Nature Genetics* : 412-36. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01024-z>.

Benarroch, Eduardo E. 2007. « Enteric Nervous System: Functional Organization and Neurologic Implications ». *Neurology* : 1953-57. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000281999.56102.b5>.

Berg, Daniela, Per Borghammer, Seyed-Mohammad Fereshtehnejad, Sebastian Heinzl, Jacob Horsager, Eva Schaeffer, et Ronald B. Postuma. 2021. « Prodromal Parkinson Disease Subtypes - Key to Understanding Heterogeneity ». *Nature Reviews. Neurology* : 349-61. <https://doi.org/10.1038/s41582-021-00486-9>.

Bertrand, P. P., W. A. Kunze, J. C. Bornstein, J. B. Furness, et M. L. Smith. 1997. « Analysis of the Responses of Myenteric Neurons in the Small Intestine to Chemical Stimulation of the Mucosa ». *The American Journal of Physiology* : G422-435. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1997.273.2.G422>.

Bhattarai, Y. 2018. « Microbiota-Gut-Brain Axis: Interaction of Gut Microbes and Their Metabolites with Host Epithelial Barriers ». *Neurogastroenterology and Motility*: e13366. <https://doi.org/10.1111/nmo.13366>.

Binder, L. I., A. Frankfurter, et L. I. Rebhun. 1985. « The Distribution of Tau in the Mammalian Central Nervous System ». *The Journal of Cell Biology*: 1371-78. <https://doi.org/10.1083/jcb.101.4.1371>.

BioLegend. s. d. « Tau Antibodies and Recombinant Proteins ». <https://www.biolegend.com/Files/Images/BioLegend/literature/images/07-0094-01.pdf>.

Biundo, Fabrizio, Dolores Del Prete, Hong Zhang, Ottavio Arancio, et Luciano D'Adamio. 2018. « A Role for Tau in Learning, Memory and Synaptic Plasticity ». *Scientific Reports*: 3184. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21596-3>.

Boesmans, Werend, Amelia Nash, Kinga R. Tasnády, Wendy Yang, Lincon A. Stamp, et Marlene M. Hao. 2021. « Development, Diversity, and Neurogenic Capacity of Enteric Glia ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* : 775102. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.775102>.

Bohórquez, Diego V., Rafiq A. Shahid, Alan Erdmann, Alex M. Kreger, Yu Wang, Nicole Calakos, Fan Wang, et Rodger A. Liddle. 2015. « Neuroepithelial Circuit Formed by Innervation of Sensory Enteroendocrine Cells ». *The Journal of Clinical Investigation*: 782-86. <https://doi.org/10.1172/JCI78361>.

Bondulich, Marie K., Tong Guo, Christopher Meehan, John Manion, Teresa Rodriguez Martin, Jacqueline C. Mitchell, Tibor Hortobagyi, et al. 2016. « Tauopathy Induced by Low Level Expression of a Human Brain-Derived Tau Fragment in Mice Is Rescued by Phenylbutyrate ». *Brain: A Journal of Neurology* : 2290-2306. <https://doi.org/10.1093/brain/aww137>.

Borghammer, Per. 2023. « The Brain-First vs. Body-First Model of Parkinson's Disease with Comparison to Alternative Models ». *Journal of Neural Transmission* : 737-53. <https://doi.org/10.1007/s00702-023-02633-6>.

- Bornstein, J. C., M. Costa, et J. R. Grider. 2004. « Enteric Motor and Interneuronal Circuits Controlling Motility ». *Neurogastroenterology and Motility*: 34-38. <https://doi.org/10.1111/j.1743-3150.2004.00472.x>.
- Borre, Yuliya E., Rachel D. Moloney, Gerard Clarke, Timothy G. Dinan, et John F. Cryan. 2014. « The Impact of Microbiota on Brain and Behavior: Mechanisms & Therapeutic Potential ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* : 373-403. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_17.
- Boschetti, Elisa, Carolina Malagelada, Anna Accarino, Juan R. Malagelada, Rosanna F. Cogliandro, Alessandra Gori, Elena Bonora, et al. 2019. « Enteric Neuron Density Correlates with Clinical Features of Severe Gut Dysmotility ». *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* G793-801. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00199.2019>.
- Böttner, Martina, Tobias Fricke, Melanie Müller, Martina Barrenschee, Günther Deuschl, Susanne A. Schneider, Jan-Hendrik Egberts, et al. 2015. « Alpha-Synuclein Is Associated with the Synaptic Vesicle Apparatus in the Human and Rat Enteric Nervous System ». *Brain Research* : 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.04.015>.
- Boyer, Lee, Dolar Sidpra, Gareth Jevon, Alison M. Buchan, et Kevan Jacobson. 2007. « Differential Responses of VIPergic and Nitroergic Neurons in Paediatric Patients with Crohn's Disease ». *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical* : 106-14. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2007.03.001>.
- Braak, H., U. Rüb, W. P. Gai, et K. Del Tredici. 2003. « Idiopathic Parkinson's Disease: Possible Routes by Which Vulnerable Neuronal Types May Be Subject to Neuroinvasion by an Unknown Pathogen ». *Journal of Neural Transmission* : 517-36. <https://doi.org/10.1007/s00702-002-0808-2>.
- Braak, Heiko, Irina Alafuzoff, Thomas Arzberger, Hans Kretschmar, et Kelly Del Tredici. 2006. « Staging of Alzheimer Disease-Associated Neurofibrillary Pathology Using Paraffin Sections and Immunocytochemistry ». *Acta Neuropathologica*: 389-404. <https://doi.org/10.1007/s00401-006-0127-z>.
- Brierley, Stuart M., et David R. Linden. 2014. « Neuroplasticity and Dysfunction after Gastrointestinal Inflammation ». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*: 611-27. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.103>.
- Brion, J. P., B. H. Anderton, M. Authelet, R. Dayanandan, K. Leroy, S. Lovestone, J. N. Octave, L. Pradier, N. Touchet, et G. Tremp. 2001. « Neurofibrillary Tangles and Tau Phosphorylation ». *Biochemical Society Symposium*: 81-88. <https://doi.org/10.1042/bss0670081>.
- Buée, L., T. Bussièrre, V. Buée-Scherrer, A. Delacourte, et P. R. Hof. 2000. « Tau Protein Isoforms, Phosphorylation and Role in Neurodegenerative Disorders ». *Brain Research. Brain Research Reviews*: 95-130. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(00\)00019-9](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(00)00019-9).
- Bullmann, Torsten, Wolfgang Härtig, Max Holzer, et Thomas Arendt. 2010. « Expression of the Embryonal Isoform (0N/3R) of the Microtubule-Associated Protein Tau in the Adult Rat Central Nervous System ». *The Journal of Comparative Neurology*: 2538-53. <https://doi.org/10.1002/cne.22351>.
- Carmel, G., E. M. Mager, L. I. Binder, et J. Kuret. 1996. « The Structural Basis of Monoclonal Antibody Alz50's Selectivity for Alzheimer's Disease Pathology ». *The Journal of Biological Chemistry*: 32789-95. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.51.32789>.
- Casini, Arianna, Romina Mancinelli, Caterina Loredana Mammola, Luigi Pannarale, Piero Chirletti, Paolo Onori, et Rosa Vaccaro. 2021. « Distribution of α -Synuclein in Normal Human Jejunum and Its Relations with the Chemosensory and Neuroendocrine System ». *European Journal of Histochemistry*: 3310. <https://doi.org/10.4081/ejh.2021.3310>.

- Chalazonitis, Alcmène, et Meenakshi Rao. 2018. « Enteric Nervous System Manifestations of Neurodegenerative Disease ». *Brain Research*: 207-13. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.01.011>.
- Chandra, Rashmi, Annie Hiniker, Yien-Ming Kuo, Robert L. Nussbaum, et Rodger A. Liddle. 2017. « α -Synuclein in Gut Endocrine Cells and Its Implications for Parkinson's Disease ». *JCI Insight*: e92295, 92295. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.92295>.
- Chapelet, Guillaume, Laurène Leclair-Visonneau, Thomas Clairembault, Michel Neunlist, et Pascal Derkinderen. 2018. « Can the Gut Be the Missing Piece in Uncovering PD Pathogenesis? » *Parkinsonism & Related Disorders*. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2018.11.014>.
- Chen, J., Y. Kanai, N. J. Cowan, et N. Hirokawa. 1992. « Projection Domains of MAP2 and Tau Determine Spacings between Microtubules in Dendrites and Axons ». *Nature* : 674-77. <https://doi.org/10.1038/360674a0>.
- Chen, Shu G., Vilius Stribinskis, Madhavi J. Rane, Donald R. Demuth, Evelyne Gozal, Andrew M. Roberts, Rekha Jagadapillai, et al. 2016. « Exposure to the Functional Bacterial Amyloid Protein Curli Enhances Alpha-Synuclein Aggregation in Aged Fischer 344 Rats and *Caenorhabditis Elegans* ». *Scientific Reports* : 34477. <https://doi.org/10.1038/srep34477>.
- Chiocchetti, Roberto, Gemma Mazzuoli, Valeria Albanese, Maurizio Mazzoni, Paolo Clavenzani, Giovanna Lalatta-Costerbosa, Maria L. Lucchi, Giovanni Di Guardo, Giuseppe Marruchella, et John B. Furness. 2008. « Anatomical Evidence for Ileal Peyer's Patches Innervation by Enteric Nervous System: A Potential Route for Prion Neuroinvasion? » *Cell and Tissue Research*: 185-94. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0583-y>.
- Clavaguera, Florence, Charles Duyckaerts, et Stéphane Haïk. 2020. « Prion-like Properties of Tau Assemblies ». *Current Opinion in Neurobiology* : 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.11.022>.
- Clerc, N., et J. B. Furness. 2004. « Intrinsic Primary Afferent Neurons of the Digestive Tract ». *Neurogastroenterology and Motility* : 24-27. <https://doi.org/10.1111/j.1743-3150.2004.00470.x>.
- Connell, J. W., G. M. Gibb, J. C. Betts, W. P. Blackstock, J. Gallo, S. Lovestone, M. Hutton, et B. H. Anderton. 2001. « Effects of FTDP-17 Mutations on the in Vitro Phosphorylation of Tau by Glycogen Synthase Kinase 3beta Identified by Mass Spectrometry Demonstrate Certain Mutations Exert Long-Range Conformational Changes ». *FEBS Letters*: 40-44. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02267-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02267-0).
- Cryan, John F., Kenneth J. O'Riordan, Caitlin S. M. Cowan, Kiran V. Sandhu, Thomaz F. S. Bastiaanssen, Marcus Boehme, Martin G. Codagnone, et al. 2019. « The Microbiota-Gut-Brain Axis ». *Physiological Reviews* : 1877-2013. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>.
- Dariel, Anne, Lucie Grynberg, Marie Auger, Chloé Lefèvre, Tony Durand, Philippe Aubert, Catherine Le Berre-Scoul, et al. 2020. « Analysis of Enteric Nervous System and Intestinal Epithelial Barrier to Predict Complications in Hirschsprung's Disease ». *Scientific Reports*: 21725. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78340-z>.
- De Giorgio, R., et M. Camilleri. 2004. « Human Enteric Neuropathies: Morphology and Molecular Pathology ». *Neurogastroenterology and Motility*: 515-31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2004.00538.x>.
- De Giorgio, R., M. P. Di Simone, V. Stanghellini, G. Barbara, M. Tonini, B. Salvioli, S. Mattioli, et R. Corinaldesi. 1999. « Esophageal and Gastric Nitric Oxide Synthesizing Innervation in Primary Achalasia ». *The American Journal of Gastroenterology*: 2357-62. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.1999.01357.x>.

- De Giorgio, Roberto, Francesca Bianco, Rocco Latorre, Giacomo Caio, Paolo Clavenzani, et Elena Bonora. 2016. « Enteric Neuropathies: Yesterday, Today and Tomorrow ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* : 123-33. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27592-5_12.
- De Schepper, Sebastiaan, Simon Verheijden, Javier Aguilera-Lizarraga, Maria Francesca Viola, Werend Boesmans, Nathalie Stakenborg, Iryna Voytyuk, et al. 2018. « Self-Maintaining Gut Macrophages Are Essential for Intestinal Homeostasis ». *Cell*: 400-415.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.048>.
- Derkinderen, Pascal, Malvyne Rolli-Derkinderen, Guillaume Chapelet, Michel Neunlist, et Wendy Noble. 2021. « Tau in the Gut, Does It Really Matter? » *Journal of Neurochemistry*: 94-104. <https://doi.org/10.1111/jnc.15320>.
- Devos, David, Thibaud Lebouvier, Bernard Lardeux, Mandy Biraud, Tiphaine Rouaud, Hélène Pouclet, Emmanuel Coron, et al. 2013. « Colonic Inflammation in Parkinson’s Disease ». *Neurobiology of Disease*: 42-48. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.09.007>.
- Dm, Walsh, et Selkoe Dj. 2016. « A Critical Appraisal of the Pathogenic Protein Spread Hypothesis of Neurodegeneration ». *Nature Reviews. Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.13>.
- Dogiel, A. S., et V. Dogiel. 1899. «  ber den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugetiere. Arch Anat Physiol Leipzig ». In . <https://www.semanticscholar.org/paper/%C3%9Ceber-den-Bau-der-Ganglien-in-den-Geflechten-des-Dogiel-Dogiel/738fe1c97ecd37c6ec477e6f8d0e6634d864a9ef>.
- Drewes, G., B. Trinczek, S. Illenberger, J. Biernat, G. Schmitt-Ulms, H. E. Meyer, E. M. Mandelkow, et E. Mandelkow. 1995. « Microtubule-Associated Protein/Microtubule Affinity-Regulating Kinase (P110mark). A Novel Protein Kinase That Regulates Tau-Microtubule Interactions and Dynamic Instability by Phosphorylation at the Alzheimer-Specific Site Serine 262 ». *The Journal of Biological Chemistry* : 7679-88. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.13.7679>.
- Drubin, D. G., D. Caput, et M. W. Kirschner. 1984. « Studies on the Expression of the Microtubule-Associated Protein, Tau, during Mouse Brain Development, with Newly Isolated Complementary DNA Probes ». *The Journal of Cell Biology* : 1090-97. <https://doi.org/10.1083/jcb.98.3.1090>.
- Druce, Maralyn R., James S. Minnion, Benjamin C. T. Field, Sejal R. Patel, Joyceline C. Shillito, Michael Tilby, Kylie E. L. Beale, Kevin G. Murphy, Mohammad A. Ghatei, et Stephen R. Bloom. 2009. « Investigation of Structure-Activity Relationships of Oxyntomodulin (Oxm) Using Oxm Analogs ». *Endocrinology* : 1712-22. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0828>.
- Dubois, Bruno, Nicolas Villain, Giovanni B. Frisoni, Gil D. Rabinovici, Marwan Sabbagh, Stefano Cappa, Alexandre Bejanin, et al. 2021. « Clinical Diagnosis of Alzheimer’s Disease: Recommendations of the International Working Group ». *The Lancet. Neurology*: 484-96. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00066-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00066-1).
- Dugger, Brittany N., Brittany R. Hoffman, Alex Scroggins, Geidy E. Serrano, Charles H. Adler, Holly A. Shill, Christine M. Belden, et al. 2019. « Tau Immunoreactivity in Peripheral Tissues of Human Aging and Select Tauopathies ». *Neuroscience Letters*: 132-39. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.12.031>.
- Dugger, Brittany N., Charisse M. Whiteside, Chera L. Maarouf, Douglas G. Walker, Thomas G. Beach, Lucia I. Sue, Angelica Garcia, et al. 2016. « The Presence of Select Tau Species in Human Peripheral Tissues and Their Relation to Alzheimer’s Disease ». *Journal of Alzheimer’s Disease*: 345-56. <https://doi.org/10.3233/JAD-150859>.

- Dujardin, Simon, Séverine Bégard, Raphaëlle Caillierez, Cédric Lachaud, Lucie Delattre, Sébastien Carrier, Anne Loyens, et al. 2014. « Ectosomes: A New Mechanism for Non-Exosomal Secretion of Tau Protein ». *PloS One*: e100760. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100760>.
- Duyckaerts, C., M. A. Colle, F. Dessi, F. Piette, et J. J. Hauw. 1998. « Progression of Alzheimer Histopathological Changes ». *Acta Neurologica Belgica*: 180-85.
- Dvorak, A. M., A. B. Onderdonk, R. S. McLeod, R. A. Monahan-Earley, J. Cullen, D. A. Antonioli, J. E. Blair, E. S. Morgan, R. L. Cisneros, et P. Estrella. 1993. « Axonal Necrosis of Enteric Autonomic Nerves in Continent Ileal Pouches. Possible Implications for Pathogenesis of Crohn's Disease ». *Annals of Surgery* : 260-71. <https://doi.org/10.1097/00000658-199303000-00008>.
- Eissa, Nour, Hayam Hussein, Geoffrey N. Hendy, Charles N. Bernstein, et Jean-Eric Ghia. 2018. « Chromogranin-A and Its Derived Peptides and Their Pharmacological Effects during Intestinal Inflammation ». *Biochemical Pharmacology*: 315-26. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.04.009>.
- Elder, G. A., V. L. Friedrich, P. Bosco, C. Kang, A. Gourov, P. H. Tu, V. M. Lee, et R. A. Lazzarini. 1998. « Absence of the Mid-Sized Neurofilament Subunit Decreases Axonal Calibers, Levels of Light Neurofilament (NF-L), and Neurofilament Content ». *The Journal of Cell Biology*: 727-39. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.3.727>.
- Ercan, Ebru, Sameh Eid, Christian Weber, Alexandra Kowalski, Maria Bichmann, Annika Behrendt, Frank Matthes, et al. 2017. « A Validated Antibody Panel for the Characterization of Tau Post-Translational Modifications ». *Molecular Neurodegeneration*: 87. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0229-1>.
- Falony, Gwen, Marie Joossens, Sara Vieira-Silva, Jun Wang, Youssef Darzi, Karoline Faust, Alexander Kurilshikov, et al. 2016. « Population-Level Analysis of Gut Microbiome Variation ». *Science*: 560-64. <https://doi.org/10.1126/science.aad3503>.
- Feng, Jianli, Lingling Dong, Jing Zhang, Xiaolei Han, Shi Tang, Lin Song, Lin Cong, Xiang Wang, Yongxiang Wang, et Yifeng Du. 2018. « Unique Expression Pattern of KIBRA in the Enteric Nervous System of APP/PS1 Mice ». *Neuroscience Letters*: 41-47. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.03.014>.
- Fenyi, Alexis, Laurène Leclair-Visonneau, Thomas Clairembault, Emmanuel Coron, Michel Neunlist, Ronald Melki, Pascal Derkinderen, et Luc Bousset. 2019. « Detection of Alpha-Synuclein Aggregates in Gastrointestinal Biopsies by Protein Misfolding Cyclic Amplification ». *Neurobiology of Disease*: 38-43. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.05.002>.
- Fernandez-Gomez, Francisco, Helene Tran, Claire-Marie Dhaenens, Marie-Laure Caillet-Boudin, Susanna Schraen-Maschke, David Blum, Bernard Sablonnière, Valérie Buée-Scherrer, Luc Buee, et Nicolas Sergeant. 2019. « Myotonic Dystrophy: An RNA Toxic Gain of Function Tauopathy? » *Advances in Experimental Medicine and Biology*: 207-16. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9358-8_17.
- Fischer, Itzhak. 2023. « Big Tau: What, How, Where and Why ». *Cytoskeleton*. <https://doi.org/10.1002/cm.21772>.
- Fischer, Itzhak, et Peter W. Baas. 2020. « Resurrecting the Mysteries of Big Tau ». *Trends in Neurosciences* : 493-504. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.04.007>.
- Forsyth, Christopher B., Kathleen M. Shannon, Jeffrey H. Kordower, Robin M. Voigt, Maliha Shaikh, Jean A. Jaglin, Jacob D. Estes, Hemraj B. Dodiya, et Ali Keshavarzian. 2011. « Increased Intestinal Permeability Correlates with Sigmoid Mucosa Alpha-Synuclein Staining and Endotoxin Exposure Markers in Early Parkinson's Disease ». *PloS One*: e28032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028032>.

- Friedland, Robert P. 2015. « Mechanisms of Molecular Mimicry Involving the Microbiota in Neurodegeneration ». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*: 349-62. <https://doi.org/10.3233/JAD-142841>.
- Fung, Candice, et Pieter Vanden Berghe. 2020. « Functional Circuits and Signal Processing in the Enteric Nervous System ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*: 4505-22. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03543-6>.
- Furness, J. B., et M. J. Stebbing. 2018. « The First Brain: Species Comparisons and Evolutionary Implications for the Enteric and Central Nervous Systems ». *Neurogastroenterology and Motility*. <https://doi.org/10.1111/nmo.13234>.
- Furness, John B. 2012. « The Enteric Nervous System and Neurogastroenterology ». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*: 286-94. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.32>.
- Furness, John B., Brid P. Callaghan, Leni R. Rivera, et Hyun-Jung Cho. 2014. « The Enteric Nervous System and Gastrointestinal Innervation: Integrated Local and Central Control ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* : 39-71. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_3.
- Furness, John B., Leni R. Rivera, Hyun-Jung Cho, David M. Bravo, et Brid Callaghan. 2013. « The Gut as a Sensory Organ ». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*: 729-40. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.180>.
- Gabanyi, Ilana, Paul A. Muller, Linda Feighery, Thiago Y. Oliveira, Frederico A. Costa-Pinto, et Daniel Mucida. 2016. « Neuro-Immune Interactions Drive Tissue Programming in Intestinal Macrophages ». *Cell*: 378-91. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.023>.
- Gao, Virginia, Juan A. Briano, Lauren E. Komer, et Jacqueline Burré. 2023. « Functional and Pathological Effects of α -Synuclein on Synaptic SNARE Complexes ». *Journal of Molecular Biology*: 167714. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2022.167714>.
- Geboes, K. 1993. « Immunopathological Studies of the Small Intestinal Intramural Nervous System and of Intramural Vessels in Crohn's Disease ». *Verhandelingen - Koninklijke Academie Voor Geneeskunde Van België*: 267-301; discussion 301-303.
- Geboes, K., et S. Collins. 1998. « Structural Abnormalities of the Nervous System in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis ». *Neurogastroenterology and Motility*: 189-202. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2982.1998.00102.x>.
- Gelpi, Ellen, Judith Navarro-Otano, Eduardo Tolosa, Carles Gaig, Yaroslau Compta, María Jesús Rey, María José Martí, et al. 2014. « Multiple Organ Involvement by Alpha-Synuclein Pathology in Lewy Body Disorders ». *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*: 1010-18. <https://doi.org/10.1002/mds.25776>.
- Georgieff, Irene S., Ronald K. H. Liem, Dominique Couchie, Carmelo Mavilia, Jacques Nunez, et Michael L. Shelanski. 1993. « Expression of high molecular weight tau in the central and peripheral nervous systems ». *Journal of Cell Science*: 729-37. <https://doi.org/10.1242/jcs.105.3.729>.
- Gershon, M. D. 1999. « The Enteric Nervous System: A Second Brain ». *Hospital Practice*: 31-32, 35-38, 41-42 passim. <https://doi.org/10.3810/hp.1999.07.153>.
- Giancola, F., F. Torresan, R. Repossi, F. Bianco, R. Latorre, A. Ioannou, M. Guarino, et al. 2017. « Downregulation of Neuronal Vasoactive Intestinal Polypeptide in Parkinson's Disease and Chronic Constipation ». *Neurogastroenterology and Motility*. <https://doi.org/10.1111/nmo.12995>.
- Giannakopoulos, P., F. R. Hermann, T. Bussi re, C. Bouras, E. K vari, D. P. Perl, J. H. Morrison, G. Gold, et P. R. Hof. 2003. « Tangle and Neuron Numbers, but Not Amyloid Load, Predict Cognitive

Status in Alzheimer's Disease ». *Neurology*: 1495-1500. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000063311.58879.01>.

Goedert, M., et R. Jakes. 1990. « Expression of Separate Isoforms of Human Tau Protein: Correlation with the Tau Pattern in Brain and Effects on Tubulin Polymerization ». *The EMBO Journal*: 4225-30. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07870.x>.

Goedert, M., M. G. Spillantini, et R. A. Crowther. 1992. « Cloning of a Big Tau Microtubule-Associated Protein Characteristic of the Peripheral Nervous System ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 1983-87. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.5.1983>.

Goedert, M., M. G. Spillantini, R. Jakes, D. Rutherford, et R. A. Crowther. 1989. « Multiple Isoforms of Human Microtubule-Associated Protein Tau: Sequences and Localization in Neurofibrillary Tangles of Alzheimer's Disease ». *Neuron* : 519-26. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90210-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90210-9).

Goldspink, Deborah A., Frank Reimann, et Fiona M. Gribble. 2018. « Models and Tools for Studying Enteroendocrine Cells ». *Endocrinology*: 3874-84. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00672>.

Götz, Jürgen, Glenda Halliday, et Rebecca M. Nisbet. 2019. « Molecular Pathogenesis of the Tauopathies ». *Annual Review of Pathology*: 239-61. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012936>.

Goyal, R. K., et I. Hirano. 1996. « The Enteric Nervous System ». *The New England Journal of Medicine*: 1106-15. <https://doi.org/10.1056/NEJM199604253341707>.

Greenberg, S. G., P. Davies, J. D. Schein, et L. I. Binder. 1992. « Hydrofluoric Acid-Treated Tau PHF Proteins Display the Same Biochemical Properties as Normal Tau ». *The Journal of Biological Chemistry*: 564-69.

Greffard, Sandrine, Marc Verny, Anne-Marie Bonnet, Jean-Yves Beinis, Claude Gallinari, Sylvie Meaume, François Piette, Jean-Jacques Hauw, et Charles Duyckaerts. 2006. « Motor Score of the Unified Parkinson Disease Rating Scale as a Good Predictor of Lewy Body-Associated Neuronal Loss in the Substantia Nigra ». *Archives of Neurology*: 584-88. <https://doi.org/10.1001/archneur.63.4.584>.

Gribble, Fiona M., et Frank Reimann. 2019. « Function and Mechanisms of Enteroendocrine Cells and Gut Hormones in Metabolism ». *Nature Reviews. Endocrinology*: 226-37. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0168-8>.

Gu, Y., F. Oyama, et Y. Ihara. 1996. « Tau Is Widely Expressed in Rat Tissues ». *Journal of Neurochemistry*: 1235-44. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67031235.x>.

Guilhem de Lataillade, Adrien de, Thibaud Lebouvier, Wendy Noble, Laurène Leclair-Visonneau, et Pascal Derkinderen. 2020. « Enteric Synucleinopathy: From Trendy Concept to Real Entity ». *Free Neuropathology*: 1-26. <https://doi.org/10.17879/freeneuropathology-2020-2920>.

Guo, Tong, Wendy Noble, et Diane P. Hanger. 2017. « Roles of Tau Protein in Health and Disease ». *Acta Neuropathologica*: 665-704. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1707-9>.

Haensch, Carl-Albrecht, J. Wehe, A. Jigalin, et S. Isenmann. 2011. « Gastroparesis in Myotonic Dystrophy 1 ». *Clinical Autonomic Research: Official Journal of the Clinical Autonomic Research Society*: 125-26. <https://doi.org/10.1007/s10286-010-0097-z>.

Hampel, Harald, Jeffrey Cummings, Kaj Blennow, Peng Gao, Clifford R. Jack, et Andrea Vergallo. 2021. « Developing the ATX(N) Classification for Use across the Alzheimer Disease Continuum ». *Nature Reviews. Neurology*: 580-89. <https://doi.org/10.1038/s41582-021-00520-w>.

- Hampel, Harald, John Hardy, Kaj Blennow, Christopher Chen, George Perry, Seung Hyun Kim, Victor L. Villemagne, et al. 2021. « The Amyloid- β Pathway in Alzheimer's Disease ». *Molecular Psychiatry*: 5481-5503. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01249-0>.
- Hansen, Mark Berner. 2003. « The Enteric Nervous System I: Organisation and Classification ». *Pharmacology & Toxicology*: 105-13. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0773.2003.t01-1-920301.x>.
- Hee, Bart van der, et Jerry M. Wells. 2021. « Microbial Regulation of Host Physiology by Short-chain Fatty Acids ». *Trends in Microbiology*, Special Issue: Regulation of Human Health by the Microbiota, 700-712. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.02.001>.
- Hetz, Claudio, et Smita Saxena. 2017. « ER Stress and the Unfolded Protein Response in Neurodegeneration ». *Nature Reviews. Neurology*: 477-91. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.99>.
- Himmler, A., D. Drechsel, M. W. Kirschner, et D. W. Martin. 1989. « Tau Consists of a Set of Proteins with Repeated C-Terminal Microtubule-Binding Domains and Variable N-Terminal Domains ». *Molecular and Cellular Biology* : 1381-88. <https://doi.org/10.1128/mcb.9.4.1381-1388.1989>.
- Höfer, D., et D. Drenckhahn. 1999. « Localisation of Actin, Villin, Fimbrin, Ezrin and Ankyrin in Rat Taste Receptor Cells ». *Histochemistry and Cell Biology*: 79-86. <https://doi.org/10.1007/s004180050394>.
- Huang, Jian, Bowen Su, Ville Karhunen, Dipender Gill, Verena Zuber, Ari Ahola-Olli, Saranya Palaniswamy, et al. 2023. « Inflammatory Diseases, Inflammatory Biomarkers, and Alzheimer Disease: An Observational Analysis and Mendelian Randomization ». *Neurology*: e568-81. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000201489>.
- Huizinga, Jan D., et Wim J. E. P. Lammers. 2009. « Gut Peristalsis Is Governed by a Multitude of Cooperating Mechanisms ». *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* : G1-8. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90380.2008>.
- Hurley, Michael J., Elisa Menozzi, Sofia Koletsi, Rachel Bates, Matthew E. Gegg, Kai-Yin Chau, Hervé M. Blottière, Jane Macnaughtan, et Anthony H. V. Schapira. 2023. « α -Synuclein Expression in Response to Bacterial Ligands and Metabolites in Gut Enteroendocrine Cells: An in Vitro Proof of Concept Study ». *Brain Communications*: fcad285. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcad285>.
- Ittner, Lars M., Yazı D. Ke, Fabien Delerue, Mian Bi, Amadeus Gladbach, Janet van Eersel, Heidrun Wölfing, et al. 2010. « Dendritic Function of Tau Mediates Amyloid-Beta Toxicity in Alzheimer's Disease Mouse Models ». *Cell*: 387-97. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.036>.
- Jack, Clifford R., David A. Bennett, Kaj Blennow, Maria C. Carrillo, Billy Dunn, Samantha Budd Haeberlein, David M. Holtzman, et al. 2018. « NIA-AA Research Framework: Toward a Biological Definition of Alzheimer's Disease ». *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*: 535-62. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.018>.
- Jarret, Abigail, Ruaidhrí Jackson, Coco Duizer, Marc E. Healy, Jun Zhao, Joseph M. Rone, Piotr Bielecki, et al. 2020. « Enteric Nervous System-Derived IL-18 Orchestrates Mucosal Barrier Immunity ». *Cell*: 50-63.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.016>.
- Jessen, K. R., et R. Mirsky. 1983. « Astrocyte-like Glia in the Peripheral Nervous System: An Immunohistochemical Study of Enteric Glia ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*: 2206-18. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.03-11-02206.1983>.
- Jo, Chulman, Soner Gundemir, Susanne Pritchard, Youngnam N. Jin, Irfan Rahman, et Gail V. W. Johnson. 2014. « Nrf2 Reduces Levels of Phosphorylated Tau Protein by Inducing Autophagy Adaptor Protein NDP52 ». *Nature Communications*: 3496. <https://doi.org/10.1038/ncomms4496>.

- Jonge, Wouter J. de, Esmerij P. van der Zanden, Frans O. The, Maarten F. Bijlsma, David J. van Westerloo, Roelof J. Bennink, Hans-Rudolf Berthoud, et al. 2005. « Stimulation of the Vagus Nerve Attenuates Macrophage Activation by Activating the Jak2-STAT3 Signaling Pathway ». *Nature Immunology*: 844-51. <https://doi.org/10.1038/ni1229>.
- Kadavath, Harindranath, Romina V. Hofele, Jacek Biernat, Satish Kumar, Katharina Tepper, Henning Urlaub, Eckhard Mandelkow, et Markus Zweckstetter. 2015. « Tau Stabilizes Microtubules by Binding at the Interface between Tubulin Heterodimers ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 7501-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504081112>.
- Kaelberer, Melanie Maya, Kelly L. Buchanan, Marguerita E. Klein, Bradley B. Barth, Marcia M. Montoya, Xiling Shen, et Diego V. Bohórquez. 2018. « A Gut-Brain Neural Circuit for Nutrient Sensory Transduction ». *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aat5236>.
- Kalff, Jörg C., Andreas Türler, Nicolas T. Schwarz, Wolfgang H. Schraut, Kenneth K. W. Lee, David J. Tweardy, Timothy R. Billiar, Richard L. Simmons, et Anthony J. Bauer. 2003. « Intra-Abdominal Activation of a Local Inflammatory Response within the Human Muscularis Externa during Laparotomy ». *Annals of Surgery*: 301-15. <https://doi.org/10.1097/01.SLA.0000055742.79045.7E>.
- Kanaan, Nicholas M., et Tessa Grabinski. 2021. « Neuronal and Glial Distribution of Tau Protein in the Adult Rat and Monkey ». *Frontiers in Molecular Neuroscienc*: 607303. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.607303>.
- Kellogg, Elizabeth H., Nisreen M. A. Hejab, Simon Poepsel, Kenneth H. Downing, Frank DiMaio, et Eva Nogales. 2018. « Near-Atomic Model of Microtubule-Tau Interactions ». *Science*: 1242-46. <https://doi.org/10.1126/science.aat1780>.
- Kieffer, T. J., C. H. McIntosh, et R. A. Pederson. 1995. « Degradation of Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide and Truncated Glucagon-like Peptide 1 in Vitro and in Vivo by Dipeptidyl Peptidase IV ». *Endocrinology*: 3585-96. <https://doi.org/10.1210/endo.136.8.7628397>.
- Killinger, Bryan A., Zachary Madaj, Jacek W. Sikora, Nolwen Rey, Alec J. Haas, Yamini Vepa, Daniel Lindqvist, et al. 2018. « The Vermiform Appendix Impacts the Risk of Developing Parkinson's Disease ». *Science Translational Medicine* : eaar5280. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aar5280>.
- Knowles, Charles H., Greger Lindberg, Emanuele Panza, et Roberto De Giorgio. 2013. « New Perspectives in the Diagnosis and Management of Enteric Neuropathies ». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* : 206-18. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.18>.
- Knudsen, Karoline, Tatyana D. Fedorova, Anne C. Bekker, Peter Iversen, Karen Østergaard, Klaus Krogh, et Per Borghammer. 2017. « Objective Colonic Dysfunction Is Far More Prevalent than Subjective Constipation in Parkinson's Disease: A Colon Transit and Volume Study ». *Journal of Parkinson's Disease* : 359-67. <https://doi.org/10.3233/JPD-161050>.
- Kowalski, Karol, et Agata Mulak. 2019. « Brain-Gut-Microbiota Axis in Alzheimer's Disease ». *Journal of Neurogastroenterology and Motility* : 48-60. <https://doi.org/10.5056/jnm18087>.
- Lakhan, Shaheen E., et Annette Kirchgessner. 2010. « Neuroinflammation in Inflammatory Bowel Disease ». *Journal of Neuroinflammation*. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-37>.
- Larraufie, P., C. Martin-Gallausiaux, N. Lapaque, J. Dore, F. M. Gribble, F. Reimann, et H. M. Blottiere. 2018. « SCFAs Strongly Stimulate PYY Production in Human Enteroendocrine Cells ». *Scientific Reports*: 74. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18259-0>.

- Latorre, R., C. Sternini, R. De Giorgio, et B. Greenwood-Van Meerveld. 2016. « Enteroendocrine Cells: A Review of Their Role in Brain-Gut Communication ». *Neurogastroenterology and Motility*: 620-30. <https://doi.org/10.1111/nmo.12754>.
- Lebouvier, Thibaud, Michel Neunlist, Stanislas Bruley des Varannes, Emmanuel Coron, Anne Drouard, Jean-Michel N'Guyen, Tanguy Chaumette, et al. 2010. « Colonic Biopsies to Assess the Neuropathology of Parkinson's Disease and Its Relationship with Symptoms ». *PloS One*: e12728. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012728>.
- Leroy, Karelle, Alexis Bretteville, Katharina Schindowski, Emmanuel Gilissen, Michèle Authélet, Robert De Decker, Zehra Yilmaz, Luc Buée, et Jean-Pierre Brion. 2007. « Early Axonopathy Preceding Neurofibrillary Tangles in Mutant Tau Transgenic Mice ». *The American Journal of Pathology*: 976-92. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070345>.
- Li, Chang-Qing, Qing Zheng, Qi Wang, et Qing-Ping Zeng. 2016. « Biotic/Abiotic Stress-Driven Alzheimer's Disease ». *Frontiers in Cellular Neuroscience*: 269. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00269>.
- Lilly, M. P., et D. S. Gann. 1992. « The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal-Immune Axis. A Critical Assessment ». *Archives of Surgery*: 1463-74. <https://doi.org/10.1001/archsurg.1992.01420120097017>.
- Lindwall, G., et R. D. Cole. 1984. « Phosphorylation Affects the Ability of Tau Protein to Promote Microtubule Assembly ». *The Journal of Biological Chemistry*: 5301-5.
- Lionnet, Arthur, Laurène Leclair-Visonneau, Michel Neunlist, Shigeo Murayama, Masaki Takao, Charles H. Adler, Pascal Derkinderen, et Thomas G. Beach. 2018. « Does Parkinson's Disease Start in the Gut? ». *Acta Neuropathologica*: 1-12. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1777-8>.
- Lionnet, Arthur, Matthew A. Wade, Anne-Gaëlle Corbillé, Alice Prigent, Sébastien Paillusson, Maddalena Tasselli, Jacques Gonzales, et al. 2018. « Characterisation of Tau in the Human and Rodent Enteric Nervous System under Physiological Conditions and in Tauopathy ». *Acta Neuropathologica Communications*: 65. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0568-3>.
- Liu, Guoqiang, Quntao Yu, Houze Zhu, Bo Tan, Hongyan Yu, Xinyan Li, Youming Lu, et Hao Li. 2023. « Amyloid- β Mediates Intestinal Dysfunction and Enteric Neurons Loss in Alzheimer's Disease Transgenic Mouse ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*: 351. <https://doi.org/10.1007/s00018-023-04948-9>.
- Liu, Nanyang, Yi Wang, Lanye He, Jiahui Sun, Xing Wang, et Hao Li. 2022. « Inflammatory Bowel Disease and Risk of Dementia: An Updated Meta-Analysis ». *Frontiers in Aging Neuroscience*: 962681. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.962681>.
- Lomax, A. E., P. P. Bertrand, et J. B. Furness. 2001. « Electrophysiological Characteristics Distinguish Three Classes of Neuron in Submucosal Ganglia of the Guinea-Pig Distal Colon ». *Neuroscience*: 245-55. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00545-5](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00545-5).
- Lopes, Sofia, André Lopes, Vítor Pinto, Marco R. Guimarães, Vanessa Morais Sardinha, Sara Duarte-Silva, Sara Pinheiro, et al. 2016. « Absence of Tau Triggers Age-Dependent Sciatic Nerve Morphofunctional Deficits and Motor Impairment ». *Aging Cell*: 208-16. <https://doi.org/10.1111/acel.12391>.
- LoPresti, P., S. Szuchet, S. C. Pappasozomenos, R. P. Zinkowski, et L. I. Binder. 1995. « Functional Implications for the Microtubule-Associated Protein Tau: Localization in Oligodendrocytes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 10369-73. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.22.10369>.

- Luciano, Liliana, Stephanie Groos, et Enrico Reale. 2003. « Brush Cells of Rodent Gallbladder and Stomach Epithelia Express Neurofilaments ». *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*: 187-98. <https://doi.org/10.1177/002215540305100207>.
- Maina, Mahmoud B., Laura J. Bailey, Sherin Wagih, Luca Biasseti, Saskia J. Pollack, James P. Quinn, Julian R. Thorpe, Aidan J. Doherty, et Louise C. Serpell. 2018. « The Involvement of Tau in Nucleolar Transcription and the Stress Response ». *Acta Neuropathologica Communications*: 70. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0565-6>.
- Mansuroglu, Zeyni, Houda Benhelli-Mokrani, Vasco Marcato, Audrey Sultan, Marie Violet, Alban Chauderlier, Lucie Delattre, et al. 2016. « Loss of Tau Protein Affects the Structure, Transcription and Repair of Neuronal Pericentromeric Heterochromatin ». *Scientific Reports*: 33047. <https://doi.org/10.1038/srep33047>.
- Marchiando, Amanda M., W. Vallen Graham, et Jerrold R. Turner. 2010. « Epithelial Barriers in Homeostasis and Disease ». *Annual Review of Pathology*: 119-44. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092135>.
- Marciniak, Elodie, Antoine Leboucher, Emilie Caron, Tariq Ahmed, Anne Tailleux, Julie Dumont, Tarik Issad, et al. 2017. « Tau Deletion Promotes Brain Insulin Resistance ». *The Journal of Experimental Medicine*: 2257-69. <https://doi.org/10.1084/jem.20161731>.
- Matsuo, E. S., R. W. Shin, M. L. Billingsley, A. Van deVoorde, M. O'Connor, J. Q. Trojanowski, et V. M. Lee. 1994. « Biopsy-Derived Adult Human Brain Tau Is Phosphorylated at Many of the Same Sites as Alzheimer's Disease Paired Helical Filament Tau ». *Neuron*: 989-1002. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90264-x](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90264-x).
- Matsuyama, S. S., et W. Bondareff. 1994. « Tau-like Immunoreactivity in Alzheimer and Control Skin Fibroblasts ». *Journal of Neuroscience Research* : 519-24. <https://doi.org/10.1002/jnr.490390503>.
- Matteoli, Gianluca, Pedro J. Gomez-Pinilla, Andrea Nemethova, Martina Di Giovangiulio, Cathy Cailotto, Sjoerd H. van Bree, Klaus Michel, et al. 2014. « A Distinct Vagal Anti-Inflammatory Pathway Modulates Intestinal Muscularis Resident Macrophages Independent of the Spleen ». *Gut*: 938-48. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-304676>.
- Mawe, Gary M., et Jill M. Hoffman. 2013. « Serotonin Signalling in the Gut--Functions, Dysfunctions and Therapeutic Targets ». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*: 473-86. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.105>.
- Mayer, Emeran A. 2011. « Gut Feelings: The Emerging Biology of Gut-Brain Communication ». *Nature Reviews. Neuroscience*: 453-66. <https://doi.org/10.1038/nrn3071>.
- McCorry, Laurie Kelly. 2007. « Physiology of the Autonomic Nervous System ». *American Journal of Pharmaceutical Education*: 78. <https://doi.org/10.5688/aj710478>.
- Meurette, G., C. Blanchard, E. Duchalais-Dassonneville, S. Coquenlorge, P. Aubert, M. Wong, P.-A. Lehur, et M. Neunlist. 2012. « Sacral Nerve Stimulation Enhances Epithelial Barrier of the Rectum: Results from a Porcine Model ». *Neurogastroenterology and Motility*: 267-73, e110. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2011.01839.x>.
- Michel, Klaus, Birgit Kuch, Sophie Dengler, Ihsan Ekin Demir, Florian Zeller, et Michael Schemann. 2022. « How Big Is the Little Brain in the Gut? Neuronal Numbers in the Enteric Nervous System of Mice, Guinea Pig, and Human ». *Neurogastroenterology and Motility*: e14440. <https://doi.org/10.1111/nmo.14440>.

- Michel, Laure, et Alexandre Prat. 2016. « One More Role for the Gut: Microbiota and Blood Brain Barrier ». *Annals of Translational Medicine*: 15. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.10.16>.
- Miklossy, Judith, Hong Qing, Aleksandra Radenovic, Andras Kis, Bertrand Vileno, Forró László, Lisa Miller, et al. 2010. « Beta Amyloid and Hyperphosphorylated Tau Deposits in the Pancreas in Type 2 Diabetes ». *Neurobiology of Aging*: 1503-15. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.08.019>.
- Mudher, Amrit, Morvane Colin, Simon Dujardin, Miguel Medina, Ilse Dewachter, Seyedeh Maryam Alavi Naini, Eva-Maria Mandelkow, et al. 2017. « What Is the Evidence That Tau Pathology Spreads through Prion-like Propagation? » *Acta Neuropathologica Communications*: 99. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0488-7>.
- Mukrasch, Marco D., Martin von Bergen, Jacek Biernat, Daniela Fischer, Christian Griesinger, Eckhard Mandelkow, et Markus Zweckstetter. 2007. « The “Jaws” of the Tau-Microtubule Interaction ». *The Journal of Biological Chemistry*: 12230-39. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607159200>.
- Muller, Paul Andrew, Balázs Koscsó, Gaurav Manohar Rajani, Korey Stevanovic, Marie-Luise Berres, Daigo Hashimoto, Arthur Mortha, et al. 2014. « Crosstalk between Muscularis Macrophages and Enteric Neurons Regulates Gastrointestinal Motility ». *Cell*: 300-313. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.050>.
- Murofushi, H., M. Suzuki, H. Sakai, et S. Kobayashi. 1989. « Immunohistochemical Localization of Microtubule-Associated Proteins in the Nervous System of the Small Intestine of Guinea Pig ». *Cell and Tissue Research*: 315-22. <https://doi.org/10.1007/BF00224114>.
- Nadorra, R., B. H. Landing, et T. R. Wells. 1986. « Intestinal Plexuses in Crohn’s Disease and Ulcerative Colitis in Children: Pathologic and Microdissection Studies ». *Pediatric Pathology*: 267-87. <https://doi.org/10.3109/15513818609037718>.
- Neunlist, Michel, Malvyne Rolli-Derkinderen, Rocco Latorre, Laurianne Van Landeghem, Emmanuel Coron, Pascal Derkinderen, et Roberto De Giorgio. 2014. « Enteric Glial Cells: Recent Developments and Future Directions ». *Gastroenterology*: 1230-37. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.09.040>.
- Neunlist, Michel, Ferial Toumi, Tsvetelina Oreschkova, Marc Denis, Joel Leborgne, Christian L. Laboisse, Jean-Paul Galmiche, et Anne Jarry. 2003. « 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*: G1028-1036. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00066.2003>.
- Nguyen, Mytien, et Noah W. Palm. 2022. « Gut Instincts in Neuroimmunity from the Eighteenth to Twenty-First Centuries ». *Seminars in Immunopathology*: 569-79. <https://doi.org/10.1007/s00281-022-00948-2>.
- Oehmichen, M., et P. Reifferscheid. 1977. « Intramural Ganglion Cell Degeneration in Inflammatory Bowel Disease ». *Digestion*: 482-96. <https://doi.org/10.1159/000198039>.
- O’Toole, Paul W., et Ian B. Jeffery. 2018. « Microbiome-Health Interactions in Older People ». *Cellular and Molecular Life Sciences*: 119-28. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2673-z>.
- Otvos, L., L. Feiner, E. Lang, G. I. Szendrei, M. Goedert, et V. M. Lee. 1994. « Monoclonal Antibody PHF-1 Recognizes Tau Protein Phosphorylated at Serine Residues 396 and 404 ». *Journal of Neuroscience Research* : 669-73. <https://doi.org/10.1002/jnr.490390607>.
- Oullier, Thibault, Alice Prigent, Guillaume Chapelet, Michel Neunlist, Franck Letournel, et Pascal Derkinderen. 2020. « Optimizing Filter Trap Assay for the Detection of Aggregated Alpha-Synuclein

in Brain Samples ». *Free Neuropathology*: 1-14. <https://doi.org/10.17879/freeneuropathology-2020-2749>.

Pan, Lina, Chunrui Li, Lanxia Meng, Ye Tian, Mingyang He, Xin Yuan, Guoxin Zhang, et al. 2022. « Tau Accelerates α -Synuclein Aggregation and Spreading in Parkinson's Disease ». *Brain*: 3454-71. <https://doi.org/10.1093/brain/awac171>.

Papasozomenos, S. C., et L. I. Binder. 1987. « Phosphorylation Determines Two Distinct Species of Tau in the Central Nervous System ». *Cell Motility and the Cytoskeleton*: 210-26. <https://doi.org/10.1002/cm.970080303>.

Papegaey, Anthony, Sabiha Eddarkaoui, Vincent Deramecourt, Francisco-Jose Fernandez-Gomez, Pierre Pantano, Hélène Obriot, Camille Machala, et al. 2016. « Reduced Tau Protein Expression Is Associated with Frontotemporal Degeneration with Progranulin Mutation ». *Acta Neuropathologica Communications*: 74. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0345-0>.

Pooler, Amy M., Emma C. Phillips, Dawn H. W. Lau, Wendy Noble, et Diane P. Hanger. 2013. « Physiological Release of Endogenous Tau Is Stimulated by Neuronal Activity ». *EMBO Reports*: 389-94. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.15>.

Prigent, Alice, Guillaume Chapelet, Adrien De Guilhem de Lataillade, Thibault Oullier, Emilie Durieu, Arnaud Bourreille, Emilie Duchalais, et al. 2020. « Tau Accumulates in Crohn's Disease Gut ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*: 9285-96. <https://doi.org/10.1096/fj.202000414R>.

Prigent, Alice, Jacques Gonzales, Tony Durand, Catherine Le Berre-Scoul, Malvyne Rolli-Derkinderen, Michel Neunlist, et Pascal Derkinderen. 2019. « Acute Inflammation Down-Regulates Alpha-Synuclein Expression in Enteric Neurons ». *Journal of Neurochemistry*: 746-60. <https://doi.org/10.1111/jnc.14656>.

Puig, Kendra L., Brianna M. Lutz, Siri A. Urquhart, Andrew A. Rebel, Xudong Zhou, Gunjan D. Manocha, MaryAnn Sens, Ashok K. Tuteja, Norman L. Foster, et Colin K. Combs. 2015. « Overexpression of Mutant Amyloid- β Protein Precursor and Presenilin 1 Modulates Enteric Nervous System ». *Journal of Alzheimer's Disease*: 1263-78. <https://doi.org/10.3233/JAD-142259>.

Rauch, Jennifer N., Gabriel Luna, Elmer Guzman, Morgane Audouard, Collin Challis, Youssef E. Sibih, Carolina Leshuk, et al. 2020. « LRP1 Is a Master Regulator of Tau Uptake and Spread ». *Nature*: 381-85. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2156-5>.

Raue, Friedhelm, et Karin Frank-Raue. 2010. « Update Multiple Endocrine Neoplasia Type 2 ». *Familial Cancer*: 449-57. <https://doi.org/10.1007/s10689-010-9320-2>.

Reimann, Frank, Abdella M. Habib, Gwen Tolhurst, Helen E. Parker, Gareth J. Rogers, et Fiona M. Gribble. 2008. « Glucose Sensing in L Cells: A Primary Cell Study ». *Cell Metabolism*: 532-39. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.11.002>.

Reynolds, C. Hugh, Claire J. Garwood, Selina Wray, Caroline Price, Stuart Kellie, Timothy Perera, Marketa Zvelebil, et al. 2008. « Phosphorylation Regulates Tau Interactions with Src Homology 3 Domains of Phosphatidylinositol 3-Kinase, Phospholipase C γ 1, Grb2, and Src Family Kinases ». *The Journal of Biological Chemistry*: 18177-86. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709715200>.

Roberts, Rosalind F., Richard Wade-Martins, et Javier Alegre-Abarrategui. 2015. « Direct Visualization of Alpha-Synuclein Oligomers Reveals Previously Undetected Pathology in Parkinson's Disease Brain ». *Brain: A Journal of Neurology*: 1642-57. <https://doi.org/10.1093/brain/awv040>.

- Rodrigues, Paulla Vieira, João Vitor Pereira de Godoy, Beatriz Pelegrini Bosque, Dionísio Pedro Amorim Neto, Katiane Tostes, Soledad Palameta, Sheila Garcia-Rosa, Celisa Caldana Costa Tonoli, Hernandes Faustino de Carvalho, et Matheus de Castro Fonseca. 2022. « Transcellular Propagation of Fibrillar α -Synuclein from Enteroendocrine to Neuronal Cells Requires Cell-to-Cell Contact and Is Rab35-Dependent ». *Scientific Reports*: 4168. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08076-5>.
- Rogers, G. J., G. Tolhurst, A. Ramzan, A. M. Habib, H. E. Parker, F. M. Gribble, et F. Reimann. 2011. « Electrical Activity-Triggered Glucagon-like Peptide-1 Secretion from Primary Murine L-Cells ». *The Journal of Physiology*: 1081-93. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.198069>.
- Ruffmann, C., N. Bengoa-Vergniory, I. Poggiolini, D. Ritchie, M. T. Hu, J. Alegre-Abarrategui, et L. Parkkinen. 2018. « Detection of Alpha-Synuclein Conformational Variants from Gastro-Intestinal Biopsy Tissue as a Potential Biomarker for Parkinson's Disease ». *Neuropathology and Applied Neurobiology*: 722-36. <https://doi.org/10.1111/nan.12486>.
- Rumessen, Jüri J., Jean-Marie Vanderwinden, et Thomas Horn. 2011. « Crohn's Disease: Ultrastructure of Interstitial Cells in Colonic Myenteric Plexus ». *Cell and Tissue Research*: 471-79. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1175-9>.
- Sakaguchi, T., M. Okada, T. Kitamura, et K. Kawasaki. 1993. « Reduced Diameter and Conduction Velocity of Myelinated Fibers in the Sciatic Nerve of a Neurofilament-Deficient Mutant Quail ». *Neuroscience Letters*: 65-68. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(93\)90078-y](https://doi.org/10.1016/0304-3940(93)90078-y).
- Sampson, Timothy R., Justine W. Debelius, Taren Thron, Stefan Janssen, Gauri G. Shastri, Zehra Esra Ilhan, Collin Challis, et al. 2016. « Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease ». *Cell*: 1469-1480.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.018>.
- Schemann, M., et M. Neunlist. 2004. « The Human Enteric Nervous System ». *Neurogastroenterology and Motility*: 55-59. <https://doi.org/10.1111/j.1743-3150.2004.00476.x>.
- Scheperjans, Filip, Velma Aho, Pedro A. B. Pereira, Kaisa Koskinen, Lars Paulin, Eero Pekkonen, Elena Haapaniemi, et al. 2014. « Gut Microbiota Are Related to Parkinson's Disease and Clinical Phenotype ». *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.26069>.
- Schmidt, M. L., R. Huang, J. A. Martin, J. Henley, M. Mawal-Dewan, H. I. Hurtig, V. M. Lee, et J. Q. Trojanowski. 1996. « Neurofibrillary Tangles in Progressive Supranuclear Palsy Contain the Same Tau Epitopes Identified in Alzheimer's Disease PHFtau ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*: 534-39. <https://doi.org/10.1097/00005072-199605000-00006>.
- Schneider, J., E. C. Jehle, M. J. Starlinger, M. Neunlist, K. Michel, S. Hoppe, et M. Schemann. 2001. « Neurotransmitter Coding of Enteric Neurons in the Submucous Plexus Is Changed in Non-Inflamed Rectum of Patients with Crohn's Disease ». *Neurogastroenterology and Motility*: 255-64. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2982.2001.00265.x>.
- Schubert, Mitchell L., et David A. Peura. 2008. « Control of Gastric Acid Secretion in Health and Disease ». *Gastroenterology*: 1842-60. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.05.021>.
- Semar, Sandra, Markus Klotz, Maryse Letiembre, Chris Van Ginneken, Anne Braun, Viktor Jost, Michael Bischof, et al. 2013. « Changes of the Enteric Nervous System in Amyloid- β Protein Precursor Transgenic Mice Correlate with Disease Progression ». *Journal of Alzheimer's Disease*: 7-20. <https://doi.org/10.3233/JAD-120511>.
- Sengupta, Urmi, Marcos J. Guerrero-Muñoz, Diana L. Castillo-Carranza, Cristian A. Lasagna-Reeves, Julia E. Gerson, Adriana A. Paulucci-Holthausen, Shashirekha Krishnamurthy, Malika Farhed, George R. Jackson, et Rakez Kaye. 2015. « Pathological Interface between Oligomeric Alpha-Synuclein and

Tau in Synucleinopathies ». *Biological Psychiatry*: 672-83.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.12.019>.

Sexton, Claire, Heather Snyder, Dirk Beher, Adam L. Boxer, Pat Brannelly, Jean-Pierre Brion, Luc Buée, et al. 2022. « Current directions in tau research: Highlights from Tau 2020 ». *Alzheimer's & Dementia*: 988-1007. <https://doi.org/10.1002/alz.12452>.

Shankle, W. R., B. H. Landing, S. M. Ang, H. Chui, G. Villarreal-Engelhardt, et C. Zarow. 1993. « Studies of the Enteric Nervous System in Alzheimer Disease and Other Dementias of the Elderly: Enteric Neurons in Alzheimer Disease ». *Modern Pathology*: 10-14.

Shi, Yang, Wenjuan Zhang, Yang Yang, Alexey G. Murzin, Benjamin Falcon, Abhay Kotecha, Mike van Beers, et al. 2021. « Structure-Based Classification of Tauopathies ». *Nature*: 359-63. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03911-7>.

Shin, R. W., T. Iwaki, T. Kitamoto, et J. Tateishi. 1991. « Hydrated Autoclave Pretreatment Enhances Tau Immunoreactivity in Formalin-Fixed Normal and Alzheimer's Disease Brain Tissues ». *Laboratory Investigation*: 693-702.

Sjöberg, Marcela K., Elena Shestakova, Zeyni Mansuroglu, Ricardo B. Maccioni, et Eliette Bonnefoy. 2006. « Tau Protein Binds to Pericentromeric DNA: A Putative Role for Nuclear Tau in Nucleolar Organization ». *Journal of Cell Science*: 2025-34. <https://doi.org/10.1242/jcs.02907>.

Skaba, Richard. 2007. « Historic Milestones of Hirschsprung's Disease (Commemorating the 90th Anniversary of Professor Harald Hirschsprung's Death) ». *Journal of Pediatric Surgery*: 249-51. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2006.09.024>.

Sotiropoulos, Ioannis, Marie-Christine Galas, Joana M. Silva, Efthimios Skoulakis, Susanne Wegmann, Mahmoud Bukar Maina, David Blum, et al. 2017. « Atypical, Non-Standard Functions of the Microtubule Associated Tau Protein ». *Acta Neuropathologica Communications*: 91. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0489-6>.

Spillantini, Maria Grazia, et Michel Goedert. 2013. « Tau Pathology and Neurodegeneration ». *The Lancet. Neurology* : 609-22. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70090-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70090-5).

Spina, Salvatore, Renaud La Joie, Cathrine Petersen, Amber L. Nolan, Deion Cuevas, Celica Cosme, Mackenzie Hepker, et al. 2021. « Comorbid Neuropathological Diagnoses in Early versus Late-Onset Alzheimer's Disease ». *Brain*: 2186-98. <https://doi.org/10.1093/brain/awab099>.

Sternini, Catia, Laura Anselmi, et Enrique Rozengurt. 2008. « Enteroendocrine Cells: A Site of "taste" in Gastrointestinal Chemosensing ». *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*: 73-78. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e3282f43a73>.

Sudo, Nobuyuki, Yoichi Chida, Yuji Aiba, Junko Sonoda, Naomi Oyama, Xiao-Nian Yu, Chiharu Kubo, et Yasuhiro Koga. 2004. « Postnatal Microbial Colonization Programs the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal System for Stress Response in Mice ». *The Journal of Physiology*: 263-75. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.063388>.

Sultan, Audrey, Fabrice Nessler, Marie Violet, Séverine Bégard, Anne Loyens, Smail Talahari, Zeyni Mansuroglu, et al. 2011. « Nuclear Tau, a Key Player in Neuronal DNA Protection ». *The Journal of Biological Chemistry*: 4566-75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.199976>.

Sun, He-Li, Yuan Feng, Qing Zhang, Jia-Xin Li, Yue-Ying Wang, Zhaohui Su, Teris Cheung, Todd Jackson, Sha Sha, et Yu-Tao Xiang. 2022. « The Microbiome-Gut-Brain Axis and Dementia: A Bibliometric Analysis ». *International Journal of Environmental Research and Public Health*: 16549. <https://doi.org/10.3390/ijerph192416549>.

- Sun, Yayi, Nerina R. Sommerville, Julia Yuen Hang Liu, Man Piu Ngan, Daniel Poon, Eugene D. Ponomarev, Zengbing Lu, Jeng S. C. Kung, et John A. Rudd. 2020. « Intra-Gastrointestinal Amyloid-B1-42 Oligomers Perturb Enteric Function and Induce Alzheimer's Disease Pathology ». *The Journal of Physiology*: 4209-23. <https://doi.org/10.1113/JP279919>.
- Suzuki, Kazuyo, Kanako Iwasaki, Yuki Murata, Norio Harada, Shunsuke Yamane, Akihiro Hamasaki, Kimitaka Shibue, et al. 2018. « Distribution and hormonal characterization of primary murine L cells throughout the gastrointestinal tract ». *Journal of Diabetes Investigation*: 25-32. <https://doi.org/10.1111/jdi.12681>.
- Suzuki, Takuya. 2013. « Regulation of Intestinal Epithelial Permeability by Tight Junctions ». *Cellular and Molecular Life Sciences*: 631-59. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1070-x>.
- Szendrei, G. I., V. M. Lee, et L. Otvos. 1993. « Recognition of the Minimal Epitope of Monoclonal Antibody Tau-1 Depends upon the Presence of a Phosphate Group but Not Its Location ». *Journal of Neuroscience Research*: 243-49. <https://doi.org/10.1002/jnr.490340212>.
- Takeda, Shuko, Susanne Wegmann, Hansang Cho, Sarah L. DeVos, Caitlin Commins, Allyson D. Roe, Samantha B. Nicholls, et al. 2015. « Neuronal Uptake and Propagation of a Rare Phosphorylated High-Molecular-Weight Tau Derived from Alzheimer's Disease Brain ». *Nature Communication*: 8490. <https://doi.org/10.1038/ncomms9490>.
- Tam, P. K. 1990. « An Immunohistological Study of the Human Enteric Nervous System with Microtubule-Associated Proteins ». *Gastroenterology*: 1841-44. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(90\)90499-q](https://doi.org/10.1016/0016-5085(90)90499-q).
- Taniguchi-Watanabe, Sayuri, Tetsuaki Arai, Fuyuki Kametani, Takashi Nonaka, Masami Masuda-Suzukake, Airi Tarutani, Shigeo Murayama, et al. 2016. « Biochemical Classification of Tauopathies by Immunoblot, Protein Sequence and Mass Spectrometric Analyses of Sarkosyl-Insoluble and Trypsin-Resistant Tau ». *Acta Neuropathologica*: 267-80. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1503-3>.
- Torres, Joana, Saurabh Mehandru, Jean-Frédéric Colombel, et Laurent Peyrin-Biroulet. 2017. « Crohn's Disease ». *Lancet*: 1741-55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31711-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31711-1).
- Udit, Swalpa, Kimbria Blake, et Isaac M. Chiu. 2022. « Somatosensory and Autonomic Neuronal Regulation of the Immune Response ». *Nature Reviews Neuroscience*: 157-71. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00555-4>.
- Van Ginneken, Chris, Karl-Herbert Schäfer, Debby Van Dam, Véronique Huygelen, et Peter P. De Deyn. 2011. « Morphological Changes in the Enteric Nervous System of Aging and APP23 Transgenic Mice ». *Brain Research*: 43-53. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.01.030>.
- Verheijden, Simon, et Guy E. Boeckxstaens. 2018. « Neuroimmune Interaction and the Regulation of Intestinal Immune Homeostasis ». *American Journal of Physiology*: G75-80. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00425.2016>.
- Verlhac, Pauline, Isabel P. Grégoire, Olga Azocar, Denitsa S. Petkova, Joël Baguet, Christophe Viret, et Mathias Faure. 2015. « Autophagy Receptor NDP52 Regulates Pathogen-Containing Autophagosome Maturation ». *Cell Host & Microbe*: 515-25. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.02.008>.
- Villanacci, V., G. Bassotti, R. Nascimbeni, E. Antonelli, M. Cadei, S. Fisogni, B. Salerni, et K. Geboes. 2008. « Enteric Nervous System Abnormalities in Inflammatory Bowel Diseases ». *Neurogastroenterology and Motility*: 1009-16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2008.01146.x>.
- Viola, Maria Francesca, et Guy Boeckxstaens. 2020. « Intestinal Resident Macrophages: Multitaskers of the Gut ». *Neurogastroenterology and Motility* : e13843. <https://doi.org/10.1111/nmo.13843>.

- Violet, Marie, Lucie Delattre, Meryem Tardivel, Audrey Sultan, Alban Chauderlier, Raphaelle Caillierez, Smail Talahari, et al. 2014. « A Major Role for Tau in Neuronal DNA and RNA Protection in Vivo under Physiological and Hyperthermic Conditions ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* : 84. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00084>.
- Volpicelli-Daley, Laura, et Patrik Brundin. 2018. « Prion-like Propagation of Pathology in Parkinson Disease ». *Handbook of Clinical Neurology* : 321-35. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63945-5.00017-9>.
- Vulchanova, Lucy, Melissa A. Casey, Gwen W. Crabb, William R. Kennedy, et David R. Brown. 2007. « Anatomical Evidence for Enteric Neuroimmune Interactions in Peyer's Patches ». *Journal of Neuroimmunology* : 64-74. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2007.01.014>.
- Wakabayashi, Koichi, Fumiaki Mori, Kunikazu Tanji, Satoshi Orimo, et Hitoshi Takahashi. 2010. « Involvement of the Peripheral Nervous System in Synucleinopathies, Tauopathies and Other Neurodegenerative Proteinopathies of the Brain ». *Acta Neuropathologica*: 1-12. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0706-x>.
- Wang, Yan, et Lloyd H. Kasper. 2014. « The Role of Microbiome in Central Nervous System Disorders ». *Brain, Behavior, and Immunity* : 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.12.015>.
- Wang, Yipeng, Varun Balaji, Senthilvelrajan Kaniyappan, Lars Krüger, Stephan Irsen, Katharina Tepper, RamReddy Chandupatla, et al. 2017. « The Release and Trans-Synaptic Transmission of Tau via Exosomes ». *Molecular Neurodegeneration* : 5. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0143-y>.
- Wang, Yipeng, et Eckhard Mandelkow. 2016. « Tau in Physiology and Pathology ». *Nature Reviews. Neuroscience*: 5-21. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.1>.
- Wattchow, D., S. Brookes, E. Murphy, S. Carbone, D. de Fontgalland, et M. Costa. 2008. « Regional Variation in the Neurochemical Coding of the Myenteric Plexus of the Human Colon and Changes in Patients with Slow Transit Constipation ». *Neurogastroenterology and Motility*: 1298-1305. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2008.01165.x>.
- Wehner, Sven, Florian F. Behrendt, Boris N. Lyutenski, Mariola Lysson, Anthony J. Bauer, Andreas Hirner, et Jörg C. Kalff. 2007. « Inhibition of Macrophage Function Prevents Intestinal Inflammation and Postoperative Ileus in Rodents ». *Gut* : 176-85. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.089615>.
- Weingarten, M. D., A. H. Lockwood, S. Y. Hwo, et M. W. Kirschner. 1975. « A Protein Factor Essential for Microtubule Assembly ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* : 1858-62. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.5.1858>.
- Wray, Selina, Malcolm Saxton, Brian H. Anderton, et Diane P. Hanger. 2008. « Direct Analysis of Tau from PSP Brain Identifies New Phosphorylation Sites and a Major Fragment of N-Terminally Cleaved Tau Containing Four Microtubule-Binding Repeats ». *Journal of Neurochemistry* : 2343-52. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05321.x>.
- Yan, Yiqing, Deepshika Ramanan, Milena Rozenberg, Kelly McGovern, Daniella Rastelli, Brinda Vijaykumar, Omar Yaghi, et al. 2021. « Interleukin-6 Produced by Enteric Neurons Regulates the Number and Phenotype of Microbe-Responsive Regulatory T Cells in the Gut ». *Immunity*: 499-513.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.02.002>.
- Ye, Lihua, Munhyung Bae, Chelsi D. Cassilly, Sairam V. Jabba, Daniel W. Thorpe, Alyce M. Martin, Hsiu-Yi Lu, et al. 2021. « Enteroendocrine Cells Sense Bacterial Tryptophan Catabolites to Activate Enteric and Vagal Neuronal Pathways ». *Cell Host & Microbe*: 179-196.e9. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.11.011>.

Ye, Lihua, Olaf Mueller, Jennifer Bagwell, Michel Bagnat, Rodger A Liddle, et John F Rawls. s. d. « High fat diet induces microbiota-dependent silencing of enteroendocrine cells ». *eLife* 8: e48479. <https://doi.org/10.7554/eLife.48479>.

Yu, Yanbo, Wenjing Yang, Yanqing Li, et Yingzi Cong. 2020. « Enteroendocrine Cells: Sensing Gut Microbiota and Regulating Inflammatory Bowel Diseases ». *Inflammatory Bowel Diseases*: 11-20. <https://doi.org/10.1093/ibd/izz217>.

Zhao, Y., P. Dua, et W. J. Lukiw. 2015. « Microbial Sources of Amyloid and Relevance to Amyloidogenesis and Alzheimer's Disease (AD) ». *Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism*: 177. <https://doi.org/10.4172/2161-0460.1000177>.

Zhernakova, Alexandra, Alexander Kurilshikov, Marc Jan Bonder, Etti F. Tigchelaar, Melanie Schirmer, Tommi Vatanen, Zlatan Mujagic, et al. 2016. « Population-Based Metagenomics Analysis Reveals Markers for Gut Microbiome Composition and Diversity ». *Science* 352 (6285): 565-69. <https://doi.org/10.1126/science.aad3369>.

Tau dans le tube digestif : expression et phosphorylation dans les neurones entériques et dans les cellules entéroendocrines.

Mots clés : Protéine tau, Système Nerveux Entérique, Maladie de Crohn, Cellules Enteroendocrines

Résumé : L'axe intestin-cerveau est impliqué dans le développement de la maladie de Parkinson, qui est une synucléinopathie, via des voies métaboliques, inflammatoires et endocriniennes. Cependant, il existe peu d'étude concernant les autres maladies neurodégénératives, en particulier les tauopathies. L'objectif de ce travail de thèse a donc été de (i) d'étudier l'expression et la phosphorylation de la protéine tau dans les cellules entéroendocrines (CEE) qui ont un rôle important dans les voies de signalisation de l'axe intestin-cerveau (ii) de caractériser l'expression de la protéine tau dans les neurones entériques, dans un contexte d'inflammation et de neuropathie entérique (maladie de Crohn). Nos résultats mettent en évidence que le niveau d'expression de la protéine tau était augmenté dans les neurones

entériques du colon de sujets atteints de maladie de Crohn. Des expériences complémentaires sur des souris transgéniques et des cultures primaires de SNE de rat ont montré que le facteur de transcription Nrf2 était impliqué dans cette augmentation d'expression dans un contexte inflammatoire. De plus, nous avons montré que les CCE du colon adulte humain, ainsi que des lignées de CEE, exprimaient certaines isoformes de tau, et que le niveau de phosphorylation de tau pouvait être modulé par des acides gras à chaîne courte. Nos résultats ouvrent de nouvelles perspectives sur le rôle potentiel de la protéine tau dans l'axe intestin-cerveau, que ce soit pour des maladies neurodégénératives du SNC, ou des maladies digestives.

Tau in the gut: expression and phosphorylation in enteric neurons and enteroendocrine cells

Keywords : tau protein, Enteric Nervous System, Crohn Disease, Enteroendocrin cells

Abstract : It is now well established that the gut-brain axis is involved in the development of Parkinson's disease the main type of synucleinopathy. In contrast, existing studies on the possible role of the gut-brain axis in other neurodegenerative diseases, especially tauopathies, are still scarce. The objective of this thesis work was therefore twofold (i) to characterize the expression of the tau protein in enteric neurons in Crohn's disease, gut disorder that combines inflammation and involvement of enteric neurons (ii) to study the expression and phosphorylation of tau in one of the key component of the gut-brain axis, namely the enteroendocrine cells (EECs). We showed that expression levels of tau protein expression were increased in colonic enteric neurons in subjects

with Crohn's disease compared to controls. Additional experiments performed in transgenic mice and primary cultures of rat ENS showed that the transcription factor Nrf2 was involved in inflammatory-induced tau upregulation. Regarding EECs, we showed that both EECs from human adult colon and from EEC lines expressed certain isoforms of tau and that the amount of tau phosphorylation could be modulated by short chain fatty acids such as propionate and acetate. Our results open new perspectives on the potential role of tau protein in the gut-brain axis, either for neurodegenerative disorders of the CNS or digestive diseases.