

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ	iv
LISTE DES FIGURES ET TABLEAU	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xii

CHAPITRE I

INTRODUCTION	1
1.1 La Dopamine	1
1.1.1 Le Métabolisme de la dopamine.....	1
1.1.2 Les Voies dopaminergiques.....	3
1.2 La Maladie de Parkinson	5
1.2.1 Un peu d'histoire.....	5
1.2.2 Les Symptômes moteurs.....	7
1.2.3 Les Symptômes non-moteurs.....	10
1.2.4 Quelques traitements de la Maladie de Parkinson	11
1.2.5 Les Avancées : un petit mot sur la thérapie cellulaire	15
1.2.6 Les Causes de la Maladie de Parkinson : diverses possibilités.....	15
1.2.7 La Prévention.....	19
1.3 Le Stress oxydant.....	22
1.3.1 Les Radicaux libres.....	23
1.3.2 La Production d'espèces réactives de l'oxygène	24
1.3.3 La Réponse antioxydante.....	26
1.4 L'Hyperglycémie et le diabète.....	28
1.4.1 Quelques Définitions	28
1.4.2 Les Types de diabète.....	29
1.4.3 La Biochimie de l'hyperglycémie chronique.....	30
1.5 L'Anatomie du système nerveux entérique	33
1.5.1 Quelques neurones du système nerveux entérique	34

1.5.2	Les Atteintes intestinales dans la Maladie de Parkinson	36
CHAPITRE II		
	HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	38
CHAPITRE III		
	MATÉRIELS ET MÉTHODES	40
3.1	Le Protocole <i>in vivo</i> : rats hyperglycémiques.....	40
3.1.1	Les Médicaments, produits chimiques et appareils	40
3.1.2	Les Animaux et groupes expérimentaux	40
3.1.3	La Préparation des solutions injectables et l'induction de l'hyperglycémie	41
3.1.4	Les Mesures métaboliques.....	41
3.1.5	Les Sacrifices et prélèvements d'organes.....	43
3.2	L'Analyse des cerveaux de rats hyperglycémiques.....	43
3.2.1	Les Anticorps.....	43
3.2.2	L'Extraction des protéines et dosages	44
3.2.3	La Détermination de la protéine à utiliser comme standard de chargement.....	44
3.2.4	La Détermination d'un marqueur de tyrosine hydroxylase	48
3.2.5	L'Électrophorèse et l'immunobuvardage de type Western	49
3.3	L'Analyse des intestins de rats hyperglycémiques.....	49
3.3.1	Les Coupes des intestins des rats hyperglycémiques.....	49
3.3.2	Les Colorations	50
3.4	L'Immunodétection dans les intestins des rats hyperglycémiques.....	51
3.4.1	Les Anticorps.....	51
3.4.2	L'Immunohistochimie	51
3.4.3	L'Immunofluorescence.....	52
3.5	L'Analyse statistique	52
CHAPITRE IV		
	RÉSULTATS.....	53
4.1	Les Résultats des tests métaboliques	53
4.1.1	La Glycémie.....	53

4.1.2	Le Poids des animaux	54
4.2	La Détermination de la perte neuronale dans le système nerveux central.....	55
4.2.1	L'Expression du marqueur neuronal NeuN dans le système nerveux central.....	55
4.3	La Détermination de la modulation dopaminergique dans le système nerveux central	57
4.3.1	L'Expression de la protéine tyrosine hydroxylase dans le système nerveux central.....	57
4.3.2	L'Expression de la protéine transporteur de la dopamine dans le système nerveux central.....	60
4.4	La Coloration par le bleu cuprolinique au niveau du système nerveux entérique	62
4.4.1	La Coloration des plexus myentériques de l'intestin grêle par le bleu cuprolinique	62
4.5	La Détermination de la perte neuronale et modulation dopaminergique dans le SNE.....	64
4.5.1	L'Expression de marqueurs neuronaux et dopaminergiques dans l'intestin grêle (région non-spécifiée).....	64
 CHAPITRE V		
DISCUSSION		67
5.1	Vérification de la modulation de la quantité de neurones dans le système nerveux central.....	69
5.1.1	Le NeuN dans le mésencéphale	70
5.1.2	Le NeuN dans le striatum	70
5.2	Vérification de la modulation de l'expression de la dopamine dans le système nerveux central.....	71
5.2.1	La Tyrosine hydroxylase dans le mésencéphale.....	71
5.2.2	La Tyrosine hydroxylase dans le striatum	71
5.2.3	Le Transporteur de la dopamine dans le mésencéphale	72
5.2.4	Le Transporteur de la dopamine dans le striatum.....	72
5.3	Vérification de la modulation de la quantité de neurones dans le système nerveux entérique.....	72
5.3.1	Le NeuN dans l'intestin grêle	73

5.4	Vérification de la modulation de l'expression de la dopamine dans le système nerveux entérique.....	74
5.4.1	La Tyrosine hydroxylase dans l'intestin grêle.....	74
CHAPITRE VI		
CONCLUSION.....		75
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		77

LISTE DES FIGURES ET TABLEAU

Figure		Page
1.1	Synthèse de la dopamine.....	1
1.2	Neurotransmission dopaminergique	2
1.3	Dégradation de la dopamine par les enzymes de dégradation et produits de dégradation.....	3
1.4	Représentation des voies dopaminergiques dans le cerveau.....	4
1.5	Comparaison entre le mésencéphale d'un patient sain et un patient atteint de la Maladie de Parkinson	8
1.6	Représentation d'un corps de Lewy	8
1.7	Représentation de la posture typique d'un patient parkinsonien.....	10
1.8	Représentation de la formation de la lévodopa et de son passage à travers la barrière hémato-encéphalique	12
1.9	Représentation de la stimulation cérébrale profonde.....	14
1.10	Comparaison de la molécule de MPTP avec celle du pesticide paraquat.....	18
1.11	Représentation du don d'un électron à un radical libre.....	23
1.12	Réaction d'auto-oxydation de la dopamine	25
1.13	Réaction de Fenton	25
1.14	Balance entre les capacités antioxydantes et les espèces réactives de l'oxygène.....	26
1.15	Réaction catalysée par l'enzyme superoxyde dismutase	27
1.16	Réaction catalysée par la glutathion-peroxydase.....	27
1.17	Réaction catalysée par la catalase.....	27
1.18	Nombre de personnes diabétiques diagnostiquées mondialement en 2013 ...	29
1.19	Formation de la base de Schiff.....	30
1.20	Formation du produit d'Amadori	31
1.21	Formation d'AGE.....	31

1.22	Voie de la protéine kinase C	32
1.23	Représentation de l'intestin en coupe transverse.....	33
3.1	Expression relative de la protéine β -tubuline dans différentes régions du cerveau des rats	45
3.2	Expression relative de la protéine chaîne légère du polypeptide neurofilament dans différentes régions du cerveau des rats	46
3.3	Expression relative de la protéine actine dans différentes régions du cerveau des rats	47
3.4	Représentation des cellules PC12 différenciées, en immunofluorescence	48
4.1	Glycémie des rats dans le temps	54
4.2	Poids des rats dans le temps.....	55
4.3	Expression du marqueur neuronal NeuN dans le mésencéphale et dans la substance noire <i>pars compacta</i>	56
4.4	Expression du marqueur neuronal NeuN dans le striatum.....	57
4.5	Expression du marqueur de neurone dopaminergique, la tyrosine hydroxylase, dans le mésencéphale et dans la substance noire <i>pars compacta</i>	59
4.6	Expression du marqueur de neurone dopaminergique, la tyrosine hydroxylase, dans le striatum.....	60
4.7	Expression du marqueur de neurone dopaminergique, le transporteur de la dopamine, dans le mésencéphale	61
4.8	Expression du marqueur de neurone dopaminergique, le transporteur de la dopamine, dans le striatum	62
4.9	Coloration au bleu cuprolinique.....	63
4.10	Coupe de 20 microns du duodénum de l'intestin grêle.....	63
4.11	Coupe de 50 microns du duodénum de l'intestin grêle.....	64
4.12	Expression du marqueur neuronal NeuN dans les intestins non spécifiques.	65
4.13	Expression du marqueur de neurone dopaminergique, la tyrosine hydroxylase, dans les intestins non spécifiques.....	66

Tableau**Page**

1.1	Principaux neurotransmetteurs et substances neurohormonales retrouvés dans le SNE.....	34
-----	--	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

3-MT	3-méthoxytyramine
5-HT	Sérotonine
Ach	Acétylcholine
AGE	<i>Advanced glycated end product</i>
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CAT	Catalase
CB	Bleu cuprolinique
ChAT	Choline acétyltransférase
COMT	Catécholamine- <i>O</i> -méthyltransférase
DA	Dopamine
DAergique	Dopaminergique
DAT	Transporteurs de la dopamine
DOPAC	Acide dihydroxyphénylacétique
GLUT	Transporteur du glucose
GPx	Glutathion peroxydase
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HG	<i>Hyperglycaemia</i> (hyperglycémique)
HG high	<i>Hyperglycaemia high</i> (hyperglycémique élevée)
HG low	<i>Hyperglycaemia low</i> (hyperglycémique faible)
HG med	<i>Hyperglycaemia medium</i> (hyperglycémique moyenne)
HO [•]	Radical hydroxyl
HVA	Acide homovanillique

I κ B α	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor α</i>
IKK α/β	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit α/β</i>
IRM	Imagerie à résonance magnétique
L-Dopa	Lévodopa
MAO	Monoamine oxydase
MP	Maladie de Parkinson
MPTP	1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
NF- κ B	<i>nuclear factor-kappa B</i>
NF-L	Chaîne légère du polypeptide neurofilament
NGF	Facteur de croissance neuronale
NO	Oxyde nitrique
NO ²⁻	Nitrite
NO ³⁻	Nitrate
NOS	Synthase de l'oxyde nitrique
O ₂ ⁻	Anion superoxyde
ONOO ⁻	Peroxynitrite
PARP-1	Polymérase poly (ADP-ribose)
RNS	Espèces réactives de l'azote
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SCP	Stimulation cérébrale profonde
SNC	Système nerveux central
SNE	Système nerveux entérique
SNP	Système nerveux périphérique
SNpc	Substance noire <i>pars compacta</i>
SOD	Superoxyde dismutase

SQ•	Semi-quinone
TH	Tyrosine hydroxylase
VIP	Peptide vasoactif intestinal
VMAT	Transporteurs vésiculaires des monoamines
VTA	Aire tegmentale ventrale

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 La Dopamine

La dopamine (DA) est un neurotransmetteur faisant partie de la famille des catécholamines, tout comme l'adrénaline ainsi que la noradrénaline (Carlsson *et al.* 1958). Au niveau du système nerveux central (SNC), la DA est libérée par plusieurs systèmes neuronaux de type dopaminergique (DAergique). Au niveau du système nerveux périphérique (SNP), la DA peut être libérée par différents groupes cellulaires, par exemple les cellules de la médullaire de la glande surrénale. La DA est aussi présente dans le système nerveux entérique (SNE), celui qui contrôle la motilité et les sécrétions digestives.

1.1.1 Le Métabolisme de la dopamine

La DA est synthétisée à partir de la tyrosine, un acide aminé acquis soit par l'alimentation, soit par l'hydroxylation de la L-phénylalanine par l'enzyme phénylalanine hydroxylase. La tyrosine est ensuite transformée en Dopa par l'enzyme tyrosine hydroxylase (TH) et la Dopa est immédiatement transformée en DA par la Dopa-décarboxylase (Figure 1.1) (Marieb *et al.* 2010).

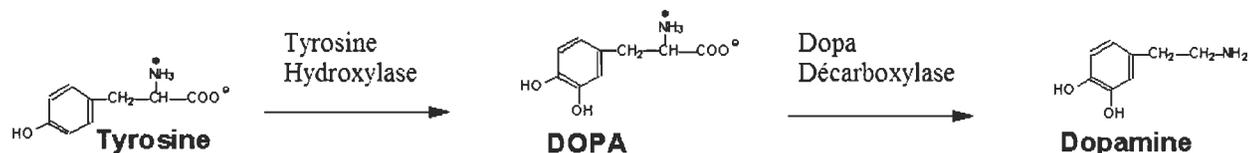


Figure 1.1 Synthèse de la dopamine. (Adaptée de pharmacorama.com.)

Il est à noter que l'activité de la TH est considérée comme étant l'étape limitante dans cette réaction, c'est-à-dire qu'un apport plus important en tyrosine n'augmenterait pas la production de Dopa. La DA ainsi produite peut, par la suite, être transformée en adrénaline et en noradrénaline selon les besoins de la cellule ou être internalisée vers des vésicules de stockage (Bear, Connors, and Paradiso 2016) à l'aide des transporteurs vésiculaires des monoamines (VMAT).

Lors d'un potentiel d'action, ces vésicules vont fusionner avec la membrane des boutons pré-synaptiques afin de larguer la DA dans la fente synaptique pour aller se lier à des récepteurs spécifiques post- et pré-synaptiques. Une fois que la DA s'est liée sur ces différents récepteurs, elle peut soit, via les transporteurs de la dopamine (DAT), être internalisée vers le neurone pré-synaptique pour y être recyclée, soit être dégradée en divers métabolites (Figure 1.2) (Sotnikova *et al.* 2006).

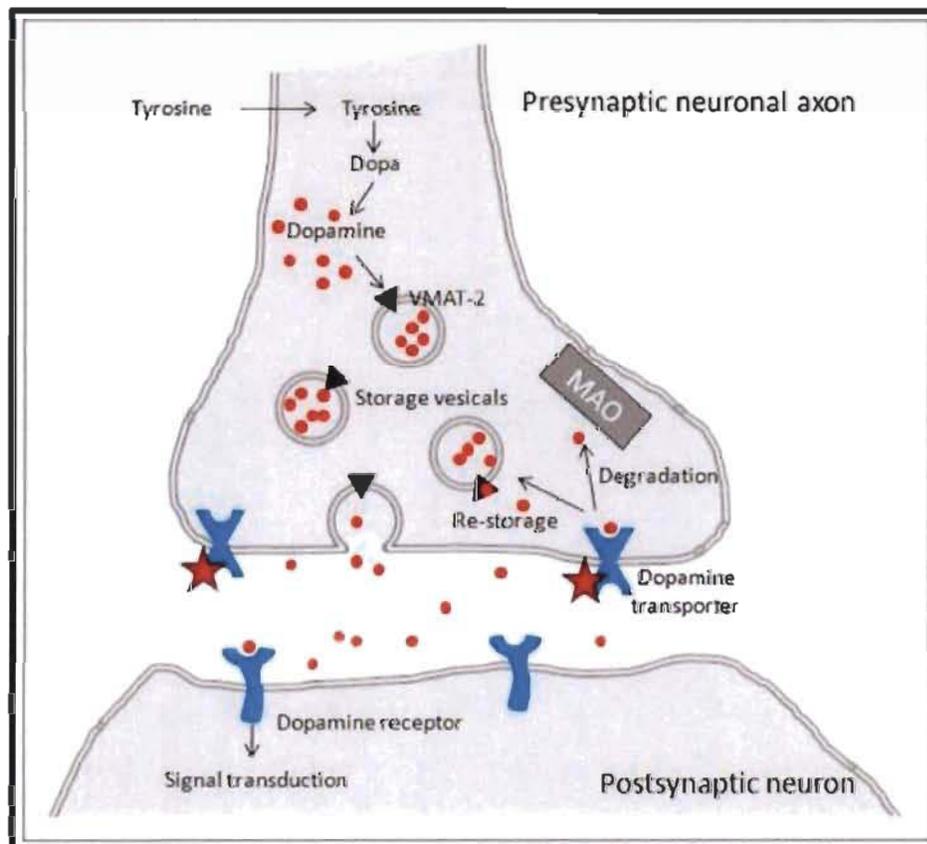


Figure 1.2 Neurotransmission dopaminergique (Djang *et al.* 2012).

La DA peut être métabolisée dans la fente synaptique, entre autres par la monoamine oxydase (MAO) extra-synaptique ou par la catécholamine-*O*-méthyltransférase (COMT). Les produits de dégradation ainsi formés sont le 3-méthoxytyramine (3-MT) ainsi que l'acide homovanillique (HVA). Lors de sa recapture, la DA peut aussi être métabolisée par une MAO, mais intra-neuronale cette fois. Le produit de dégradation obtenu sera l'acide dihydroxyphénylacétique (DOPAC) (Figure 1.3) (Youdim, Edmondson, et Tipton 2006).

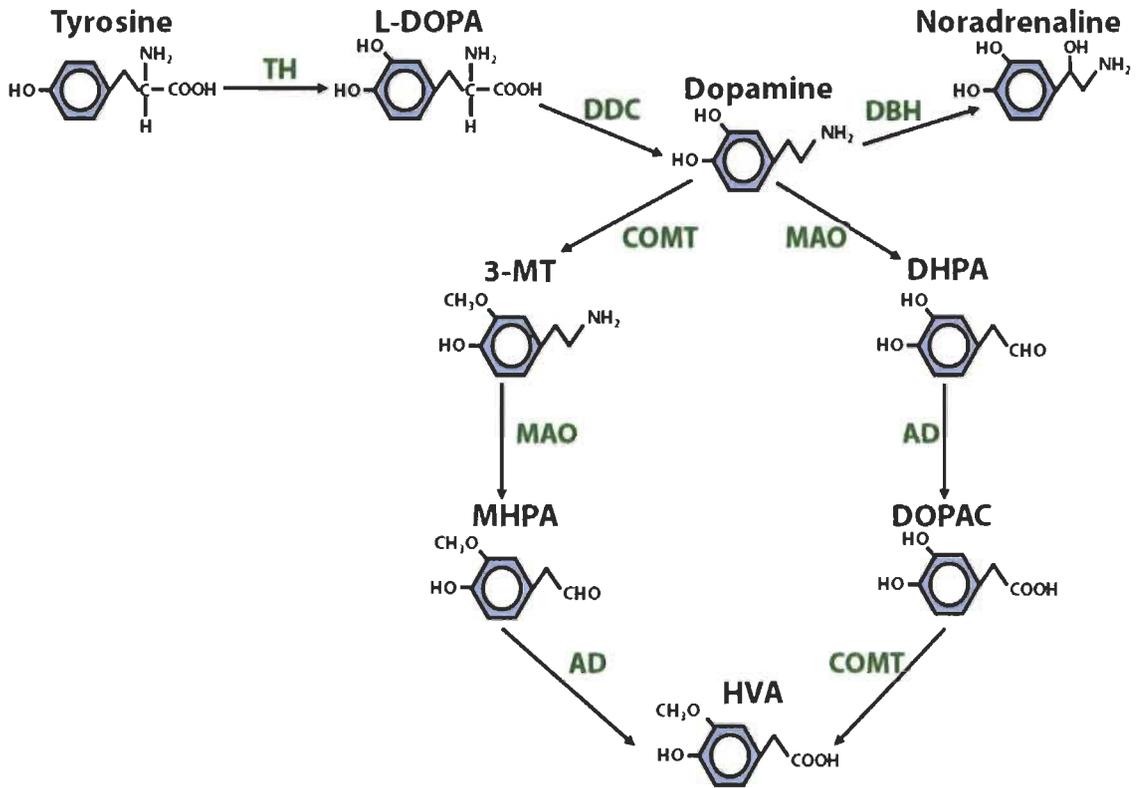


Figure 1.3 Dégradation de la dopamine par les enzymes de dégradation et produits de dégradation (Laatikainen *et al.* 2013).

1.1.2 Les Voies dopaminergiques

Dans le SNC, il existe plusieurs circuits cérébraux qui utilisent le neurotransmetteur DA afin de communiquer l'information nerveuse, mais il sera ici question des trois principaux, c'est-à-dire la voie mésocorticale, la voie mésolimbique et la voie nigro-striée.

Les voies mésocorticale et mésolimbique prennent origine dans l'aire tegmentale ventrale (VTA) située dans le mésencéphale. Ces deux voies se prolongent respectivement jusqu'au cortex préfrontal et au système limbique regroupant le noyau accumbens, le septum, l'amygdale et le tubercule olfactif. La voie mésocorticale est principalement responsable du traitement cognitif de l'information tandis que la voie mésolimbique est responsable des comportements émotionnels. Elle est impliquée dans la mémoire ainsi que la motivation et est associée au système de la récompense. Un dysfonctionnement de la voie mésocorticale pourrait être à l'origine de la schizophrénie, tandis qu'un dysfonctionnement de la voie mésolimbique serait associé à des troubles tels la psychose, l'hyperactivité et des déficits d'attention (Rolland 2012).

La voie nigro-striée prend aussi origine dans le mésencéphale, mais dans sa partie compacte appelée substance noire *pars compacta* (SNpc). Les neurones de cette voie projettent vers le striatum dorsal qui est constitué du noyau caudé et du putamen. La voie nigro-striée est responsable de l'initiation et du contrôle des mouvements volontaires et le dysfonctionnement de cette voie mène à la maladie de Parkinson (MP) (Figure 1.4) (Marieb *et al.* 2010; Purves *et al.* 2008).

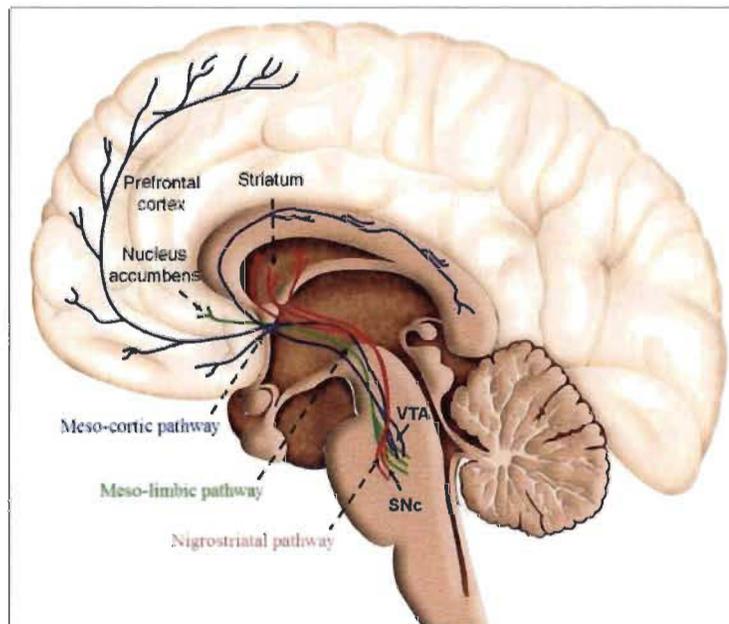


Figure 1.4 Représentation des voies dopaminergiques dans le cerveau (Adaptée de Arias-Carrion *et al.* 2014).

1.2 La Maladie de Parkinson

La MP est caractérisée par une perte de neurones DAergiques de la SNpc et donc par une atteinte importante de la voie nigro-striée. Selon Société Parkinson Canada, on estime à plus de 100 000 le nombre de Canadiens étant atteints de la MP et à plus de 446,8 millions de dollars par année les dépenses totales associées à cette maladie. En outre, 85 % des patients sont âgés de 65 ans et plus, et ces statistiques grimperont encore dans les prochaines années dû à l'augmentation de l'espérance de vie (Canada 2014). Il est donc impératif de développer des traitements pour contrer, sinon prévenir cette maladie grave et pour le moment incurable.

1.2.1 Un peu d'histoire...

Les premiers écrits retrouvés racontant les manifestations physiques de la MP ne datent pas d'hier. En effet, l'*Ayurveda*, document médical appartenant à la civilisation indienne antique, décrit une maladie, la *Kampavata*, dont les symptômes, entre autres les tremblements, rappellent ceux de la MP (Manyam 1990). Cette maladie était traitée avec une plante appelée *Mucuna pruriens*, connue aujourd'hui en tant que source de lévodopa (L-Dopa) (Katzenschlager *et al.* 2004).

Il faudra attendre jusqu'en 1817 pour que le Dr James Parkinson publie une étude intitulée « An Essay on the Shaking Palsy » (Parkinson 1817) où il fut le premier à décrire les symptômes de tremblement et d'akinésie (lenteur et réduction d'amplitude des mouvements) ainsi que l'évolution de la maladie, observée chez six personnes atteintes de la MP (Parkinson 1817; Goetz 2011). En 1862, le Dr Charcot poursuivit les études menées par Parkinson et ajouta la rigidité musculaire au tableau clinique des symptômes moteurs. Ces derniers comprennent : 1) le tremblement des membres au repos, 2) l'akinésie, et 3) la rigidité musculaire, composant ainsi ce que l'on appelle la « triade clinique », qui est encore l'outil de diagnostic principal pour le clinicien aujourd'hui. Enfin, Charcot proposa de nommer cette maladie « la maladie de Parkinson » en l'honneur de son prédécesseur.

En 1882, à Paris, le Dr Benjamin Ball caractérisa les premiers symptômes non-moteurs tels que la dépression et les hallucinations. Par la suite, en 1894, le Dr Édouard Brissaud poursuivit les études sur les troubles psychiques et rapporta le trouble de l'apathie (Broussolle *et al.* 2016). Il fut, plus tard, le premier à montrer qu'une dégénérescence des neurones dans la SNpc était responsable des symptômes de la MP (Brissaud 1895).

En 1958, la découverte de la DA par le Dr Arvid Carlsson relance les études sur la MP et permettra au Dr Barbeau, en 1960, de mettre en évidence l'implication de cette molécule dans la maladie. C'est en fait, la disparition de cette dernière dans le striatum qui cause les symptômes moteurs de la triade clinique (Barbeau 1960).

En 1979, le premier cas de MP toxique est décrit. Il est causé par la neurotoxine 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) retrouvée dans l'héroïne consommée en Californie (Davis *et al.* 1979). Cette toxine agit en inhibant le complexe I de la chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie et en causant un stress oxydant, ce qui a pour conséquence la destruction des cellules neuronales DAergiques de la SNpc. La neurotoxine MPTP est aujourd'hui très utilisée en recherche afin de générer un modèle murin de la MP (Schildknecht *et al.* 2017).

En 1991, l'acteur canadien Michael J. Fox, connu pour avoir joué le rôle de Marty McFly dans « Retour vers le Futur » (1985), apprend qu'il est atteint de la MP. Il fonde, en 2000, la fondation Michael J. Fox pour la recherche sur la MP qui est aujourd'hui mondialement reconnue. La fondation a, depuis sa création, investi plus de 600 millions de dollars en recherche et développement, dans le seul et unique but de trouver un remède contre la MP ("Parkinson's Disease The Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research").

Depuis la première étude sur la MP, parue en 1817 et menée par le Dr Parkinson, nos connaissances sur cette maladie ne cessent d'évoluer. Les nouvelles technologies nous aident à comprendre les mécanismes sous-jacents par lesquels la maladie se développe.

Les fondations, telles que la fondation Michael J. Fox, subventionnent plusieurs études, chaque année, en versant des fonds de plusieurs millions de dollars et nous aident à trouver un remède contre la MP.

1.2.2 Les Symptômes moteurs

La MP est une maladie dégénérative touchant les neurones DAergiques de la voie nigro-striée du cerveau (McGill 2016; Jomova *et al.* 2010). La voie nigro-striée relie deux régions distinctes que sont la SNpc, qui se situe dans le mésencéphale, et le striatum, se situant dans le diencephale, qui est responsable du contrôle des mouvements volontaires (Figure 1.4) (Jomova *et al.* 2010). Cette dernière région est composée de deux noyaux, le noyau caudé et le putamen. Les neurones DAergiques de la voie nigro-striée envoient des prolongements vers le striatum. Ce sont justement ces neurones de la SNpc qui dégénèrent dans la MP, ayant pour conséquence la diminution des niveaux de DA dans le striatum, causant les symptômes de la maladie tels que nous les connaissons.

La figure 1.5 présente la perte des neurones DAergiques de la SNpc chez un patient parkinsonien comparativement à la SNpc d'une personne saine. La SNpc, comme son nom l'indique, est brune-noire, et donc facile à reconnaître dans le mésencéphale. Il est aisé de constater la différence de pigmentation entre le patient parkinsonien et le patient sain. En fait, les symptômes moteurs de la maladie apparaissent lorsqu'il y a perte de 50 % à 80 % des neurones de la SNpc et diminution 80 % de la DA relâchée dans le striatum (Dauer and Przedborski 2003). Cela signifie que, lorsque le diagnostic de la maladie se pose, il y a plus de la moitié des neurones de la SNpc qui ont déjà disparu.

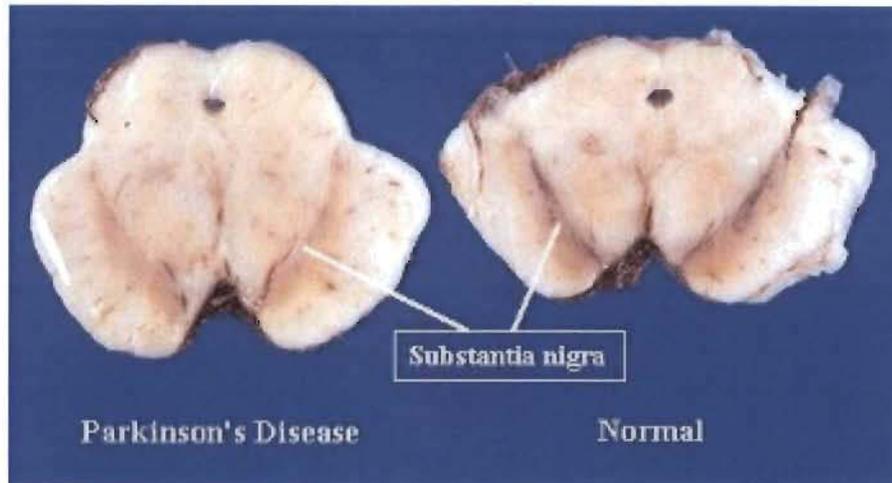


Figure 1.5 Comparaison entre le mésencéphale d'un patient sain et un patient atteint de la Maladie de Parkinson. (Tirée de CNS Pathology.)

La MP est aussi caractérisée par la présence de corps de Lewy (Figure 1.6), qui sont formés d'agrégats de protéines insolubles mal repliées dont, entre autres, la protéine α -synucléine (Bussell and Eliezer 2001). La production de la protéine α -synucléine, dans une mauvaise conformation, peut être le résultat d'une anomalie génétique. En effet, plusieurs gènes ont été identifiés comme facteurs de risque de la MP où ils seront discutés plus en détail dans la sous-section 1.2.6. Ces agrégats d' α -synucléine mal repliée peuvent aussi survenir sans que la cause ne soit génétique. Dans ces cas-là, l'hypothèse la plus plausible est que le stress oxydant entraîne des dommages aux cellules et à leur contenu, ce qui provoquerait la formation de protéines mal repliées tel qu'observées dans les corps de Lewy.

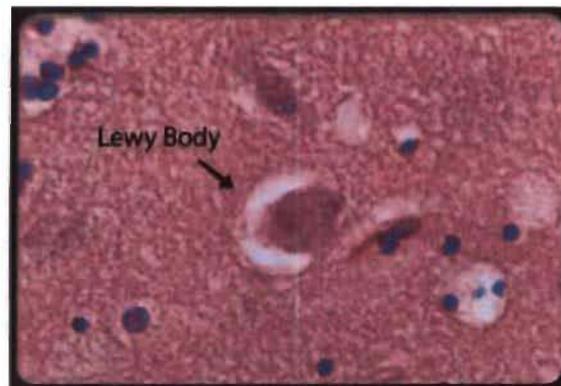


Figure 1.6 Représentation d'un corps de Lewy. (Tirée de Emedicine.com, 2009.)

Pour poser un diagnostic, le médecin ne peut se baser que sur les symptômes cliniques que présente son patient, c'est-à-dire que, comme le déficit des neurones DAergiques de la SNpc ne peut être évalué qu'après la mort du patient, le praticien doit se baser sur les symptômes cliniques. La confirmation du diagnostic ne se fait qu'au décès du patient, lorsque l'on pratique l'autopsie et que l'on constate la perte des neurones de la SNpc, tel que présenté sur la figure 1.5.

Le diagnostic repose sur l'observation des symptômes de la triade clinique. Les symptômes moteurs qui composent la triade clinique sont la rigidité musculaire, l'akinésie et le tremblement des membres au repos (Pollak 2004), tel que mentionné dans la sous-section 1.2.1. Pour être diagnostiqué comme étant parkinsonien, le patient doit présenter au moins deux des trois symptômes de la triade.

Dans 50 à 70 % des cas de MP, les symptômes débutent par des tremblements au repos qui apparaissent souvent au niveau des membres supérieurs, de façon unilatérale et qui disparaissent lors du mouvement volontaire (Pollak 2004). Bien que la maladie commence souvent de cette façon, ce symptôme n'est pas toujours présent chez les patients parkinsoniens. Un autre symptôme de la triade, l'akinésie, s'exprime par une lenteur à initier le mouvement ainsi qu'à l'arrêter, ce que l'on appelle aussi bradykinésie (Pollak 2004). Le dernier symptôme de la triade est celui de la rigidité musculaire (Pollak 2004). Cette rigidité est bien exprimée sur la figure 1.7, montrant le positionnement typique d'un patient parkinsonien. Ce patient a le dos vouté et avance en faisant de petits pas qu'il traîne à cause de la rigidité de ses muscles et de sa lenteur à produire un mouvement.



Figure 1.7 Représentation de la posture typique d'un patient parkinsonien (Gowers 1893).

1.2.3 Les Symptômes non-moteurs

Bien que le médecin se base sur les symptômes moteurs de la triade pour poser son diagnostic, il existe une panoplie de symptômes non-moteurs associés à la MP. Ces symptômes peuvent se présenter à divers niveaux d'intensité, dépendant du patient. Prises ensemble, les manifestations motrices et non-motrices de la MP deviennent un vrai handicap pour les personnes atteintes.

Dans la liste des manifestations non-motrices de la MP, il y a tout d'abord les troubles psychologiques, comme la dépression et l'anxiété, qui sont présents dans 40 % des cas de MP. La démence peut aussi se présenter chez des patients à un stade avancé de la maladie (Emre *et al.* 2004; Richard, Kurlan, and Group 1997). On note également des troubles d'hypotension dans 60 % des cas, qui seraient causés, entre autres, par des anomalies des fibres sympathiques post-ganglionnaires qui innervent la musculature vasculaire (Senard *et al.* 1997; Senard 1998). De plus, la baisse de la libido est directement corrélée avec l'aggravation des symptômes de la MP (Brown *et al.* 1990; Singer *et al.* 1991). Les troubles respiratoires sont aussi présents. Il peut s'agir de difficultés à respirer

à l'effort ou de l'augmentation des infections bronchiques. La plupart du temps, ces troubles sont variables et les causes sont méconnues. Pourtant, ils sont liés à une grande part des décès chez les parkinsoniens (Elbaz *et al.* 2003; De Rijk *et al.* 2000).

Par contre, certains symptômes sont présents dès le début de la maladie, et même, parfois, avant l'apparition des premiers symptômes moteurs. Par exemple, les troubles sensitifs sont présents dans 50 % des cas et, plus particulièrement, les troubles olfactifs se manifestent chez plus de 90 % des patients parkinsoniens (Waseem and Gwinn-Hardy 2001; Müller *et al.* 2002). Les troubles du sommeil sont aussi fréquents, jusqu'à dans 65 % des cas (Edwards *et al.* 1991). Les troubles du système digestif, comme la constipation, sont présents chez 50 à 70 % des patients parkinsoniens (Edwards *et al.* 1991; Edwards, Quigley, and Pfeiffer 1992). La constipation serait principalement causée par la réduction de l'activité physique. Par contre, la présence d'inclusions histopathologiques caractéristiques du cerveau des patients parkinsoniens a été démontrée dans le SNE (Edwards *et al.* 1991; Edwards, Quigley, and Pfeiffer 1992; Barrenschee *et al.* 2017; Mittal *et al.* 2017).

1.2.4 Quelques traitements de la Maladie de Parkinson

Il existe à ce jour plusieurs traitements pour soulager les symptômes de la MP, sans toutefois les enrayer totalement. Comme la cause des symptômes moteurs est la diminution importante de DA dans le striatum, certains traitements agissent en augmentant les niveaux de DA au cerveau, soit en augmentant la production du neurotransmetteur, soit en diminuant son catabolisme. Le traitement envisagé diffère selon le stade de la maladie. Dans ce mémoire, seulement les principales classes de traitements seront abordées.

1.2.4.1 La L-Dopa

Le premier médicament à révolutionner le paysage thérapeutique la MP fut la L-Dopa. Administré pour la première fois en 1961, il reste jusqu'à maintenant le médicament le plus fréquemment utilisé. Ce précurseur de la DA est absorbé essentiellement dans le duodénum et passe la barrière hémato-encéphalique (BHE) selon un mécanisme de transport compétitif avec les acides aminés neutres. La L-Dopa est ensuite captée à l'extrémité des neurones DAergiques nigro-striés où elle est décarboxylée en DA pour être intégrée dans les vésicules synaptiques. Une fois libérée dans la fente synaptique, la DA se fixe sur les récepteurs dopaminergiques D1 ou D2. L'administration de la L-Dopa, ou Dopa-thérapie, augmente le tonus DAergique striatal et améliore la triade symptomatique parkinsonienne (akinésie, rigidité et tremblements). Cependant, après quelques années de traitements, le patient fait face à des effets secondaires tels que des mouvements involontaires (dyskinésies), une somnolence, des troubles digestifs, des troubles cardiovasculaires, des troubles psychiques ainsi que des fluctuations dans la réponse au traitement à la L-Dopa, ce que l'on appelle périodes « on-off » (Nutt 2008).

La L-Dopa est utilisée en combinaison avec un autre médicament qui est la carbidopa, cela afin d'empêcher la dégradation de la L-Dopa avant qu'elle ne franchisse la BHE. L'ajout de la carbidopa permet l'utilisation de faibles doses de la L-Dopa, ce qui réduit le risque d'effets secondaires tels que les nausées et les vomissements (Oertel and Quinn 1997; Castro *et al.* 2005).



Figure 1.8 Représentation de la formation de la lévodopa et de son passage à travers la barrière hémato-encéphalique.

1.2.4.2 Les Inhibiteurs enzymatiques (MAO-B et COMT)

Les enzymes MAO et COMT dégradent la DA dans la fente synaptique, comme illustré aux figures 1.2 et 1.3. En inhibant ces enzymes, on peut augmenter les niveaux de DA. Les inhibiteurs des MAO-B (un isoforme de la MAO), comme la séléginine, permettent de réduire de 10 % à 15 % les doses de L-Dopa (Olanow *et al.* 1995). Les inhibiteurs de l'enzyme COMT, comme l'entacapone, agissent en périphérie en augmentant la biodisponibilité de la L-Dopa et en augmentant de 30 % son passage à travers la BHE vers le cerveau (Kaakkola 2000).

1.2.4.3 Les Agonistes dopaminergiques

Les agonistes DAergiques sont des molécules pharmacologiques qui miment les effets de la DA sur les récepteurs post-synaptiques du striatum, augmentant ainsi la réponse dopaminergique. Leurs avantages par rapport à la Dopa-thérapie sont qu'ils ne requièrent pas de transporteur pour leur absorption ou pour le passage à travers la BHE, et ils agissent directement sur leur cible, le récepteur DAergique. De plus, leur temps de demi-vie est plus long que celui de la L-Dopa (Gille, Rausch, Hung, Moldzio, Janetzky *et al.* 2002; Gille, Rausch, Hung, Moldzio, Ngyuen *et al.* 2002). Cependant, ils agissent plus lentement et moins efficacement que la Dopa-thérapie. Les effets secondaires engendrés par les agonistes DAergiques peuvent comprendre la somnolence, les hallucinations, l'enflure des jambes ainsi que des comportements obsessifs à l'égard de la nourriture, de la sexualité, de la consommation, du jeu et d'internet (Société de Parkinson 2014; Defebvre 2011; Singh 2007).

1.2.4.4 Les Traitements chirurgicaux

La chirurgie par lésions ou par stimulation cérébrale profonde (SCP), à des fins de diminution des symptômes de la MP, est pratiquée depuis plusieurs dizaines d'années. Au début des années 1990, avec l'avènement de nouvelles technologies, comme la stimulation à hautes fréquences, la neurochirurgie a connu un nouvel essor avec pour principe général le blocage de l'une des structures du circuit nigro-strio-pallido-thalamique, dont

l'hyperactivité se trouve être responsable des symptômes de la MP. En effet, ce sont le pallidum interne, le noyau ventral intermédiaire du thalamus et le noyau sous thalamique qui sont le plus souvent visés par cette pratique. L'opération consiste à implanter deux électrodes dans une région cérébrale précise (Figure 1.9), généralement au niveau du noyau sous-thalamique. Ces régions d'implantation sont déterminées grâce à une imagerie par résonance magnétique (IRM) préopératoire. Les électrodes sont ensuite reliées à un neuro-stimulateur. Ce dernier est implanté sous la peau au niveau de la région sous-claviculaire ou abdominale. Le neuro-stimulateur générera par la suite de faibles impulsions électriques. La SCP permet l'obtention des mêmes résultats que la L-Dopa, avec des effets secondaires en moins. L'inconvénient est que c'est une chirurgie coûteuse et lourde qui comporte des risques principalement d'hémorragie ou d'infection, ainsi que des complications neurologiques. C'est pourquoi les candidats à la chirurgie doivent répondre à des critères précis (Defebvre 2011; Chen 2013; Chen *et al.* 2013).

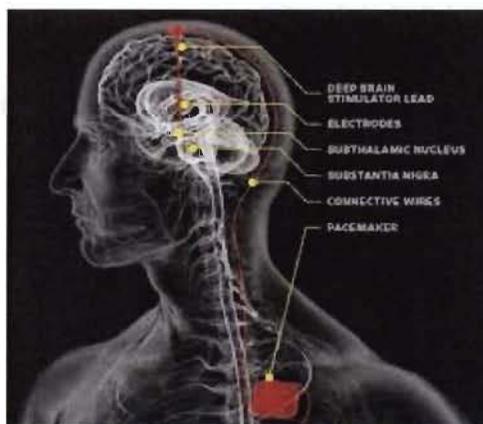


Figure 1.9 Représentation de la stimulation cérébrale profonde. (Tirée de <http://www.psychomedia.qc.ca/neuropsychologie/2008-03-03/le-neurodon-2008-met-l-accent-sur-la-stimulation-cerebrale-profonde-parkinson>.)

Les mécanismes cellulaires sous-jacents à cette technique sont encore méconnus, mais il pourrait s'agir du blocage de la dépolarisation cellulaire ou des canaux ioniques, de la libération de neurotransmetteurs ou encore le blocage d'activités électriques anormales. L'hypothèse actuelle, concernant le mécanisme d'action de la SCP, porte sur l'inhibition des messages aberrants afin de les remplacer par un message régulier, mais

dépourvu de signification, un signal neutre. Il faut aussi savoir que la SCP n'arrête pas l'évolution de la maladie et le patient doit continuer de suivre sa médication (Defebvre et Vérin 2011; Zagnoli et Rouhart 2006).

1.2.5 Les Avancées : un petit mot sur la thérapie cellulaire

Contrairement à la thérapie médicamenteuse, qui ne fait que retarder l'apparition des symptômes, la thérapie cellulaire a la possibilité de les enrayer pour de bon en régénérant les cellules DAergiques perdues. En effet, cette technique vise à instaurer de nouvelles cellules DAergiques saines au cerveau. Les neurones DAergiques qui seront greffés peuvent provenir du patient lui-même (transplant autologue), d'un individu de la même espèce (transplant hétérologue) ou même d'un individu d'une espèce différente. De même, les cellules peuvent provenir d'un individu adulte ou d'un embryon. Aussi, les cellules peuvent être utilisées sans modification ou après une sélection poussée, avec des modifications génétiques ou épigénétiques (Wijeyekoon et Barker 2009).

Il y a certainement beaucoup de paramètres à contrôler dans le cadre de la thérapie cellulaire et elle présente beaucoup de risques, entre autres, la possibilité de rejeter la greffe si les cellules proviennent d'un autre individu. Par contre, c'est la première thérapie à offrir la possibilité d'une guérison complète et non pas le soulagement des symptômes uniquement. Des études récentes démontrent que les neurones DAergiques implantés peuvent réinnervier le striatum, restaurer les niveaux de DA et améliorer significativement les symptômes caractéristiques de la MP (Lindvall et Björklund 2004). Évidemment, cette avenue est encore en développement, mais la suite s'annonce très prometteuse...

1.2.6 Les Causes de la Maladie de Parkinson : diverses possibilités

Les causes de la MP sont encore méconnues, mais plusieurs possibilités ont été discutées dans le domaine scientifique depuis plusieurs dizaines d'années. Les causes peuvent être génétiques ou idiopathiques. Seulement 5 à 10 % des cas de MP sont

génétiques (Dauer et Przedborski 2003) alors que plus de 90 % sont idiopathiques, c'est-à-dire que la cause est inconnue.

1.2.6.1 Les Formes génétiques

Il y a aujourd'hui, plusieurs gènes qui ont été identifiés comme étant impliqués dans des formes rares monogéniques de la MP. Il y a, entre autres, les gènes codant pour α -synucléine, parkine et PINK1, pour ne nommer que ceux-ci.

Ce serait une mutation en position 53 sur le gène *PARK1* qui causerait un mauvais repliement dans la protéine de l' α -synucléine. En effet, c'est précisément cette protéine qui tend à s'accumuler de façon anormale dans la MP, formant ce que l'on appelle les corps de Lewy (Figure 1.6) présents dans le mésencéphale, caractéristiques neuropathologiques de cette maladie (Spillantini *et al.* 1998). De plus, cette protéine serait responsable de réguler le nombre de vésicules disponible pour le stockage de la DA (Lotharius et Brundin 2002). Une mauvaise fonctionnalité de l' α -synucléine ferait en sorte qu'il y ait plus de DA cytosolique non empaquetée dans des vésicules, ce qui, par conséquent, causerait une augmentation du stress oxydant du neurone (Tabrizi *et al.* 2000; Orth et Tabrizi 2003), tel qu'expliqué à la sous-section 1.2.2.

La principale fonction de la protéine parkine est d'éliminer les protéines défectueuses dans la cellule via le système ubiquitine-protéasome. Il a été démontré récemment que parkine fonctionne comme une ubiquitine ligase E3, un composant du système ubiquitine-protéasome qui identifie et cible les protéines mal repliées au protéasome pour dégradation (Qiu *et al.* 2017). Une mutation dans le gène codant pour la parkine entraînerait une dysfonction de celle-ci, ce qui provoquerait l'accumulation de protéines défectueuses dans le cytosol de la cellule. Cela contribuerait à augmenter les niveaux de stress oxydant dans le neurone.

Quant à PINK1, c'est une protéine qui contient 581 acides aminés et est constituée d'un motif de ciblage mitochondrial N-terminal, un domaine transmembranaire, un

domaine kinase Ser/Thr et un domaine C-terminal autorégulateur. La mutation de PINK1 cause une forme précoce et familiale de la MP, appelée « maladie de Parkinson de type 6 » ou PARK6. Dans les mitochondries, PINK1 est exprimée dans l'espace intermembranaire mitochondrial, soit entre les membranes mitochondriales internes et externes. PINK1 maintient les fonctions mitochondriales normales dans les neurones DAergiques de la SNpc, et exerce un effet neuroprotecteur. Une mutation de PINK1 cause donc une altération des mitochondries chez les neurones DAergiques et la perte de l'effet neuroprotecteur, ce qui conduit ensuite à la neurotoxicité des neurones (Narendra, Walker, et Youle 2012; Kazlauskaitė et Muqit 2015).

Les personnes atteintes par une forme génétique de la MP sont généralement diagnostiquées parkinsoniennes avant l'âge de 30 ans (Mizuno *et al.* 2001). C'est d'ailleurs ce qui caractérise la cause génétique par rapport à l'idiopathique : les patients ayant une forme génétique de la MP reçoivent un diagnostic plus jeune que les patients ayant développé la MP de causes idiopathiques (Shimura *et al.* 2000; Kitada *et al.* 1998).

1.2.6.2 Les Formes idiopathiques

L'étiologie de la MP idiopathique demeure inconnue à ce jour. Cependant, des facteurs environnementaux ont été suggérés parmi les hypothèses étiologiques.

Le facteur environnemental a été très étudié depuis la découverte en 1983 d'un syndrome parkinsonien chez les toxicomanes. En effet, plusieurs personnes ont développé des signes typiques de la MP à la suite d'injection intraveineuse accidentelle d'un dérivé de l'héroïne, le MPTP (Langston *et al.* 1983). Cette toxine s'attaque à la chaîne de transport des électrons de la mitochondrie, causant un important stress oxydant fatal pour le neurone DAergique. (Nakai *et al.* 2003). De fait, la composition chimique de certains herbicides et pesticides, comme le paraquat (Figure 1.10), ressemble à celle du MPTP (Ramsay *et al.* 1989). De plus, le métabolite actif du MPTP a été utilisé comme herbicide pendant quelques années à la fin des années 1960. Par conséquent, des substances utilisées

comme pesticides, herbicides et insecticides évoquées comme substances neurotoxiques « MPTP-like » pourraient être impliquées dans le développement de la MP. Certains pesticides auraient une action neurotoxique directe, soit en perturbant le transport de la DA, soit en provoquant une faiblesse dans la chaîne respiratoire mitochondriale, soit encore en entraînant des perturbations enzymatiques plus diffuses par un stress oxydant (Cacabelos 2017; Caudle 2015). Quelques études ont essayé de démontrer une prévalence accrue dans des lieux où les gens sont exposés à de telles toxines. Bien que certaines études soient contradictoires, il semble, en général, que la prévalence de la maladie augmente dans des zones où l'on utilise beaucoup de produits chimiques et de pesticides, ainsi que dans les zones rurales où l'on utilise beaucoup d'insecticides (Priyadarshi *et al.* 2000, Tanner 1989).

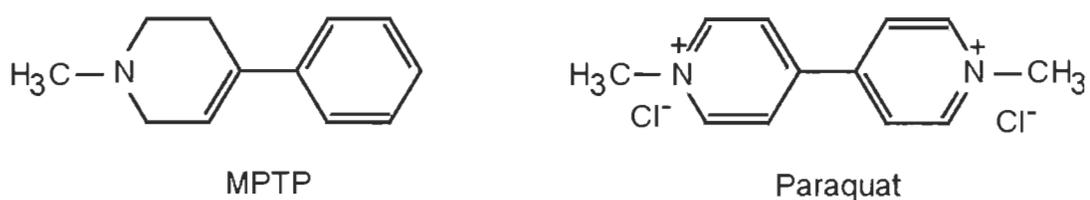


Figure 1.10 Comparaison de la molécule de 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine avec celle du pesticide paraquat (Baldi *et al.* 2013).

Une autre hypothèse très soutenue par la littérature scientifique dans les dernières décennies implique le rôle du stress oxydant et celui du dysfonctionnement mitochondrial dans la perte des neurones de la SNpc (Jenner 1991, Surmeier *et al.* 2017). Je discuterai plus en détail du rôle du stress oxydant dans la neurodégénérescence à la section 1.3.

Il est important de souligner que ces deux hypothèses, celle des facteurs environnementaux et celle du stress oxydant, ne sont pas mutuellement exclusives, et il est possible d'envisager un scénario de mort neuronale DAergique qui prend en compte les deux hypothèses citées ci-haut.

Récemment, la recherche sur la MP a ajouté à l'hypothèse du stress oxydant, les effets néfastes du glucose. En effet, un surplus de glucose extracellulaire et intracellulaire engendrerait une augmentation du stress oxydant dans les neurones et provoquerait leur

destruction (Rojas-Gutierrez *et al.* 2017; Aragno et Mastrocola 2017). D'un point de vue clinique, quelques études ont déjà montré l'existence d'un lien entre les sous-produits du métabolisme du glucose et de la peroxydation des lipides et la neurodégénérescence (Di Domenico, Tramutola, et Butterfield 2016; Markowicz-Piasecka *et al.* 2017). Au niveau cellulaire, l'atteinte du complexe I de la chaîne de transport des électrons peut mener à une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et ainsi créer un déséquilibre entre les ROS et les antioxydants de la cellule. Ce déséquilibre favoriserait l'apparition d'un stress oxydant nocif pour le neurone. Les sujets du stress oxydant et de l'hyperglycémie seront discutés plus en détail dans les sections 1.3 et 1.4.

1.2.7 La Prévention

Une prévention efficace de la MP devrait d'abord passer par un diagnostic précoce. Or, les méthodes de diagnostic ne sont pas encore tout à fait au point concernant l'identification précise des patients à risque de développer la maladie. L'historique familial du patient peut être un bon indice, mais ne possède que très peu de spécificité. D'un point de vue plus concret, serait-il possible de prévenir les maladies neurodégénératives comme la MP en adoptant un mode de vie plus sain? Par exemple, pratiquer une activité physique ou adopter une alimentation équilibrée?

Certaines études ont démontré les bienfaits de l'activité physique sur la plasticité neuronale (Yau *et al.* 2014, Zigmund *et al.* 2009) et il est maintenant bien démontré qu'une alimentation riche en antioxydants aiderait à prévenir la perte neuronale caractéristique de plusieurs maladies neurodégénératives (Esposito *et al.* 2002; Löhle et Reichmann 2010).

Il faut noter que, paradoxalement, des recherches ont démontré qu'il y avait une relation inverse entre la consommation de tabac ou de café et la MP. Un effet neuroprotecteur du tabac a été suggéré et la plupart des explications probables impliquent la nicotine. Cette dernière peut stimuler la libération de DA, agir comme un antioxydant, ou modifier l'activité de la MAO-B (Quik 2004; De Lau et Breteler 2006). Effectivement, la nicotine pourrait agir en stimulant les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (ACh).

De nombreuses voies de signalisation sont modifiées en réponse à l'activation de ce récepteur, y compris les voies impliquées dans le contrôle de la libération de neurotransmetteurs incluant la dopamine. Chez les consommateurs de café, c'est la caféine qui semble porter un certain effet protecteur contre la MP. La caféine est un inhibiteur du récepteur d'adénosine A2. Les récepteurs de l'adénosine sont co-localisés autant qu'hétéromères avec les récepteurs DAergiques D2, inhibant les effets de la transmission DAergique. La caféine améliore les déficits moteurs en levant l'inhibition pré- et post-synaptique que l'adénosine impose sur la transmission synaptique (De Lau et Breteler 2006; Postuma *et al.* 2012; Ribeiro et Sebastiao 2010).

La prévention nutraceutique pourrait jouer un rôle important pour anticiper la maladie malgré l'impossibilité actuelle de diagnostiquer la MP à l'avance. Certaines substances seraient plus prometteuses que d'autres comme les polyphénols, aussi connus comme « phytoestrogènes », par exemple (Milner 1994; Mercer *et al.* 2005). Notre laboratoire s'intéresse particulièrement aux méthodes de prévention de la MP par les molécules végétales antioxydantes. Au cours des dernières années, le laboratoire a montré les capacités neuroprotectrices qu'ont certaines molécules, comme les phytoestrogènes tels le resvératrol, la quercétine, la sésamine, l'oleuropeine et la cucurbitacine E, sur des cellules neuronales en culture (Renaud et Martinoli 2011; Renaud *et al.* 2014; Bournival *et al.* 2012; Bournival, Quessy, et Martinoli 2009). Les résultats de ces études ont été traités en détail dans plusieurs mémoires et thèses provenant de notre laboratoire. Ici, il n'en sera question que d'un bref résumé.

L'estrogène, hormone sexuelle féminine, a la capacité de délocaliser les électrons de par son cœur phénolique, ce qui lui confère un grand pouvoir antioxydant. En effet, les études faites sur des neurones DAergiques du mésencéphale ont démontré que l'estrogène diminuait la quantité de radicaux libres des cellules (Sawada *et al.* 1998; Sawada et Shimohama 2000). Notre laboratoire a d'ailleurs déjà montré les effets neuroprotecteurs de l'estrogène sur les cellules PC12 en culture, prétraitées avec la toxine MPP⁺, la molécule active du MPTP (Gélinas et Martinoli 2002; Gélinas *et al.* 2004). Les cellules

PC12 sont des cellules de phéochromocytome différenciées en neurones DAergiques grâce au facteur de croissance neuronale (NGF) et seront présentées au chapitre III.

Les études cliniques au sujet des œstrogènes ont malheureusement frappé un mur inquiétant : l'augmentation des cancers hormono-dépendants. En effet, l'œstradiol administré après la ménopause augmente les chances de cancer du sein et de l'utérus. À ce sujet, les phytoœstrogènes seraient donc de bons candidats et sont actuellement étudiés afin de découvrir des molécules au potentiel neuroprotecteur n'ayant aucun effet délétère sur l'apparition de cancers, c'est-à-dire ne stimulant pas les récepteurs nucléaires aux œstrogènes.

Le resvératrol est un polyphénol provenant de la pelure du raisin rouge. Il a déjà été montré que le resvératrol possède des propriétés anti-cancérogènes, antioxydantes et, de plus, protège le système cardio vasculaire (Aluyen *et al.* 2012; Rosa *et al.* 2012). La quercétine est un composé flavonoïde. Elle protège contre le stress oxydant en modulant le signal intracellulaire et en activant les signaux de survie cellulaire (Mercer *et al.* 2005). Elle possède, comme le resvératrol, des propriétés anti-cancérogènes, antioxydantes et cardio-protectrices (Bournival, Quessy, et Martinoli 2009; Lee *et al.* 2008). La sésamine est retrouvée dans les graines de sésame ainsi que dans l'huile de sésame et est aussi reconnue pour ses effets antioxydants (Hemalatha et Raghunath 2004; Suja, Jayalekshmy, et Arumughan 2004) et ses propriétés hypo-cholestérolémiques et anti-hypertensives (Hirata *et al.* 1996; Lee *et al.* 2004). Ces trois molécules ont démontré avoir des effets neuroprotecteurs, antioxydants et anti-apoptotiques dans nos modèles de neurones DAergiques en culture (Bournival *et al.* 2012; Renaud *et al.* 2014). Les deux autres molécules, l'oleuropeine et la cucurbitacine E ont, de plus, montré pouvoir moduler l'autophagie cellulaire en plus du stress oxydatif et l'apoptose (Arel-Dubeau *et al.* 2014; Achour 2015).

Directement en lien avec mon projet de maîtrise, des résultats récents obtenus dans notre laboratoire indiquent que le resvératrol protège les neurones DAergiques contre le stress oxydant, induit par l'hyperglycémie, en diminuant les niveaux cellulaires de l'anion superoxyde (Renaud *et al.* 2014). De plus, le resvératrol diminue les niveaux d'interleukine-1 α et de *tumor necrosis factor α* , deux cytokines pro-inflammatoires, démontrant ainsi des propriétés anti-inflammatoires (Renaud et Martinoli 2011) sur des cellules microgliales cultivées en milieu hyperglycémique. De plus, d'autres résultats de notre laboratoire montrent que la quercétine et la sésamine augmentent, toutes deux, les niveaux de l'enzyme superoxyde dismutase (SOD), suggérant qu'elles possèdent des capacités antioxydantes (Bournival *et al.* 2012) sur des cellules PC12 en culture, dans un milieu hyperglycémique.

Ces résultats exposent le potentiel de phytoestrogènes contre la mort de neurones DAergiques induite par une hyperglycémie. Afin de pouvoir appuyer ces résultats *in vivo*, il est important d'établir et de caractériser un modèle animal hyperglycémique et d'y étudier la neurodégénérescence DAergique. Par la suite, il sera envisageable d'y vérifier les effets neuroprotecteurs de phytoestrogènes.

1.3 Le Stress oxydant

En 1956, le Dr Denham Harman exposa une théorie qui bouleversa la compréhension des mécanismes de vieillissement. Il devint, de ce fait, un pionnier dans ce domaine. Il s'agit de « la théorie radicalaire du vieillissement » selon laquelle le vieillissement serait provoqué par des dommages oxydatifs induits par des ROS au niveau moléculaire (Bonnefont-Rousselot 2007). Les ROS peuvent être produites par des agents physiques comme les rayonnements, et des réactions chimiques et enzymatiques. En effet, toute réaction impliquant l'oxygène et un système réducteur de transfert d'électrons est susceptible de libérer des ROS. La mitochondrie représente donc la principale source d'oxydant puisque la quasi-totalité de l'oxygène est consommée par la chaîne respiratoire mitochondriale. La dysfonction ou l'inhibition de celle-ci entraîne la formation de ROS qui produit des lésions cellulaires en réagissant avec les acides nucléiques, certains lipides

et certaines protéines (Defebvre 2011; Valko 2007). Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyl (HO^\bullet) sont des exemples de ROS. Lorsque l'oxydation des nutriments est inefficace dans la mitochondrie, le ratio de production d'ATP/consommation d'oxygène est faible, ce qui résulte en une augmentation de la production des ROS. Ces dernières, avec des facteurs génétiques, le vieillissement ainsi qu'une biogénèse mitochondriale réduite contribuent au dysfonctionnement des mitochondries. De plus, nous savons maintenant que la dysfonction mitochondriale représente l'un des mécanismes pathogéniques cruciaux de la MP (Bender *et al.* 2006, 2008). Des mutations dans des gènes tels que parkine et PINK1 causent des formes autosomiques récessives de MP et ont été impliquées dans le contrôle de la morphologie et de la fonction mitochondriale (Banerjee 2010). Ces gènes ont été présentés plus en détail à la sous-section 1.2.6 de ce mémoire.

1.3.1 Les Radicaux libres

Un radical libre est une molécule possédant un ou plusieurs électrons libres, ou non appariés, sur sa couche périphérique. Les électrons non appariés sur la couche externe rendent la molécule instable et elle aura alors tendance à réagir avec d'autres espèces chimiques. Afin de se stabiliser, elle va arracher un électron à une molécule voisine, ce qui rendra cette dernière instable à son tour. L'espèce perdant un électron est dite oxydée et l'espèce gagnant un électron est dite réduite. La perte d'un électron ainsi arraché correspond au phénomène d'oxydation (Figure 1.11). Les radicaux libres sont donc considérés comme des espèces chimiques oxydantes puisqu'ils ont tendance à favoriser la perte d'un électron chez les autres molécules (Gilgun-Sherki, Melamed, et Offen 2001).

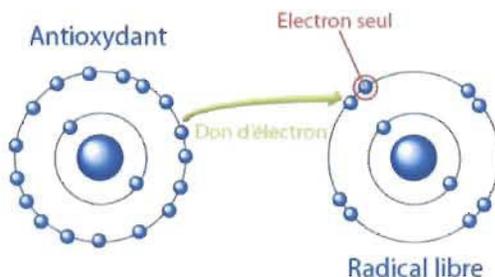


Figure 1.11 Représentation du don d'un électron à un radical libre. (Tirée de slideshare.net).

Parmi les radicaux libres, les ROS sont les plus abondantes et aussi les plus réactives. En effet, la molécule d'oxygène peut accepter jusqu'à 4 électrons sur sa dernière couche. Les états réduits de l'oxygène correspondant l'ajout de 1, 2, 3 et 4 électrons respectivement sont : l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le HO^{\cdot} et l'eau (H_2O) (Fang, Yang, et Wu 2002; Favier 2006).

Environ 80 % de l'oxygène consommé sera réduit en eau par la mitochondrie (Halliwell 2006), ce qui fait d'elle la principale source de ROS, selon plusieurs études (Kannan et Jain 2000; Sherer, Betarbet, et Greenamyre 2002).

Plusieurs espèces réactives de l'azote (RNS) font aussi partie des radicaux libres. La source des RNS est l'oxyde nitrique (NO) qui est formé par un groupe d'enzyme appelé synthase de l'oxyde nitrique (NOS). Le NO peut réagir avec d'autres réactifs pour former d'autres RNS qui, à leur tour se combinent avec de plus grosses molécules, ce qui altère leur fonction. Même s'il est peu réactif, le NO peut former plusieurs intermédiaires plus nocifs comme le nitrite (NO^{2-}), le nitrate (NO^{3-}) ou le peroxydinitrite ($ONOO^{\cdot-}$) (Ghafourifar et Richter 1997; Drew et Leeuwenburgh 2002).

1.3.2 La Production d'espèces réactives de l'oxygène

L' $O_2^{\cdot-}$ est le premier état réduit de l'oxygène, il correspond à l'ajout d'un électron sur la couche périphérique. Ce radical est à la base de la formation des autres radicaux libres (Halliwell et Gutteridge 1986). La production de ce radical survient dans les complexes I et III de la chaîne de transport des électrons de la mitochondrie (Balaban, Nemoto, et Finkel 2005). Par contre, il est estimé qu'une petite quantité, soit environ 2 %, des produits de la réduction de l'oxygène, comme le $O_2^{\cdot-}$, peuvent s'échapper de la chaîne et réagir avec d'autres molécules (Halliwell 2006).

Aussi, la production de $O_2^{\cdot-}$ peut se faire de façon non enzymatique via l'auto-oxydation de la dopamine. La dégradation de la dopamine résulte de deux différentes voies : enzymatique, tel que décrit dans la sous-section 1.1.1, et non-enzymatique, que l'on appelle auto-oxydation, se produisant selon la réaction suivante :



Figure 1.12 Réaction d'auto-oxydation de la dopamine.

SQ[•] représente une semi-quinone.

En effet, l'oxydation par l'oxygène de différents composés peut induire la production de l'O₂^{•-}. Cette réaction d'auto-oxydation se produit fréquemment chez les monoamines, comme la DA (Graham 1978). Donc, les neurones DAergiques sont particulièrement exposés à une grande quantité de ROS induite par le métabolisme de ce neurotransmetteur (Miyazaki et Asanuma 2008). De plus, le cerveau est plus vulnérable aux réactions oxydantes car il consomme plus de 20 % de tout l'oxygène (Miller *et al.* 2009).

Le H₂O₂ est formé suite à la réduction de l'O₂^{•-} par l'enzyme SOD. Cette opération consiste à ajouter un électron à l'O₂^{•-} dans le but de le rendre moins toxique. Effectivement, le H₂O₂ est moins réactif que son précurseur, ce qui ne le rend pas pour autant inoffensif. En effet, c'est en réagissant avec le Fe²⁺ que celui-ci produit un radical plus toxique : le HO[•] tel que décrit dans la réaction de Fenton suivante (Wardman et Candeias 1996) :



Figure 1.13 Réaction de Fenton.

En présence de métaux, la réaction de Fenton se produit et forme des ROS. Dans le mésencéphale, et plus précisément, dans la SNpc, la présence de fer est plus abondante, car il est utilisé pour la formation de la dopamine par l'enzyme TH (Oakley *et al.* 2007; Riederer *et al.* 1989). Le fer contribue aussi à la formation du HO[•] par la réaction de fenton

dans la SNpc (Zecca *et al.* 2008). Cela explique, en partie, pourquoi la SNpc est la région la plus touchée dans la MP. En outre, on constate des niveaux de fer plus importants chez les patients atteints de la MP. (Riederer *et al.* 1989).

Le HO[•] est formé suite à l'interaction du H₂O₂ et de l'O₂^{•-} en présence de métaux, comme le fer, selon la réaction de Fenton présentée plus haut. Le HO[•] est très réactif (Delattre *et al.* 1999) et joue un rôle majeur dans la peroxydation des lipides et l'altération du matériel génétique (Hennebelle 2006).

1.3.3 La Réponse antioxydante

Il faut noter que l'accumulation de ROS ne constitue pas une situation pathologique puisque l'organisme possède un système de détoxification contre les ROS faisant intervenir des enzymes comme la SOD, la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx). Le stress oxydant peut devenir un état physiopathologique à la suite d'un déséquilibre entre la production des ROS et les défenses de l'organisme (Figure 1.14), plus précisément un excès de ROS ou une insuffisance de la quantité des enzymes antioxydantes pourrait mener au déséquilibre.

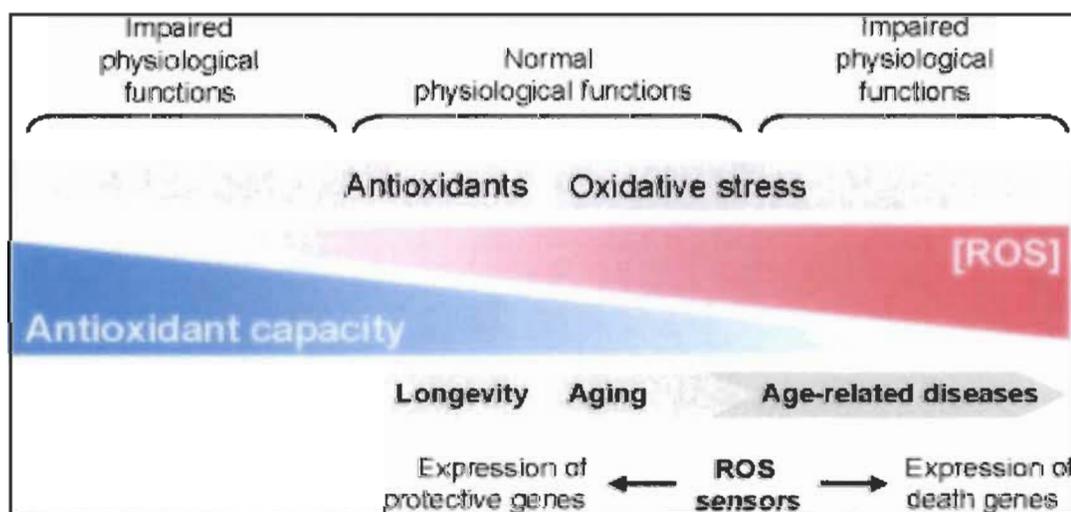


Figure 1.14 Balance entre les capacités antioxydantes et les espèces réactives de l'oxygène (Storz 2011).

Le rôle de la SOD est d'induire la dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 et en oxygène, tel qu'illustré à la figure 1.15. Il existe trois isoformes de la SOD, soit la Cu/ZnSOD1, présente dans le cytosol, la MnSOD2, présente dans les mitochondries et la Cu/ZnSOD3 (Landis et Tower 2005) qui est sécrétée par les cellules musculaires lisses. Cette forme extracellulaire est un système majeur de défense dans la paroi des artères (Pincemail *et al.* 2007).

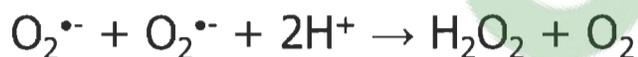


Figure 1.15 Réaction catalysée par l'enzyme superoxyde dismutase.

La GPx réduit le H_2O_2 en eau à l'aide de la glutathion qui sert de donneur d'électron (Figure 1.16). Il existe 5 isoformes de l'enzyme GPx, soit la GPx1 et la GPx4 se retrouvant dans le cytosol et la membrane de la majorité des tissus, la GPx2 se retrouve dans le tractus gastro-intestinal, la GPx3 se trouve dans les reins, et la GPx5 dans le sperme (Arthur 2001).



Figure 1.16 Réaction catalysée par la glutathion-péroxydase

La CAT réduit aussi le H_2O_2 en eau (Figure 1.17). Elle est constituée de quatre sous-unités contenant chacune un groupement hémique Fe^{2+} . Elle se retrouve dans les peroxysomes et les érythrocytes (Bonfont-Rousselot 2002).



Figure 1.17 Réaction catalysée par la catalase.

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre les ROS et les RNS comparativement aux défenses antioxydantes de l'organisme. Lorsque les antioxydants de la cellule deviennent en sous-nombre par rapport aux ROS et RNS, il y a stress oxydant.

1.4 L'Hyperglycémie et le diabète

1.4.1 Quelques définitions

La définition physiologique d'hyperglycémie est une augmentation des niveaux de glucose dans le sang. Le diabète est une affection qui se caractérise par l'augmentation du taux de glucose dans le sang. Cela peut avoir pour origine une diminution, soit de la sécrétion d'insuline, hormone essentielle à l'absorption du glucose par les cellules, soit de l'action de celle-ci sur les cellules. Lorsque cela se produit, les répercussions pour l'organisme tout entier sont considérables (American Diabetes Association 2012).

Selon la Fédération internationale du diabète, en 2013, il y avait mondialement 8,3 % des personnes adultes qui étaient atteints par le diabète et l'augmentation est constante. Si la tendance se maintient, en 2030, 1 adulte sur 10 en sera alors atteint. De plus, on estime à 175 millions le nombre de personnes atteintes de diabète de type 2, mais non diagnostiquées (Fédération internationale du diabète 2017). Ces données deviennent encore plus bouleversantes si l'on prend en compte le fait que le diabète engendre une panoplie d'autres problèmes de santé graves; il est donc important de sensibiliser les gens à propos de cette maladie que l'on juge parfois trop anodine.

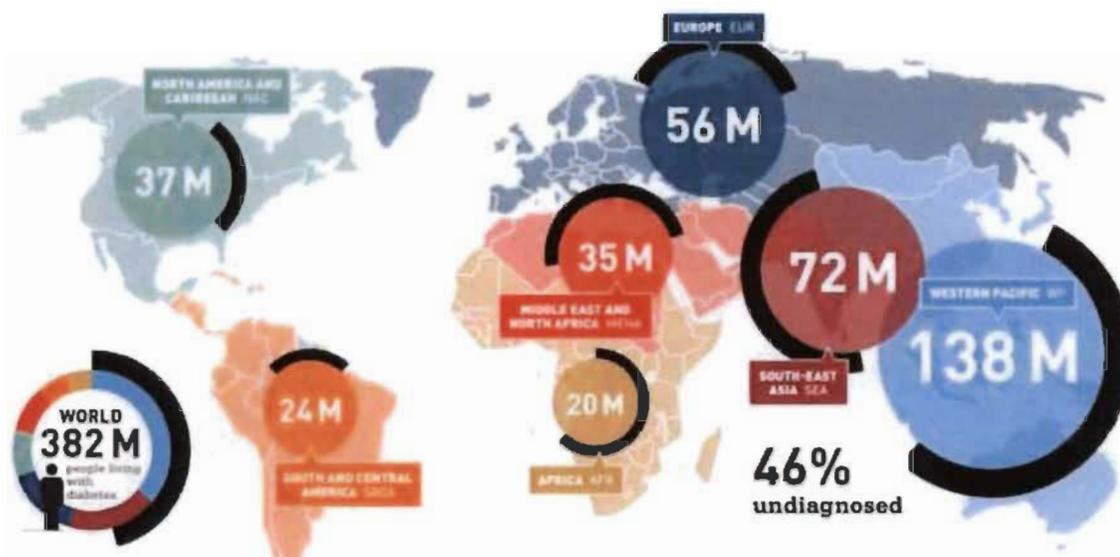


Figure 1.18 Nombre de personnes diabétiques diagnostiquées mondialement en 2013 (Tirée de Fédération internationale du diabète, 2013).

1.4.2 Les Types de diabète

Il existe deux principaux types de diabète, le type 1 est causé par la destruction des cellules β -pancréatique, ce qui cause la diminution, voire l'arrêt de la sécrétion d'insuline. Les personnes souffrant de diabète de type 1 sont diagnostiquées très jeunes et sont souvent soumises à la prise d'insuline de synthèse pour le restant de leur vie. Le diabète de type 2 correspond à une diminution de l'action de l'insuline sur les cellules, causée par une résistance à celle-ci. Il est diagnostiqué à l'âge adulte et est souvent corrélé avec une augmentation de masse adipeuse (American Diabetes Association 2012). Il existe un troisième type de diabète, le type gestationnel qui se développe chez la femme enceinte correspondant à une intolérance au glucose pendant la grossesse (Cosson 2010). Le diabète qui nous intéresse est celui de type 2, car il se développe de façon progressive et insidieuse ce qui fait qu'il est précédé par une hyperglycémie chronique plus ou moins symptomatique appelée pré-diabète. De fait, il peut s'écouler plusieurs années avant qu'un diagnostic ne se pose, ce qui engendre diverses problématiques pouvant toucher les yeux, les reins, le système cardio-vasculaire ainsi que les neurones (Monnier et Fumat 2010).

1.4.3 La Biochimie de l'hyperglycémie chronique

Lors de l'hyperglycémie, plusieurs protéines vont subir des transformations néfastes appelées glycation ou glycosylation. Ce phénomène se caractérise par la fixation d'un sucre réducteur, comme le glucose, sur une protéine par une réaction non-enzymatique. Cette réaction n'est dépendante que de la concentration du glucose sanguin : plus la concentration est élevée, plus la réaction se produit. De nombreuses protéines plasmatiques peuvent subir ce phénomène, par exemple l'albumine ou l'hémoglobine qui sont les plus touchées. La structure de ces protéines se trouvant ainsi modifiée, il devient impossible pour elles de jouer leur rôle métabolique adéquatement (Rondeau 2009; Boulanger, Dequiedt, et Wautier 2001; Gillery 2005).

Le phénomène de la glycation se déroule en trois étapes, soit :

- 1) La **formation de base de Schiff**, qui correspond à l'addition d'un nucléophile entre un groupement aldéhyde du sucre et un résidu aminé de la protéine. (Figure 1.19) (Day, Thorpe, et Baynes 1979).

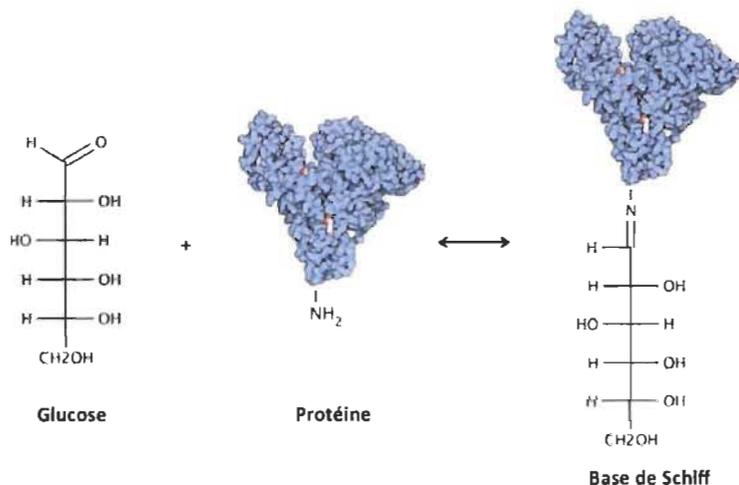


Figure 1.19 Formation de la base de Schiff (Cohen 2012).

- 2) Le réarrangement d'Amadori, correspondant à la formation de protéines intermédiaires, aussi appelés produits d'Amadori, après réarrangements des bases de Schiff (Figure 1.20).

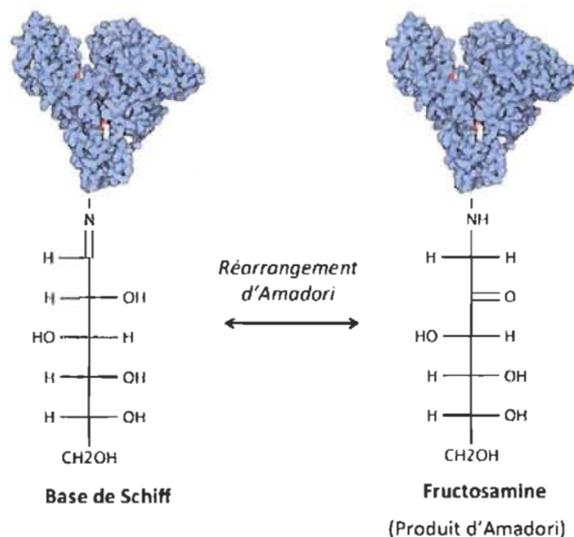


Figure 1.20 Formation du produit d'Amadori (Cohen 2012).

- 3) La formation de advanced glycation end products (AGE) correspond à des réarrangements et des réactions d'oxydation sur les produits d'Amadori. Cette étape est lente (hyperglycémie chronique) et irréversible, alors que les deux premières sont plus rapide (ex : hyperglycémie postprandiale) et réversibles (Baynes et Thorpe 1999; Degenhardt, Thorpe, et Baynes 1998)

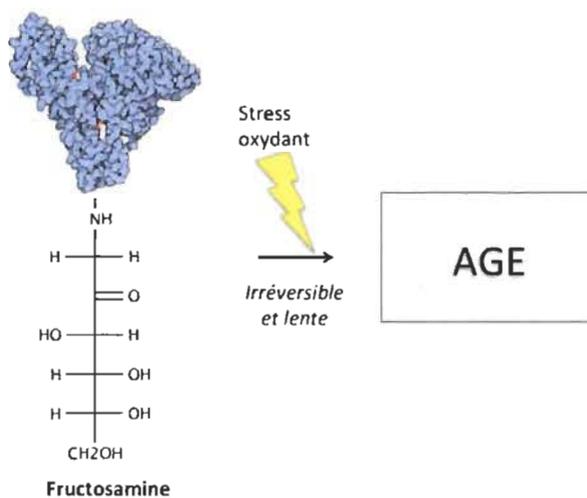


Figure 1.21 Formation d'AGE (Cohen 2012).

L'importance de toutes ces étapes est qu'elles génèrent des ROS. Les produits d'Amadori, par exemple l'hémoglobine glyquée, réagissent avec l'oxygène pour former l' $O_2^{\cdot-}$ ou le H_2O_2 (Gillery 2005). Les produits terminaux, les AGEs (Figure 1.21), vont se

lier à leurs récepteurs membranaires RAGEs des cellules épithéliales et musculaires. Ces interactions vont stimuler des voies signalétiques dont la voie des MAP-kinases ainsi que la voie du facteur de transcription NF κ B, induisant la production de radicaux libres. De plus, l'hyperglycémie entraîne la synthèse de diacylglycerol menant à l'activation de la voie de la protéine kinase C. Cette dernière stimule la NADPH oxydase, ce qui provoque la production de ROS, tel qu'illustré à la figure 1.22 (Chiarelli et Mohn 2002).

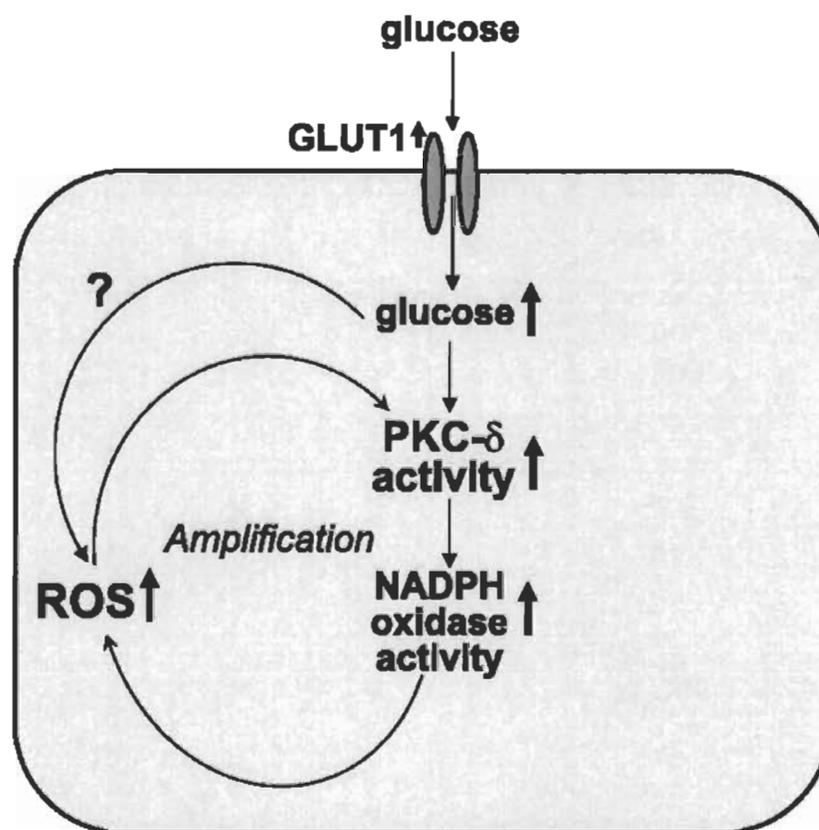


Figure 1.22 Voie de la protéine kinase C (Talior *et al.* 2005).

La majorité des cellules du corps sont desservies par le transporteur du glucose 4 (GLUT4) qui est insulino-dépendant, ce qui signifie que son déploiement vers la membrane s'effectue suite à la liaison de l'insuline à son récepteur cellulaire (Bell *et al.* 1990). À l'inverse, les principaux isoformes de GLUT des cellules épithéliales de la BHE (GLUT1), des cellules gliales (GLUT1) et des neurones (GLUT3) sont insulino-indépendants (Simpson, Carruthers, et Vannucci 2007) : la concentration de glucose à l'intérieur de ces types de cellules dépend donc de la concentration environnante de

glucose. En d'autres termes, plus la glycémie est élevée, plus la concentration de glucose à l'intérieur des neurones augmente. En permettant la hausse de glucose intraneuronal, l'hyperglycémie agit sur différentes voies cellulaires et engendre des ROS nocives pour les cellules.

1.5 L'Anatomie du système nerveux entérique

Le SNE est composé de deux différents types de plexus neuronaux soit, le plexus myentérique et le sous-muqueux. Le plexus myentérique se situe entre les deux couches musculaires, longitudinale externe et circulaire interne, tandis que le plexus sous-muqueux se situe entre la sous-muqueuse et la couche musculaire circulaire, tel qu'illustré à la figure 1.23.

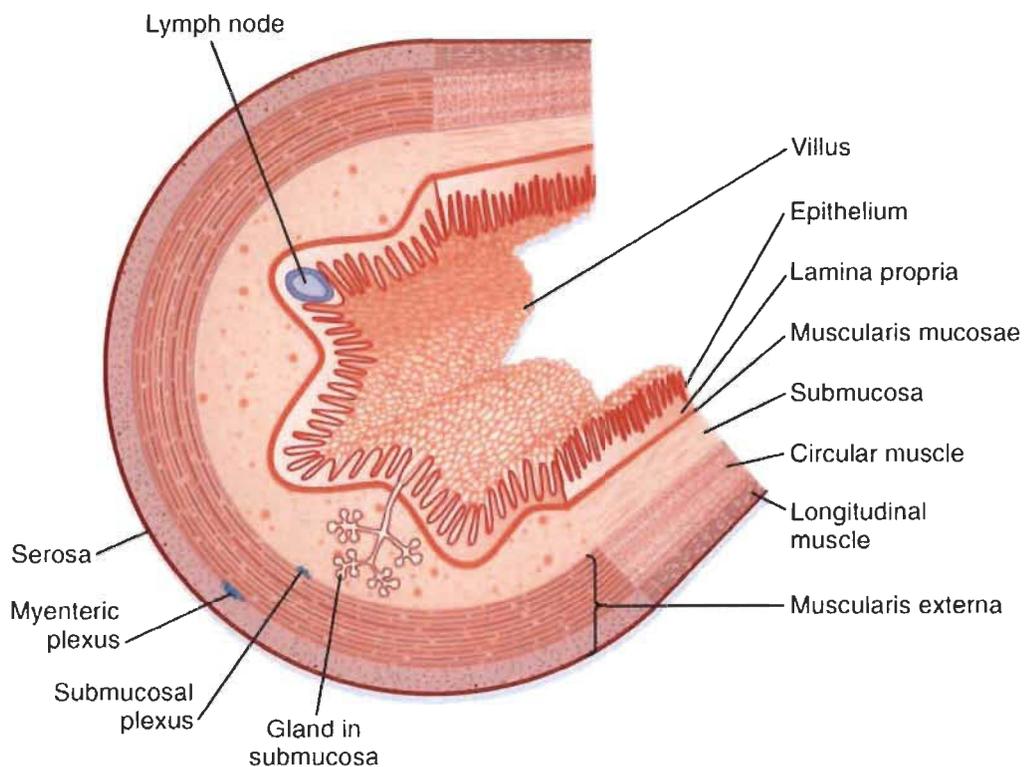


Figure 1.23 Représentation de l'intestin en coupe transverse (Koeppen et Stanton 2010).

Les trois types de neurones qui se retrouvent dans le SNE sont les neurones afférents, les interneurones et les neurones efférents. Les neurones afférents proviennent à la fois du plexus myentérique et du sous-muqueux et répondent à des stimuli mécaniques et chimiques comme la distension intestinale et la variation du pH (Gershon 2005; Furness 2006). Les interneurones ascendants sont exclusivement de type cholinergique tandis que les interneurones descendants sont plus complexes. Les interneurones descendants expriment l'Ach, le NO et le peptide vasoactif intestinal (VIP), et sont impliqués dans le péristaltisme, tandis que les interneurones exprimant Ach et la sérotonine (5-HT) sont impliqués dans la sécrétion glandulaire (Hansen 2003; Furness 2000).

Les neurones efférents peuvent être soit excitateur, soit inhibiteur et vont jouer leur rôle sur les couches musculaires longitudinale externe et circulaire interne. Ces neurones se retrouvent principalement, mais non exclusivement, dans les plexus myentérique. Les neurones excitateurs sont majoritairement cholinergiques et les neurones inhibiteurs, nitreurgiques. Les neurones sécrétomoteurs sont situés dans les plexus sous-muqueux et sont cholinergiques ou VIPergiques (Schemann et Neunlist 2004; Hansen 2003; Furness 2000).

1.5.1 Quelques neurones du système nerveux entérique

Tableau 1.1

Principaux neurotransmetteurs et substances neurohormonales retrouvés dans le SNE

EXCITATEURS	INHIBITEURS
<u>ACh</u>	<u>NO</u>
Adénosine	<u>VIP</u>
5-HT	Somatostatine
Histamine	GABA
	NPY
	<u>Dopamine</u>

1.5.1.1 Les Neurones cholinergiques

Les neurones cholinergiques sont, comme on l'a dit un peu plus haut, des neurones excitateurs. Ils sécrètent le neurotransmetteur Ach. L'étape limitante dans la formation de l'Ach est l'enzyme choline acétyltransférase (ChAT), qui peut être utilisée pour mettre en évidence les neurones cholinergiques. Ces neurones forment la population dominante du tube digestif et sont retrouvés dans des proportions qui tendent à diminuer le long du tube digestif, du duodénum vers le gros intestin. Ils sont présents de 57 % à 72 % du nombre total de neurones dans l'estomac, comparativement à 38 % à 65 % dans le côlon (Anlauf *et al.* 2003; Beck *et al.* 2009). Ces références quantitatives ne sont pas spécifiques aux rat, cependant. Les travaux qualitatifs sont surtout effectués sur des tissus post-mortem d'humain et de singe.

1.5.1.2 Les Neurones nitrergiques

Les neurones nitrergiques sont, quant à eux, des neurones inhibiteurs. Ils sécrètent le neurotransmetteur NO. L'étape limitante dans la formation de NO est l'enzyme NOS, qui peut donc être utilisée pour la mise en évidence des neurones nitrergiques. Contrairement aux neurones cholinergiques, les neurones nitrergiques tendent à augmenter, plus on avance dans le tube digestif, du duodénum vers le gros intestin. Ils représentent de 25 % à 40 % des neurones totaux dans l'estomac pour 50 % des neurones totaux dans le côlon (Noorian *et al.* 2011; Pimont *et al.* 2003; Anlauf *et al.* 2003). Ces références quantitatives ne sont pas spécifiques aux rat, cependant.

1.5.1.3 Les Neurones VIPergiques

Les neurones VIPergiques myentériques sont des neurones inhibiteurs qui sécrètent le VIP. Ils peuvent être mis en évidence directement par le marquage du VIP. Les neurones présents au niveau du plexus myentérique se retrouvent à 50 % des neurones totaux dans l'estomac contre 10 % dans le côlon. Au niveau des plexus sous-muqueux, ces neurones sont présents dans des proportions de 50 % à 79 %, et ce, tout au long du tube digestif

(Anlauf *et al.* 2003; Neunlist *et al.* 2003). Ces références quantitatives ne sont pas spécifiques aux rat, cependant.

1.5.1.4 Les Neurones dopaminergiques

Les neurones DAergiques sont inhibiteurs et sont mis en évidence par le marquage de l'enzyme TH. Dans les plexus myentériques, ils se retrouvent à 20 % des neurones totaux dans l'estomac contre 4 % dans le côlon. Pour ce qui est de plexus sous-muqueux, ils se trouvent à 20 % dans l'estomac contre 0 % dans le côlon (Anlauf *et al.* 2003; Noorian *et al.* 2011). Ces références quantitatives ne sont pas spécifiques aux rat, cependant.

1.5.2 Les Atteintes intestinales dans la Maladie de Parkinson

Tel que spécifié précédemment, les troubles digestifs sont présents dans plus de la moitié des cas de MP. Il existe, à ce jour, peu d'études réalisées sur le sujet, mais l'étude de Beach (2010) s'impose comme le travail de référence (Beach *et al.* 2010). Cette étude porte sur les maladies à corps de Lewy incidentes, c'est-à-dire celles où l'on retrouve des corps de Lewy (Figure 1.6) en périphérie, sans signe de MP au moment du décès. Ceux-ci sont retrouvés dans différents tissus tels que les ganglions sympathiques, le nerf vague ainsi que le tractus digestif (Beach *et al.* 2010). Parmi les autres études réalisées sur le système nerveux entérique (Lee *et al.* 2017), l'une d'elles a trouvé des corps de Lewy dans le plexus myentérique de 14 des 17 patients observés atteints de maladies à corps de Lewy incidentes (Bloch *et al.* 2006). Il faut bien noter, cependant, qu'à ce jour, aucune étude n'a démontré d'atteinte périphérique sans l'atteinte centrale, comme si les deux allaient de pair. Par contre, il semble que le SNE soit automatiquement touché dès lors que le système périphérique l'est aussi (Beach *et al.* 2010).

Par ailleurs, l'hypothèse de Braak (2006) prédit que le SNE pourrait consister en une porte d'entrée de la MP. En effet, selon cette hypothèse, un initiateur externe pourrait s'infiltrer dans le SNE via le plexus sous-muqueux, qui se situe entre la sous-muqueuse intestinale et la couche musculaire circulaire. Cet initiateur mettrait ensuite en branle un processus qui progresse le long du système nerveux pendant plusieurs années vers le SNC

et causerait des atteintes menant aux symptômes moteurs typiques de la MP (Braak *et al.* 2006; Probst, Bloch, et Tolnay 2008). Cette hypothèse a souvent été critiquée, car en fait, aucune observation d'atteintes neuronales n'a encore été faite au niveau intestinal avant qu'il y en ait au niveau central.

Une méta-analyse des études actuelles ne permet pas de conclure à une perte des neurones entériques dans la MP. Il est bien de préciser que des études démontrent une perte de neurones DAergiques dans les plexus myénerique et sous-muqueux mais que d'autres types de neurones ne sont pas affectés (Singaram *et al.* 1995). Les recherches qui utilisent le modèle murin administré avec le MPTP illustrent une importante perte de neurones DAergiques dans tout le SNE, toutefois les mêmes expériences effectuées sur des singes montrent une augmentation totale de tous les types de neurones (Anderson *et al.* 2007; Chaumette *et al.* 2009). Il faut aussi noter que la neurotoxine MPTP cause une relaxation des muscles lisses de l'intestin, ce qui n'est pas de même chez les patients parkinsoniens, qui montrent plutôt des symptômes de constipation. Cependant, suite à ces observations discordantes, le SNE mérite que l'on s'y intéresse plus en profondeur.

CHAPITRE II

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Il est maintenant connu que les personnes diabétiques courent de plus grands risques de développer des maladies neurodégénératives, comme la MP, que les personnes qui n'ont pas de problème d'ordre hyperglycémique (Cereda *et al.* 2011; Sun *et al.* 2012; Hu *et al.* 2007; Xu *et al.* 2011).

Notre laboratoire a déjà montré que les neurones DAergiques en culture subissent des dommages en milieu hyperglycémique et que ces dommages peuvent être réduits en administrant un polyphénol naturel tel que mentionné à la sous-section 1.2.7. À long terme, les objectifs de recherche de notre laboratoire sont de développer des traitements préventifs contre les maladies neurodégénératives associées au diabète. Il est donc très important de bien caractériser les atteintes neuronales dans un modèle *in vivo* d'hyperglycémie.

L'hypothèse générale de mon travail de maîtrise consiste à vérifier si le modèle animal hyperglycémique engendre la dégénérescence des neurones DAergiques de la SNpc, caractéristique de la MP. De plus, un second volet est venu s'ajouter, consistant à regarder les effets de l'hyperglycémie sur le SNE.

Plus en particulier, mes objectifs de recherche étaient :

- 1) Vérifier si l'hyperglycémie engendre une destruction des neurones au niveau de la voie nigro-striée, comme c'est le cas dans la MP. Ensuite, vérifier s'il y a modulation de l'expression de la DA, toujours au niveau de la voie nigro-striée. Les deux régions ciblées étaient le striatum et le mésencéphale, contenant la SNpc.

- 2) Par la suite, vérifier si l'hyperglycémie engendre une destruction de neurones au niveau du SNE et si les neurones DAergiques sont touchés en vérifiant la modulation de l'expression de la DA, dans les plexus sous-muqueux et myentériques.

CHAPITRE III

MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1 Le Protocole *in vivo* : rats hyperglycémiques

3.1.1 Les Médicaments, produits chimiques et appareils

La streptozotocine a été achetée chez Enzo Life Sciences (Farmingdale, É.-U.) et le nicotinamide par VWR (Mississauga, É.-U.). Le lecteur de glycémie UltraMini a été fourni par One Touch et les bandelettes One Touch Ultra (LifeScan Canada Ltd, Johnson & Johnson) ont été achetées dans une pharmacie locale (Pharmaprix, Trois-Rivières, Canada). Le kit de dosage du glucose plasmatique Infinity Glucose Oxidase Liquid Stable Reagent provenait de chez Thermo Scientific (Middletown, É.-U.). Le kit de dosage de l'insuline Milliplex Adipokine Magnetic Bead Multiplex Assay a été fourni par Millipore (Etobicoke, Canada).

3.1.2 Les Animaux et groupes expérimentaux

Quarante rats Sprague-Dawley mâles adultes et pesant entre 175 et 200 g ont été achetés chez Charles River (St-Constant, Canada). Ils ont été logés deux par deux dans des cages de plexiglas mesurant 30 cm par 50 cm, dans une pièce dont la température ambiante était de 21 ± 2 °C et dont l'humidité relative était maintenue entre 45-55 %, avec un cycle lumière-obscurité de 12 h :12 h. Les animaux avaient un accès illimité à l'eau et à la nourriture AIN-93G Purified Diet (Harlan, Madison, É.-U.). Cette diète possède une formulation approuvée par l'American Institute of Nutrition (AIN) pour permettre la croissance et supplémenter les animaux qui ont besoin d'un apport calorique particulier comme les rats hyperglycémiques. Sa formulation précise est disponible en ligne (www.envigo.com).

Dix-huit rats ont été attribués au groupe contrôle et les 22 autres au groupe « hyperglycaemia » (HG). Le protocole expérimental a été approuvé par le Comité de bons soins aux animaux de l'Université du Québec à Trois-Rivières (MGM5-2014). Pendant la période expérimentale, deux rats du groupe HG ont dû être retirés du protocole; le premier est décédé suite à des complications dues à son hyperglycémie et le second a été euthanasié préventivement dû à son état de santé trop précaire.

Pour mieux procéder à l'analyse des résultats, surtout au niveau du cerveau et de l'intestin, nous avons ensuite décidé de diviser les rats hyperglycémies (HG) en trois groupes soit : « low » (HG low), « medium » (HG med) et « high » (HG high), considérant les critères suivants: blancheur des yeux (date et uni/bilatéralité), glycémie moyenne, variabilité de la glycémie ainsi qu'atteinte de plafonds glycémiques. Ces critères seront discutés en détail dans une autre thèse de notre laboratoire. Les rats se sont vus attribuer des scores pour ces 4 critères. Ces chiffres constituent un classement le plus standardisé possible de la sévérité de leur hyperglycémie.

3.1.3 La Préparation des solutions injectables et l'induction de l'hyperglycémie

La streptozotocine est une puissante molécule cytotoxique spécifique aux cellules bêtas des îlots de Langerhans pancréatique produisant l'insuline chez les mammifères. Elle est utilisée en clinique dans la prise en charge des insulinomes malins. La streptozotocine a été dissoute dans un tampon citrate 0,1 M (pH 4,5), puis conservée sur glace à l'abri de la lumière jusqu'au moment de l'injection. Le nicotinamide a été solubilisé dans une solution saline physiologique, le matin-même des injections.

L'hyperglycémie a été induite chez les rats qui avaient jeûné pendant 12-16 h. Les rats du groupe HG ont reçu une injection initiale de nicotinamide (100 mg/kg de poids corporel, i.p.), puis 20 minutes plus tard une injection de streptozotocine (55 mg/kg du poids corporel, i.p.). Le nicotinamide, aussi connue sous le nom de niacinamide, est un dérivé de l'acide nicotinique qui est une vitamine hydrosoluble et fait partie du groupe de

vitamines B. Il est utilisé avec la streptozotocine parce qu'il inhibe la polymérase poly (ADP-ribose) (PARP-1), une enzyme favorisant l'apoptose par la cassure des brins de l'ADN lors de la prise de streptozotocine. En recherche, il est utilisé justement comme « protecteur » des dommages très intenses causés par la streptozotocine (Badole *et al.* 2015, Masiello *et al.* 1998)

Les rats du groupe contrôle ont reçu le même traitement, mais en n'injectant que les solvants, solution saline physiologique ou tampon citrate, aux mêmes volumes, mêmes concentrations et par les mêmes voies d'administration. Toutes les injections étaient effectuées le matin dans un intervalle de 3 h.

3.1.4 Les Mesures métaboliques

Le poids de tous les rats et leur apport en eau et en nourriture ont été enregistrés tous les deux jours, alors que leur glycémie a été mesurée deux fois par semaine à l'aide d'un lecteur de glycémie et de bandelettes One Touch Ultra par ponction du bout de la queue.

Un test de tolérance orale au glucose (*oral glucose tolerance test*, OGTT) a été effectué le matin même des sacrifices chez 6 rats du groupe contrôle et chez tous les rats du groupe HG. Les rats, à jeun depuis 12-16 h, étaient gavés intragastriquement avec 2 g/kg d'une solution de dextrose (D-glucose) à l'aide d'une canule en plastique. Environ 0,5 ml de sang ont été prélevés par la veine jugulaire aux temps 0 (juste avant le gavage), 30, 60 et 120 minutes. Durant les prélèvements, les rats étaient très brièvement endormis par inhalation d'isoflurane. Par la suite, le glucose plasmatique a été dosé à l'aide d'un test utilisant la glucose oxydase (Infinity Glucose Oxidase Liquid Stable Reagent, Thermo Scientific), alors que l'insuline a été quantifiée par voie de multiplex à l'aide de billes magnétiques (Milliplex Adipokine Magnetic Bead Multiplex Assay, Millipore). Le graphique concernant ces résultats de variation de glycémie dans le temps sera présenté au chapitre IV.

3.1.5 Les Sacrifices et prélèvements d'organes

Tous les rats ont été sacrifiés 20 semaines après l'induction initiale de l'hyperglycémie. Les rats ont été endormis par inhalation d'isoflurane puis perfusés par gravimétrie avec environ 200 ml de tampon phosphate saline (PBS) contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases avant d'être finalement décapités. Le striatum, le mésencéphale (contenant la substance noire), le cervelet, l'hippocampe, le cortex préfrontal et une partie de l'intestin grêle ont été prélevés. À ce propos nous avons prélevé un morceau de 5 cm à partir du sphincter pylorique, dans ce texte nous ferons référence à ces tissus comme « intestin grêle ». Une moitié des tissus cérébrales et intestinales ont été immédiatement gelés dans de l'isopentane à -80 °C et conservés à -80 °C jusqu'au moment de leur analyse par immunobuvardage de type Western. L'autre moitié de ces tissus ont été fixés dans une solution de PBS contenant 4 % de paraformaldéhyde. Ils ont ensuite été analysés par immunohistochimie. Tous les sacrifices ont été effectués en un avant-midi.

3.2 L'Analyse des cerveaux de rats hyperglycémiques

3.2.1 Les Anticorps

L'anticorps anti-TH, dilué 1 :1000, provenait de la compagnie Sigma-Aldrich (T1299, St-Louis, É.-U.) et l'anticorps anti- β -3-tubuline, dilué 1 :200 à 1 :400, provenait de la compagnie Santa Cruz (Texas, É.-U.), ainsi que l'anticorps anti-DAT, dilué 1 :200. L'anticorps anti-NeuN, dilué 1 :250, provenant de chez Bioss (Massachusetts, É.-U.). Tous les anticorps de la cascade de signalisation de *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B), dilués 1 :1000 à 1 :500, provenaient de la compagnie Cell Signaling (Danvers, É.-U.). Les anticorps secondaires tels que l'anti-souris et l'anti-lapin provenant tous les deux de chez Santa-Cruz (Texas, É.-U.) et étaient dilués 1 :10 000 à 1 :5000.

L'anticorps anti-TH, dilué 1 :1000, provenait de la compagnie Sigma-Aldrich (T1299, St-Louis, É.-U.) et l'anticorps anti- β -3-tubuline, dilué 1 :200 à 1 :400, provenait de la compagnie Santa Cruz (Texas, É.-U.), ainsi que l'anticorps anti-DAT, dilué 1 :200. L'anticorps anti-NeuN, dilué 1 :250, provenant de chez Bioss (Massachusetts, É.-U.).

3.2.2 L'Extraction des protéines et dosages

Le striatum, le mésencéphale et des morceaux d'intestin d'environ 2 cm ont été conservés à -80 °C avant d'être coupés en morceaux puis réduits en poudre à l'aide d'un appareil Tissus Lyser à 30 Hz pendant 1 à 5 minutes. Les protéines ont ensuite été extraites en utilisant un kit d'extraction de protéines (Active Motif), dans 10 µl/mg de tampon RIPA (0,15 M NaCl / 1 % triton X 100 / 0,5 % sodium deoxycholate / 0,1 % SDS / 0,05 M Tris-HCl pH 8.0) avec inhibiteurs de protéases à 75 °C pendant 10 minutes. Par la suite, les lysats ont été centrifugés à 14 000 rpm pendant 10 minutes et le surnageant contenant les protéines a été conservé à -80 °C jusqu'à leur utilisation. Les protéines totales ont été dosées par la méthode de l'acide bicinchoninique (Pierce™ BCA Protein Assay Kit). Plusieurs paramètres furent testés afin d'optimiser ce processus, dont le volume de tampon RIPA ainsi que la méthode d'agitation utilisée pendant l'extraction. Les gels de polyacrylamide ont été chargés avec une quantité de protéines totales entre 10 et 20 microgrammes, dépendamment des tissus. Des quantités égales de protéines ont été déposées dans chacun des puits d'un gel de polyacrylamide 12 %, tel que décrit à la section 3.2.5.

3.2.3 La Détermination de la protéine à utiliser comme standard de chargement

Afin de normaliser les résultats, il a fallu utiliser une protéine standard dont le niveau d'expression ne varie pas entre les différentes régions du cerveau, ni entre les différentes conditions expérimentales. Cette protéine doit aussi être stable entre les différents essais. Il a donc été décidé de tester trois protéines candidates soit : la β -tubuline, la chaîne légère du polypeptide neurofilament (NF-L) ou l'actine. Ces protéines ont été testées dans cinq régions du cerveau : le cervelet, le mésencéphale, le striatum, l'hippocampe et le cortex pré-frontal.

3.2.3.1 Essais avec β -tubuline

La figure 3.1 représente les deux essais réalisés par immunobuvardages de type Western portant sur la protéine β -tubuline. Cette figure montre qu'il y a une certaine constance concernant l'expression de la protéine entre les différentes parties du cerveau des rats, ainsi qu'entre les deux essais eux-mêmes. Cela démontre que la protéine est stable dans le temps ainsi que présente en quantité assez comparable dans toutes les régions du cerveau et donc la protéine β -tubuline semble être une bonne candidate pour agir en tant que protéine de normalisation pour les autres marqueurs.

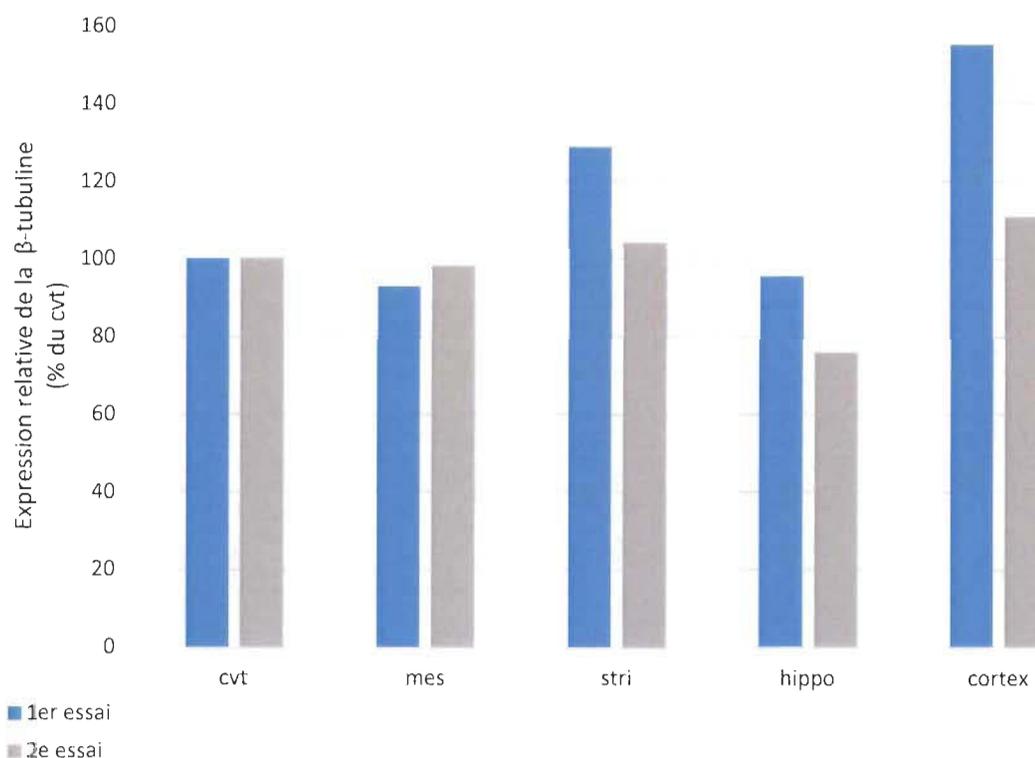


Figure 3.1 Expression relative de la protéine β -tubuline dans différentes régions du cerveau des rats.

Elle est exprimée en pourcentage par rapport au cervelet, analysée par immunobuvardage de type Western.

3.2.3.2 Essais avec la chaîne légère du polypeptide neurofilament

La figure 3.2 représente les deux essais réalisés par immunobuvardages de type Western portant sur la protéine NF-L. On note une plus grande variabilité de l'expression de la protéine entre les différentes parties du cerveau des rats et entre les deux essais comparativement à la protéine β -tubuline analysée précédemment.

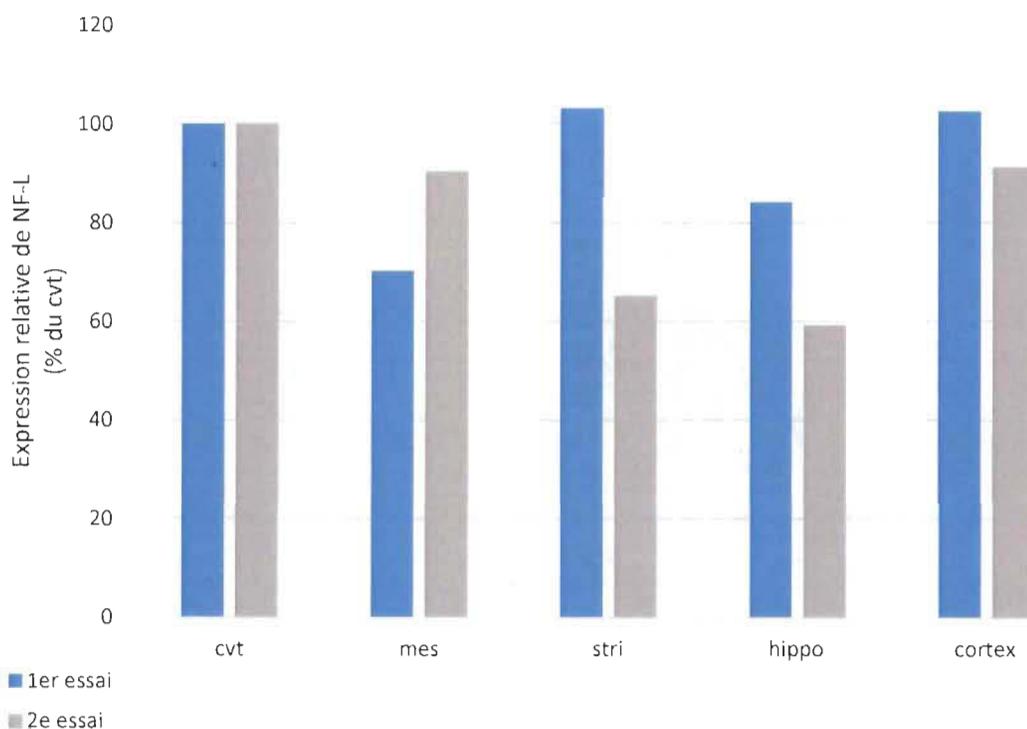


Figure 3.2 Expression relative de la protéine chaîne légère du polypeptide neurofilament dans différentes régions du cerveau des rats.

Elle est exprimée en pourcentage par rapport au cervelet, analysée par immunobuvardage de type Western.

3.2.3.3 Essais avec actine

La figure 3.3 représente les deux essais réalisés par immunobuvardages de type Western portant sur la protéine actine. Il est facile de noter, ici, qu'il n'y a aucune constance concernant l'expression de la protéine, ni entre les différentes régions du cerveau des rats, ni entre les deux essais réalisés. Cette protéine ne pourra donc pas être utilisée due à sa trop grande variabilité.

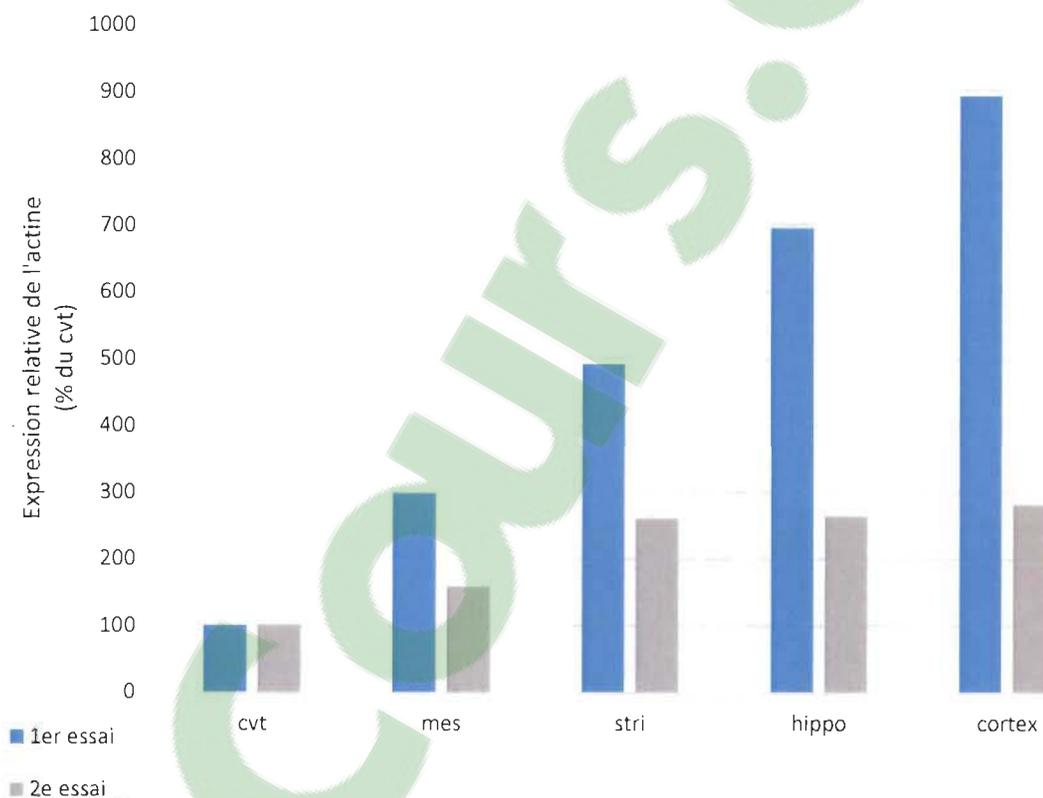


Figure 3.3 Expression relative de la protéine actine dans différentes régions du cerveau des rats.

Elle est exprimée en pourcentage par rapport au cervelet, analysée par immunobuvardage de type Western.

En comparant visuellement les trois graphiques des protéines candidates, il est possible d'éliminer d'emblée l'actine qui présente une trop grande variabilité entre les régions du cerveau analysées. Par la suite, un choix s'imposait entre la protéine NF-L ainsi que la β -tubuline. La protéine NF-L représentait une plus grande variabilité entre les essais

au niveau des régions qui nous intéressait le plus, comme le mésencéphale et le striatum, comparativement à l'autre protéine testée. La β -tubuline a donc été choisie en fonction de sa stabilité comme protéine standard de chargement lors des immunobuvardages de type Western faits sur les différentes régions des cerveaux de rats.

3.2.4 La Détermination d'un marqueur de tyrosine hydroxylase

Il a été décidé d'utiliser un autre contrôle interne, en plus la protéine standard de chargement mentionnée ci-haut, reconnu pour exprimer fortement la protéine TH : un extrait total des cellules PC12. Les cellules PC12 sont des cellules de phéochromocytomes différenciées en neurones DAergiques. Elles sont donc reconnues pour exprimer la TH et grandement utilisées par le laboratoire, ce qui représente un avantage au niveau de la disponibilité de ce standard. L'intérêt d'utiliser ces cellules comme contrôle interne est de pouvoir vérifier que les anticorps utilisés fonctionnent bien, puisque nous sommes certain que les cellules PC12 exprimeront la protéine TH.

La figure 3.4 montre les cellules PC12 différenciées en neurones DAergiques. Les noyaux des cellules sont en bleu, les neurofilaments sont en rouge et la protéine d'intérêt TH est en vert. D'après cette image, il est possible de constater que les cellules PC12 produisent bel et bien la protéine TH, et ce, en grande quantité.

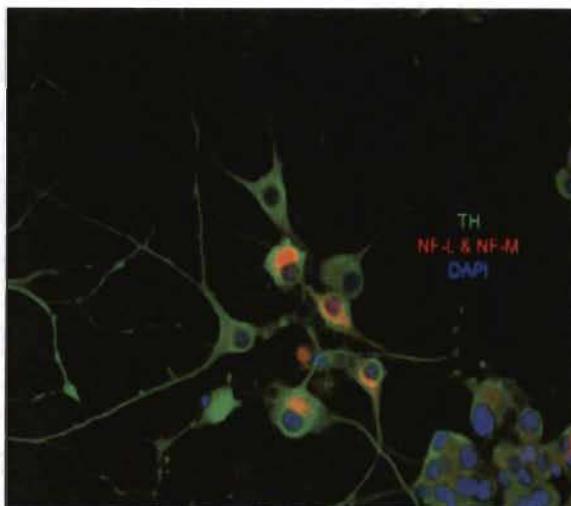


Figure 3.4 Représentation des cellules PC12 différenciées, en immunofluorescence.

Image provenant du laboratoire de Maria-Grazia Martinoli.

3.2.5 L'Électrophorèse et l'immunobuvardage de type Western

L'électrophorèse des protéines a été réalisée sur des gels de polyacrylamide 12 % et d'une épaisseur de 1,5 mm, à 70 V pendant 30 minutes puis à 120 V pendant 90 minutes. Par la suite, les protéines ont été transférées à 30 V pour la nuit sur des membranes de polyvinylidene fluoride (PVDF) pour détecter les protéines TH, NeuN et DAT et sur des membranes de nitrocellulose pour détecter les marqueurs de la cascade de signalisation de NF- κ B, soit, *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit α/β* (IKK α/β), *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor α* (I κ B α) et NF- κ B, qui ne seront pas discutés dans ce mémoire.

Tous les anticorps utilisés en technique d'immunobuvardage de type Western ont été dilués dans une solution de BLOTTO B (1 % d'albumine de sérum bovin (BSA), 1 % de lait en poudre non gras, 0,05 % de Tween-20 dans une solution de TBS). Cette solution sert aussi de solution de blocage (30 minutes à température ambiante). Les anticorps primaires ont été incubés toute la nuit à 4 °C avec agitation, tandis que les anticorps secondaires ont été incubés 45 minutes à température pièce avec agitation. La révélation a été réalisée soit avec le réactif Femto (ThermoFisher Scientific, Middletown, É.-U.), soit avec un réactif fait maison (68 mM d'acide p-Coumarique dans DMSO; 1,25 mM de Luminol dans Tris-HCl 0,1 M pH 8,5 et H₂O₂ 30 %) (Haan et Behrmann 2007). Les images des bandes furent prises à l'aide de l'appareil Fluor Chem (Alpha Innotech) et l'analyse de l'intensité des bandes a été réalisée grâce au logiciel Image J.

3.3 L'Analyse des intestins de rats hyperglycémiques

3.3.1 Les Coupes des intestins des rats hyperglycémiques

3.3.1.1 Les Coupes au cryostat

Les coupes de 50 microns sont été effectuées sur un cryostat. La chambre de l'appareil était refroidie à une température de -19 °C alors que le tissu était refroidi à

-20 °C. Le tissu était immobilisé sur l'objet à l'aide du produit Cryomatrix de Thermo Scientific. Les coupes ont été effectuées de façon transversale et de façon longitudinale, et ont été déposées dans une goutte de PBS sur une lame SuperFrost Plus, puis le PBS a été enlevé à l'aide d'un papier absorbant. Chaque échantillon a ensuite été rapidement séché à l'aide d'une goutte de méthanol. Les lames ont été conservées à -20 °C avant d'être utilisées.

3.3.1.2 La Technique « Wholemount »

Des bouts d'environ 1 cm d'intestin grêle ont été décongelés sur la glace, puis ouverts sur le sens de la longueur. La couche muqueuse était pelée à l'aide d'une lame afin de ne conserver que les couches musculaires (circulaire et longitudinale) ainsi que les plexus de neurones situés entre ces deux couches musculaires (Phillips et Powley 2001; Bradley et Powley 1994). Les tissus ont ensuite été perméabilisés par une incubation de 30 minutes dans une solution de Triton X-100 0,5 % dans du TBS. Toutes les colorations et les manipulations sur ces tissus ont été faites en « free floating », c'est-à-dire que la section était libre de flotter dans les solutions. Les tissus ont finalement été séchés toute la nuit sur une lame, puis colorés, déshydratés et montés pour observation microscopique.

3.3.2 Les Colorations

3.3.2.1 La Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine

L'hématoxyline et l'éosine provenaient de chez Sigma-Aldrich. Les lames ont été plongées dans une solution d'hématoxyline 1: 10 dans l'eau distillée pendant 2 minutes puis rincées à l'eau. Elles ont été ensuite plongées dans une solution de bicarbonate de sodium 0,1 % durant 1 minute avant d'être plongées dans une solution d'éosine à 0,1 % m/v dans de l'éthanol 80 % pendant 10 minutes puis rincées à l'eau pour éviter la décollation de l'éosine et la fixer dans les cellules. Elles ont ensuite été séchées dans des bains successifs d'éthanol 70 %, puis 95 %, puis 100 % pour finir par 3 bains de xylène, puis elles ont été montées.

3.3.2.2 La Coloration au bleu cuprolinique

Le bleu cuprolinique (CB) provenait de chez Polysciences, était dilué à 0,5 % dans un tampon de sodium acétate 0,05 M contenant 1,00 M de MgCl₂ à pH 4,9 et conservé à 4 °C. Ce colorant est utilisé pour marquer les neurones dans les coupes intestinales. Les tissus ont été incubés dans le CB pendant quatre heures dans une chambre humidifiée à 37 °C. Les tissus d'intestin grêle ont ensuite été rincés à l'eau distillée, puis incubés 2 minutes dans une solution de tampon de sodium acétate 0,05 M contenant 1,00 M de MgCl₂, pH 4,9 et encore rincés avec de l'eau distillée. Par la suite, une technique d'immunohistochimie ou d'immunofluorescence (voir plus bas) était pratiquée sur ces lames, ou encore, les lames étaient montées directement (Holst et Powley 1995; Tas, Mendelson, et Noorden 1983; Phillips *et al.* 2004).

3.4 L'Immunodétection dans les intestins des rats hyperglycémiques

3.4.1 Les Anticorps

Les anticorps primaires utilisés sont l'anti-TH produit chez la souris, provenant de chez Sigma-Aldrich, dilué 1 :500 à 1 :100 pour IHC et 1 :50 pour l'immunofluorescence, et l'anti-NeuN produit chez le lapin provenant de chez Bioss et dilué 1 :300. Les anticorps secondaires utilisés en immunohistochimie sont l'anti-souris IgG-HRP et l'anti-lapin IgG-HRP produits chez la chèvre, provenant de chez Santa Cruz et dilués 1 :1000. Les anticorps secondaires utilisés pour l'immunofluorescence sont l'anticorps anti-souris couplé au Cy3 et l'anti-lapin couplé au FITC, tous deux produits chez la chèvre et provenant de chez Thermo Fisher Scientific (dilués 1 :500 à 1 :100).

3.4.2 L'Immunohistochimie

Les intestins grêles ou les lames ont été incubés dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 3 % dans du TBS pendant 10 minutes à température pièce. Puis, ils ont été incubés pendant 30 minutes dans une solution de blocage contenant 5 % de sérum de chèvre (normal goat serum (ab748)), dans du TBS avec 0,5 % de Triton X-100 comme

agent de perméabilisation. Les tissus ont ensuite été incubés avec l'anticorps primaire toute la nuit à 4 °C dans une chambre humidifiée. Par la suite, des lavages ont été effectués avec du TBS, puis l'anticorps secondaire a été incubé pendant 1 heure à température pièce dans une chambre humidifiée. La révélation a été faite avec le réactif DAB (PI-34065, Pierce Metal Enhanced DAB Substrate Kit,) pendant 20 minutes. Les lames ont été montées avec le produit Eukitt® quick-hardening mounting medium for microscopy et ont été séchées toute la nuit à température pièce.

3.4.3 L'Immunofluorescence

Les tissus ont été incubés dans une solution de blocage contenant 5 % de sérum de chèvre et 0,5 % de Triton X100 (tel que décrit que dans la section immunohistochimie) pendant 30 minutes à température pièce, dans une chambre humidifiée. Par la suite, les tissus ont été incubés dans la solution d'anticorps primaire, ont été rincés, puis incubés dans la solution d'anticorps secondaire, 1 heure à température pièce et à l'abri de la lumière. Les lames ont été rincées puis ont été montées avec le produit Duolink II Mounting Medium with DAPI. Les lames ont été conservées/entreposées à 4 °C pendant 2 jours avant d'être scellées avec un vernis à ongles transparent. Les images furent prises à l'aide du microscope à fluorescence à l'aide du logiciel Image Pro Express 6.3.

3.5 L'Analyse statistique

L'analyse statistique de l'intensité des bandes en immunobuvardages de type Western a été réalisée par la méthode one-way ANOVA, avec un sous-test (*post hoc*) selon la méthode Tukey à l'aide du logiciel GraphPad PRISM version 7.00. Les résultats des statistiques sont présentés selon la moyenne avec SEM. La significativité statistique est représentée selon le code suivant : **** signifie que $P < 0.0001$, *** signifie que $P < 0.001$, ** signifie que $P < 0.01$, * signifie que $P < 0.5$ et l'absence d'étoile signifie que le résultat s'avère non significatif.

CHAPITRE IV

RÉSULTATS

4.1 Les Résultats des tests métaboliques

Dans cette section, je présente certains résultats obtenus suite au suivi métabolique des rats hyperglycémiques et de contrôles normo glycémiques. En particulier, j'illustre les résultats de glycémie et du poids des animaux que j'ai personnellement obtenu. D'autres résultats comme la quantité de nourriture ingérée ainsi que les niveaux d'adipokines ont été obtenu par une collègue de laboratoire et seront présentés dans une autre thèse.

4.1.1 La Glycémie

Le graphique de la figure 4.1 illustre les niveaux de glycémie chez les rats qui ont été administrés avec streptozotocine et la nicotinamine (groupe HG) et chez les normoglycémiques administrés avec une solution saline de contrôle (groupe contrôle). L'injection s'est faite au jour 40 suivant la réception des animaux. les hyperglycémies des animaux HG ont augmenté de façon significative et demeuré au-delà des seuils hyperglycémiques tout au long de la durée du protocole expérimentale.

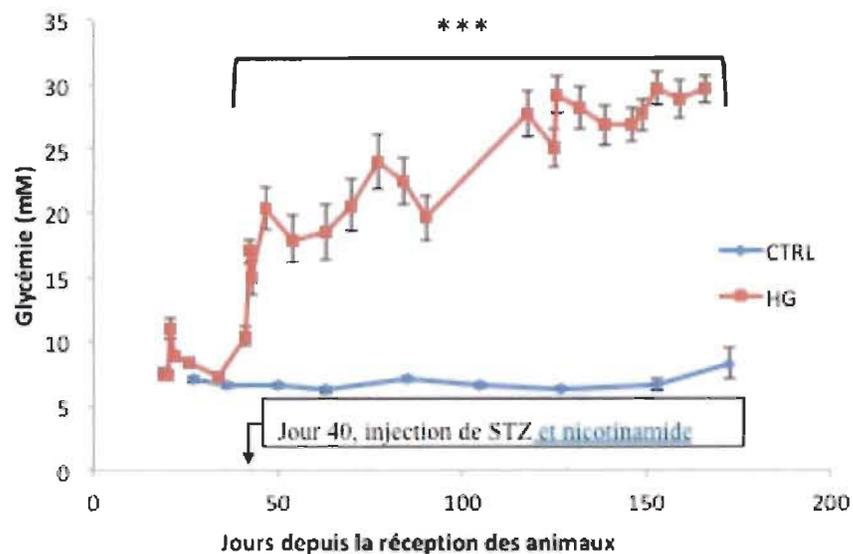


Figure 4.1 Glycémie des rats dans le temps.

HG : rats hyperglycémiques, administrés avec la streptozotocine (STZ) et nicotinamide comme décrit dans le chapitre III Matériels et méthodes. *** $P < 0.001$.

4.1.2 Le Poids des animaux

Le poids des animaux (Figure 4.2) a évolué selon la courbe présentée ci-dessous. Le gain de poids des animaux HG est demeuré supérieur à celui des animaux du groupe contrôle. Ces données seront discutées au chapitre V de ce mémoire.

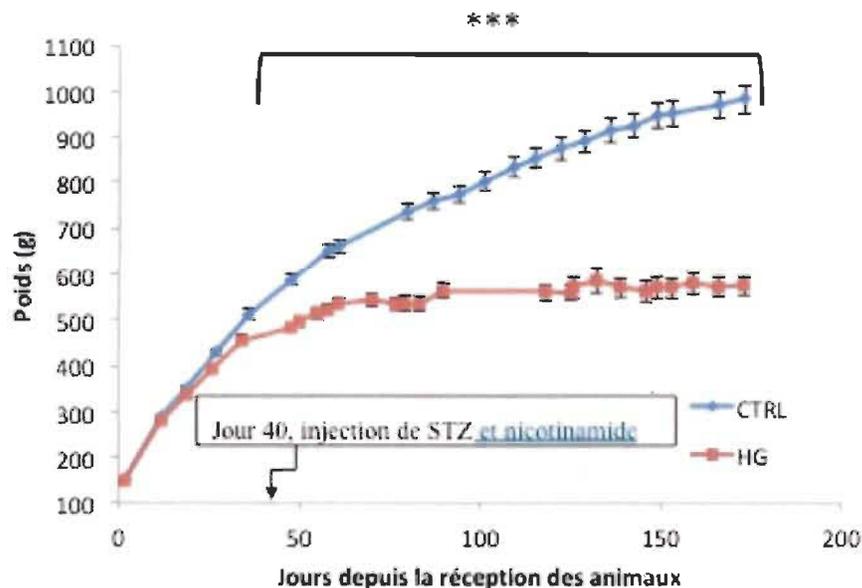


Figure 4.2 Poids des rats dans le temps.

HG : rats hyperglycémiques, administrés avec la streptozotocine (STZ) et nicotinamide comme décrit dans le chapitre III Matériels et méthodes. Groupe contrôle (Ctrl) et groupe hyperglycémique (HG). *** $P < 0.001$.

4.2 La Détermination de la perte neuronale dans le système nerveux central

4.2.1 L'Expression du marqueur neuronal NeuN dans le système nerveux central

NeuN est un marqueur d'identité neuronale (Mullen, Buck, et Smith 1992; Weyer et Schilling 2003) qui nous permet de quantifier les neurones viables dans différentes régions du cerveau, et par conséquent, de déterminer la mort neuronale engendrée par l'hyperglycémie. Dans le mésencéphale, région contenant la SNpc, l'expression de cette protéine était significativement diminuée chez les rats des groupes HG comparativement aux rats du groupe contrôle, comme il est possible de le constater avec les résultats d'immunobuvardage de type Western, de la figure 4.3A. Il est aussi possible de constater sur cette figure qu'il n'y a aucune différence significative entre les bandes d'immunobuvardage de chacun des groupes HG.

La figure 4.3B représente des coupes de mésencéphale incluant la région de la SNpc (indiquée par la flèche en bleu) qui est la région principalement touchée dans la MP. Sur

ces coupes, analysées par immunohistochimie, l'intensité du signal des neurones est grandement diminuée chez les rats des groupes HG (50% pour HG low, 55% pour les HG med et 75% pour les HG high) comparativement aux rats du groupe contrôle et il n'y a aucune différence significative entre le marquage de chacun des groupes HG.

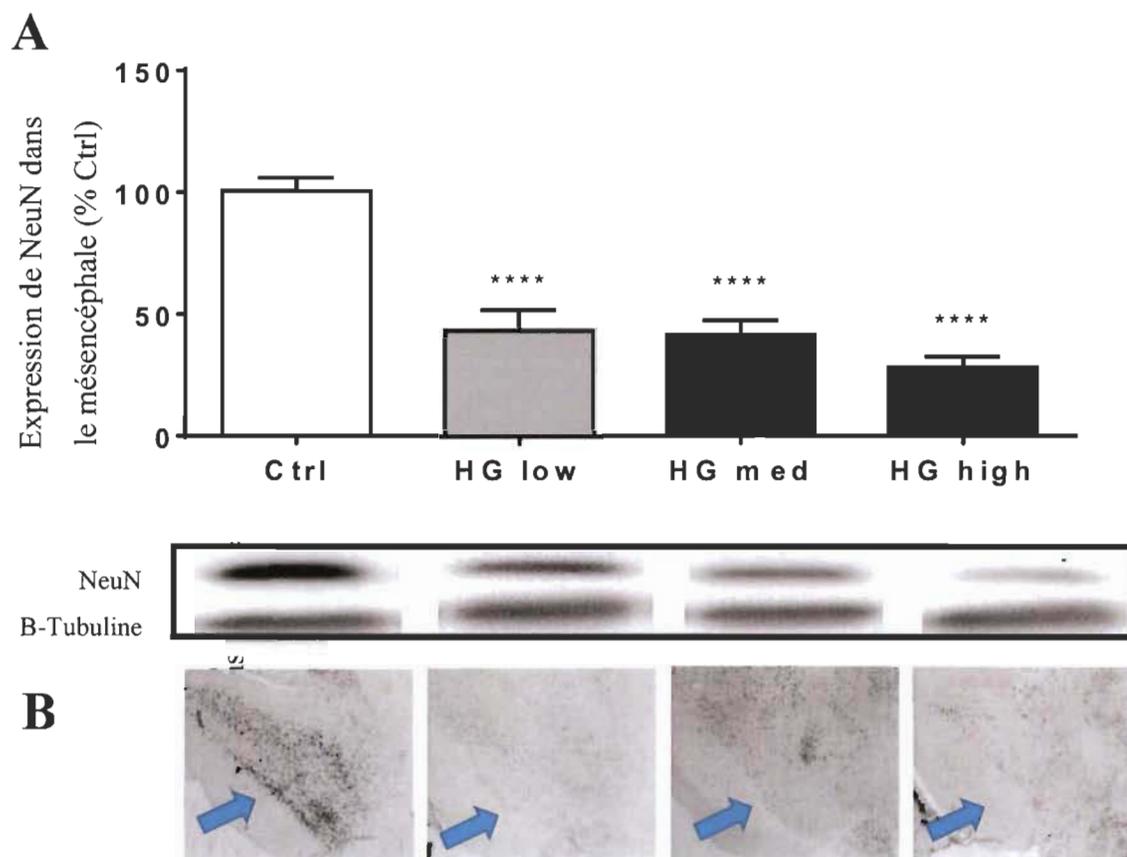


Figure 4.3 Expression du marqueur neuronal NeuN dans le mésencéphale et dans la substance noire *pars compacta*.

A) Expression relative de NeuN dans le mésencéphale, exprimée en pourcentage du contrôle (Ctrl), en immunobuvardage de type Western, pour chacun des groupe HG et le groupe Ctrl. **** P < 0.0001, *** P < 0.001. Aucune différence significative entre les différents groupes HG. B) Détection de NeuN par immunohistochimie dans la SNpc pour chacun des groupes hyperglycémique HG et le groupe contrôle Ctrl. La région de la SNpc est indiquée par la flèche en bleue.

La figure 4.4 illustre l'expression de cette protéine dans la région du striatum, analysée par la méthode d'immunobuvardage de type Western. Une diminution de ce

marqueur dans la région du striatum est visible, mais une diminution moins prononcée que dans le mésencéphale. En outre, le groupe HG high présente une baisse significative de 18% comparée avec le groupe contrôle. L'immunohistochimie n'a pas encore été réalisée sur cette région du cerveau, elle sera faite par un collègue et sera introduit lors d'une présentation future.

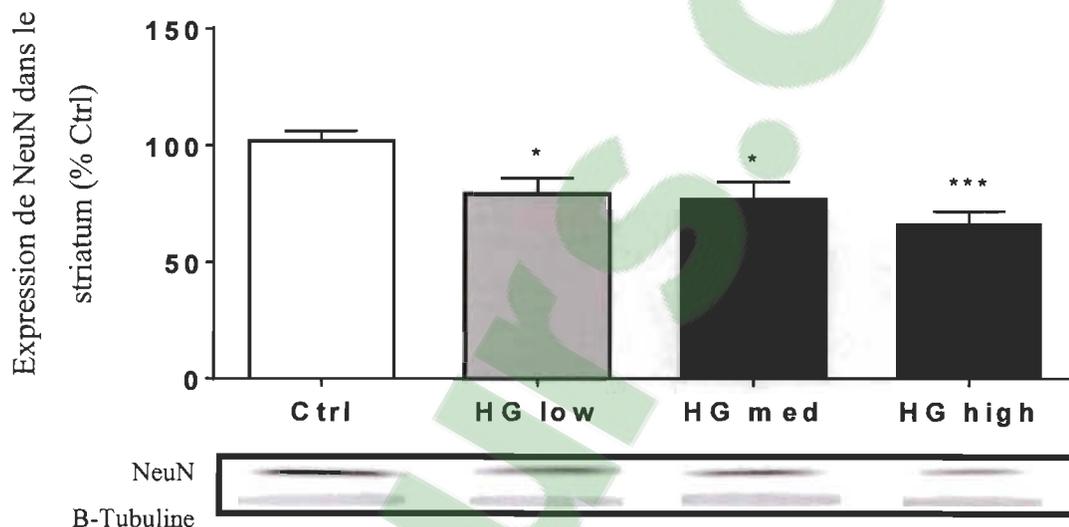


Figure 4.4 Expression du marqueur neuronal NeuN dans le striatum. Expression relative de NeuN dans le striatum exprimée en pourcentage du contrôle (Ctrl), en immunobuvardage de type Western, pour chacun des groupes HG et le groupe Ctrl. *** $P < 0.001$, * $P < 0.5$. Aucune différence significative entre chaque groupe HG entre eux.

4.3 La Détermination de la modulation dopaminergique dans le système nerveux central

4.3.1 L'Expression de la protéine tyrosine hydroxylase dans le système nerveux central

La TH est l'enzyme responsable de l'étape limitante dans la synthèse de la DA. La figure 4.5 montre l'expression de la protéine TH dans le mésencéphale par analyse d'immunobuvardage de type Western. Une diminution significative du niveau de TH est présente dans ce tissu, ce qui suggère une diminution du nombre de neurones DAergiques, chez les rats des groupes HG comparativement aux rats du groupe contrôle. Cependant,

aucune différence significative n'est observée chez les groupes HG entre eux, un résultat similaire à ce qui a été observé avec la protéine NeuN.

La figure 4.5B présente des coupes de tissus du mésencéphale avec la région spécifique de la SNpc (neurones marquées en brun), analysées par la méthode d'immunohistochimie. Sur ces coupes, la quantité de neurones produisant la TH de la SNpc est diminuée chez les rats des groupes HG comparativement aux rats du groupe contrôle.

La figure 4.6A montre l'expression de la protéine TH dans la région du striatum par analyse d'immunobuvardage de type Western. Une diminution significative de 37% des neurones produisant la TH chez les rats du groupe HG high comparativement aux rats du groupe contrôle. Cette diminution est toutefois moins prononcée que dans le mésencéphale.

La figure 4.6B représente une coupe de tissus du striatum analysée par la méthode d'immunohistochimie. Sur cette coupe, le nombre de neurones produisant la TH, est diminué chez les rats du groupe HG high comparativement aux rats du groupe contrôle.

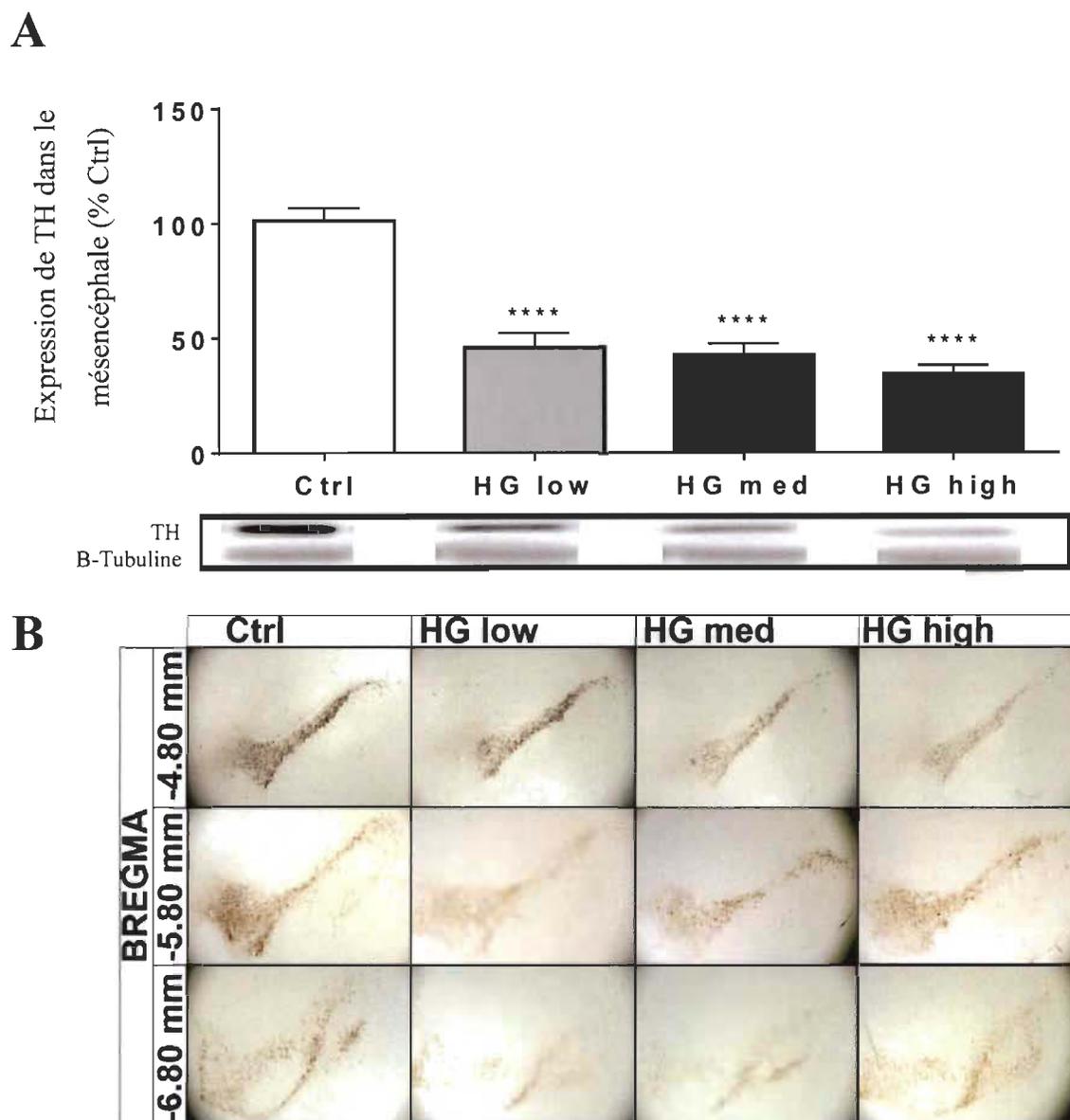


Figure 4.5 Expression du marqueur de neurone dopaminergique, la tyrosine hydroxylase, dans le mésencéphale et dans la substance noire *pars compacta*.

A) Expression relative de TH dans le mésencéphale, exprimée en pourcentage du contrôle (Ctrl), en immunobuvardages de type Western, pour chacun des groupe HG et le groupe Ctrl. *** $P < 0.001$. Aucune différence significative entre chaque groupe HG. B) Immunohistochimie dirigée contre TH à 3 antériorités différentes de la substance noire pour chacun de groupes HG et le groupe CTRL.

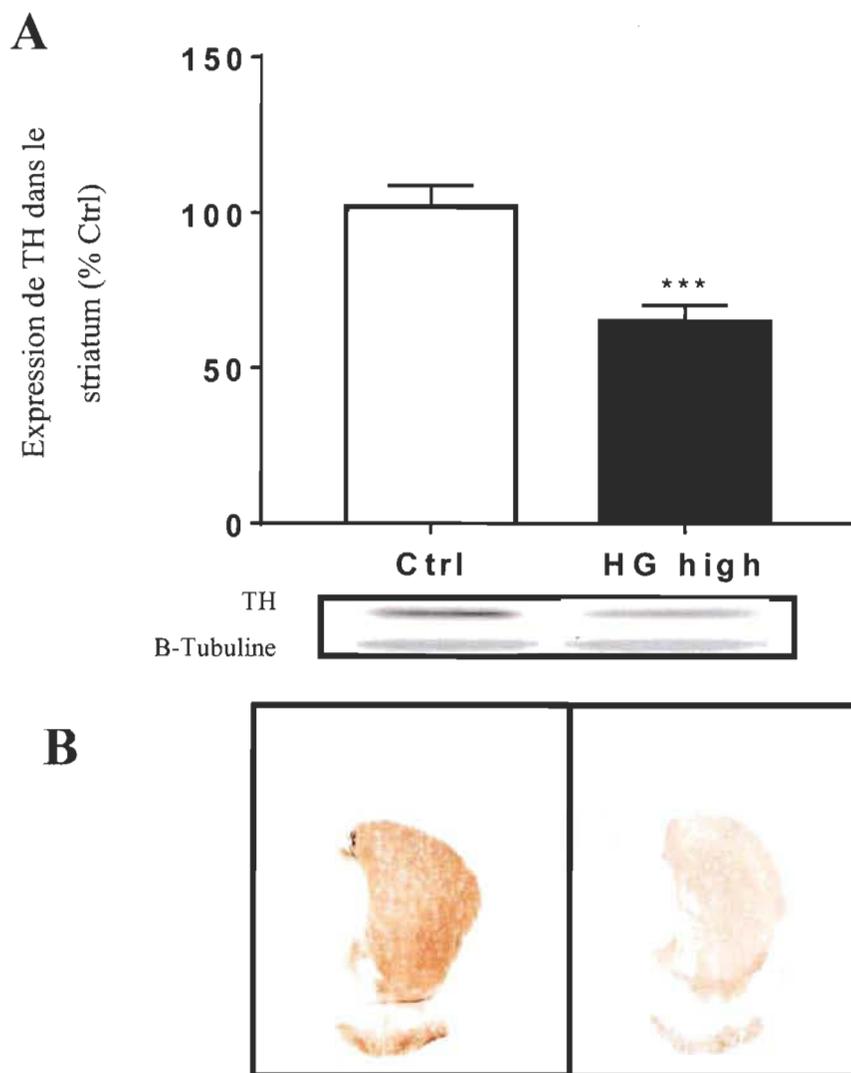


Figure 4.6 Expression du marqueur de neurone dopaminergique TH dans le striatum.

A) Expression relative de TH dans le striatum, exprimée en pourcentage du contrôle (Ctrl), en immunobuvardage de type Western, pour le groupe HG high et le groupe Ctrl. *** $P < 0.001$. B) Immunohistochimie de TH dans le striatum pour le groupe HG high seulement et le groupe Ctrl.

4.3.2 L'Expression de la protéine transporteur de la dopamine dans le système nerveux central

La protéine DAT est le transporteur de la DA et, tout comme la TH, DAT est un marqueur spécifique des neurones DAergiques. L'anticorps dirigé contre cette protéine nous permet de quantifier les neurones DAergiques, et donc, par extrapolation, la mort de ces neurones. La figure 4.7 montre l'expression de DAT dans le mésencéphale, analysée

par immunobuvardage de type Western illustrant une diminution significative de 71% pour HG low, de 66% pour HG med et de 63% pour HG high de ce marqueur dans les tissus des rats des groupes HG comparativement aux rats du groupe contrôle.

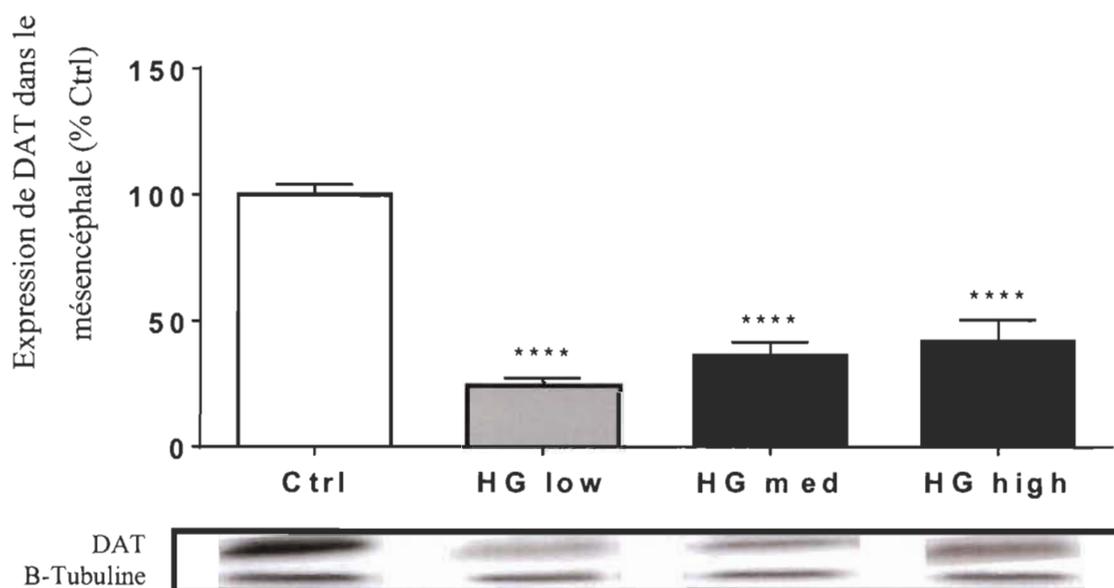


Figure 4.7 Expression du marqueur de neurone dopaminergique, le transporteur de la dopamine, dans le mésencéphale.

Expression relative de DAT dans le mésencéphale, exprimée en pourcentage du contrôle (Ctrl), en immunobuvardage de type Western, pour chacun des groupes HG et le groupe Ctrl. **** P < 0.0001.

La figure 4.8 montre l'expression de la protéine DAT dans le striatum par immunobuvardage de type Western. Une diminution significative de l'expression de ce marqueur DAergique chez les rats du groupe HG high comparativement aux rats du groupe contrôle est notée. Cette diminution est toutefois moins prononcée que celle observée dans le mésencéphale (voir Figure 4.7).

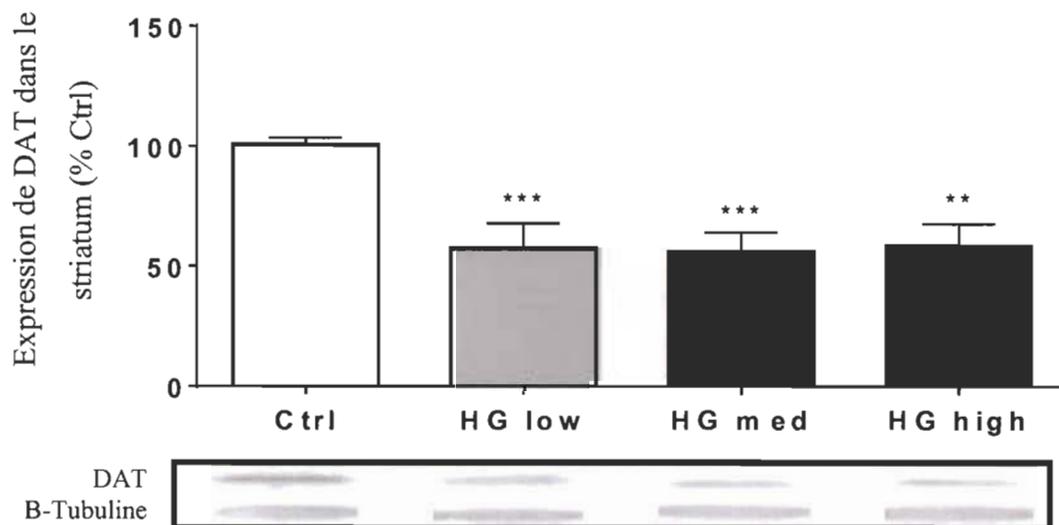


Figure 4.8 Expression du marqueur de neurone dopaminergique, le transporteur de la dopamine, dans le striatum.

Expression relative de DAT dans le striatum, exprimée en pourcentage du groupe contrôle (Ctrl), en immunobuvardage de type Western, pour chacun des groupes HG et le groupe Ctrl., *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$.

4.4 La Coloration par le bleu cuprolinique au niveau du système nerveux entérique

4.4.1 La Coloration des plexus myentériques de l'intestin grêle par le bleu cuprolinique

Le CB se lie à l'ARN des ribosomes contenus dans les corps de Nissl qui sont particulièrement abondants dans les neurones. C'est pourquoi cette coloration est considéré spécifique aux neurones entériques. Ce colorant permet d'observer les plexus myentériques, qui contiennent les neurones responsables de la motricité gastrique, et qui sont en cause dans le symptôme de constipation dans la MP. Les figures 4.9, 4.10 et 4.11 montrent des plexus myentériques et sous-muqueux colorés en bleu avec CB, situés entre la couche musculaire circulaire interne et longitudinale externe.

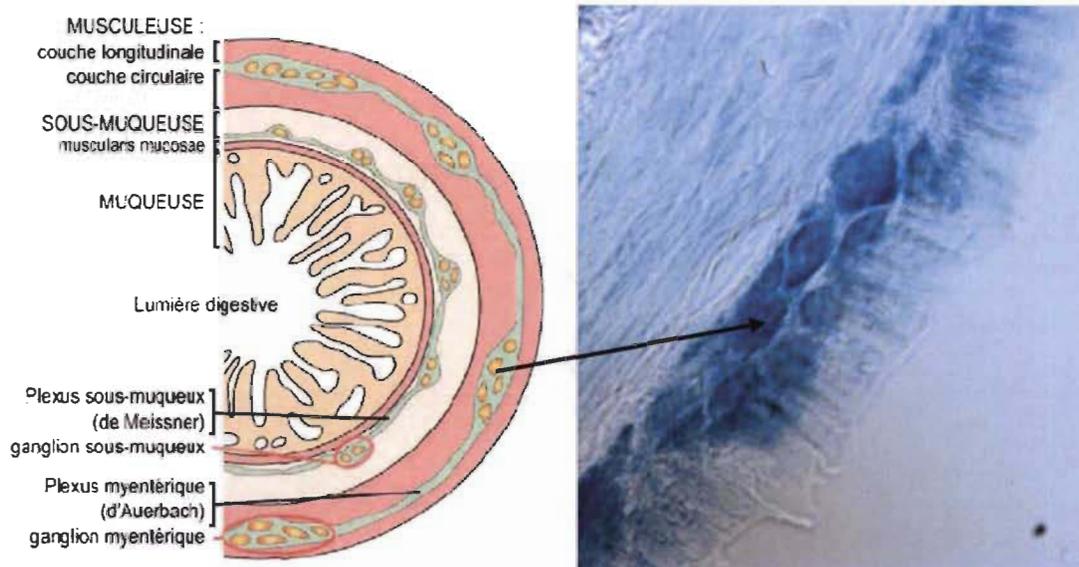


Figure 4.9 Coloration au bleu cuprolinique.

Image d'une coupe au cryostat montrant des neurones d'un plexus myentérique sur une coupe d'intestin grêle au duodénum de rat. Oculaire 10x, objectif 60x. La coloration spécifique du cytoplasme des gros neurones.

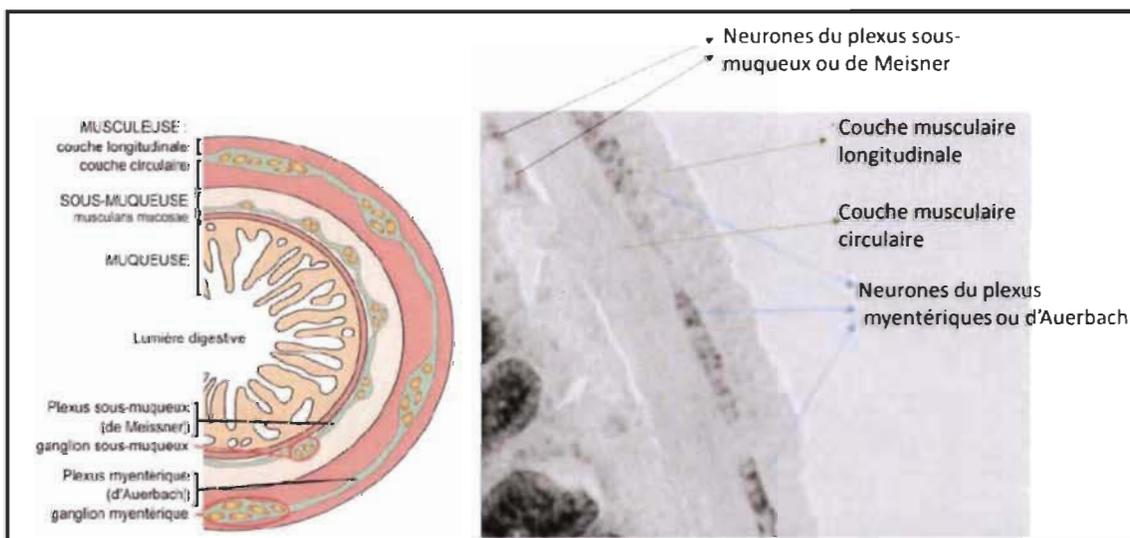


Figure 4.10 Coupe de 20 microns du duodénum de l'intestin grêle.

Coupe 20 microns, cryostat, coloration Blue Cuprolinique, objectif 20X, oculaire 10X. La coloration spécifique du plexus myentérique et du plexus sous-muqueux.

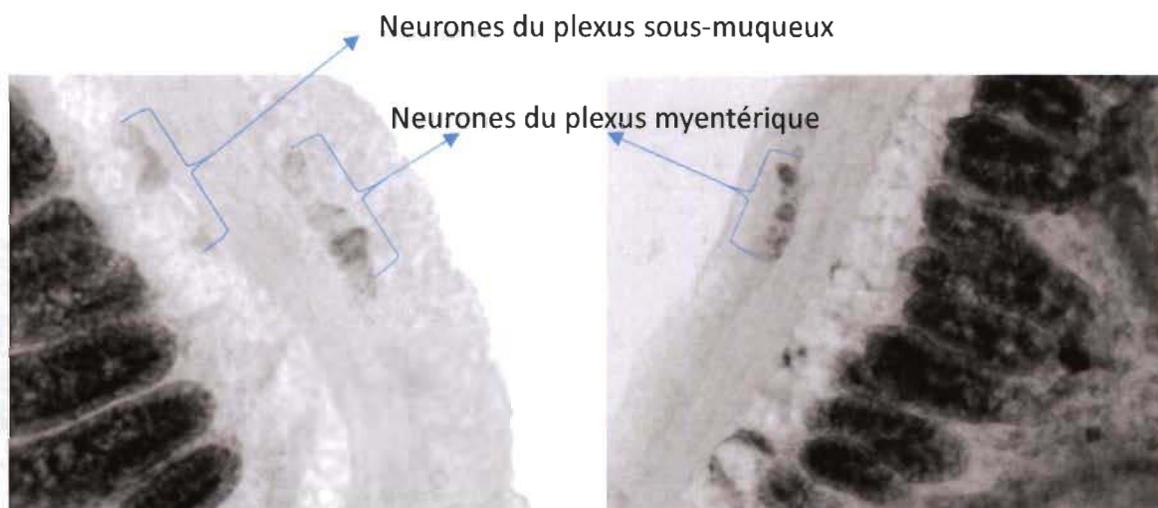


Figure 4.11 Coupe de 50 microns du duodénum de l'intestin grêle.
Coupe 50 microns, cryostat, coloration Blue Cuprolinique, objectif 20X, oculaire 10X. La coloration est spécifique du cytoplasme des gros neurones du plexus myentérique.

4.5 La Détermination de la perte neuronale et modulation dopaminergique dans le système nerveux entérique

4.5.1 L'Expression de marqueurs neuronaux et dopaminergiques dans l'intestin grêle.

Puisque les problèmes de constipation sont un des symptômes importants dans la MP, il est important de vérifier l'effet de l'hyperglycémie sur les neurones DAergiques intestinaux des rats étudiés.

La figure 4.12 montre l'expression de NeuN, dans les intestins, analysée par la méthode d'immunobuvardage de type Western illustre une diminution significative de 71,4% de ce marqueur neuronal dans les tissus des rats du groupe HG high comparativement aux rats du groupe contrôle. Les autres groupes HG feront objets des travaux de recherche d'une autre collègue.

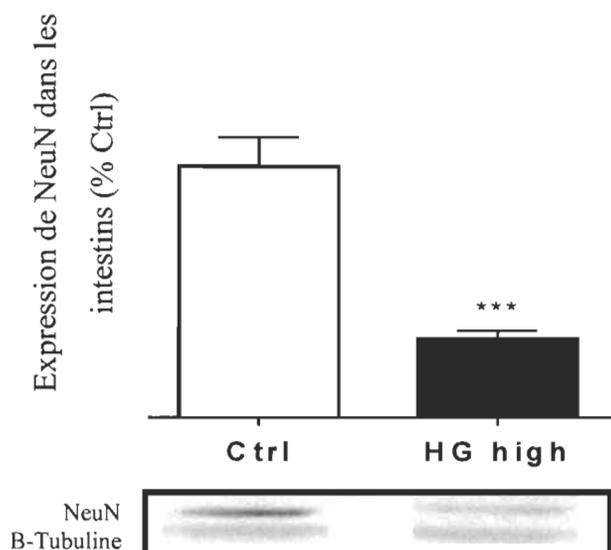


Figure 4.12 Expression du marqueur neuronal NeuN dans les intestins grêles
Expression relative de NeuN dans les intestins grêles exprimée en pourcentage du contrôle (Ctrl), en immunobuvardages de type Western, pour le groupe HG high seulement et le groupe Ctrl. *** P < 0,001.

La figure 4.13 montre l'expression de TH, dans les morceaux d'intestins, analysée par la méthode d'immunobuvardage de type Western, il est possible de constater une augmentation significative de 62 % du marqueur DAergique chez les rats du groupe HG high comparativement aux rats du groupe Ctrl. Pour les besoins de ce mémoire, les résultats obtenus pour les groupes HG low et HG med ne seront pas présentés.

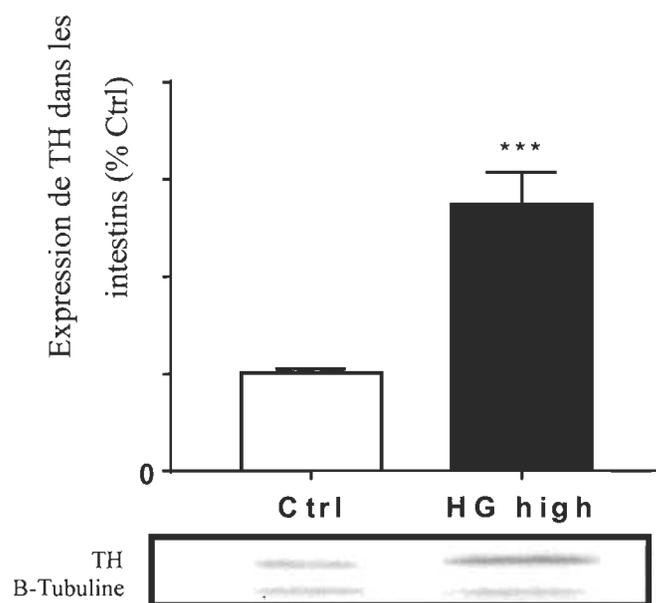


Figure 4.13 Expression du marqueur de neurone dopaminergique, la tyrosine hydroxylase, dans les intestins grêles.

Expression relative de TH dans les intestins grêles exprimée en pourcentage du contrôle (Ctrl), en immunobuvardage de type Western, pour le groupe HG high seulement et le groupe Ctrl. *** $P < 0,001$.

CHAPITRE V

DISCUSSION

Il est estimé à plus de 100 000 le nombre de Canadiens étant atteint de la MP et à plus de 446,8 millions de dollars par année, les dépenses totales associées à cette maladie (Canada 2003). De plus, 85 % des patients sont âgés de plus de 65 ans et ces statistiques grimperont encore dans les prochaines années (Canada 2003), dues à l'augmentation du vieillissement de la population. Il devient donc urgent de développer des traitements pour la maladie de façon à l'enrayer définitivement.

La MP est une maladie neurodégénérative entraînant, entre autres, des tremblements et de la rigidité musculaire lors de l'initiation des mouvements volontaires. Ces symptômes sont causés par la destruction progressive et, à ce jour, inévitable des neurones dopaminergiques de la SNpc, située dans le mésencéphale (Jomova *et al.* 2010; McGill 2016). Les causes exactes de cette mort neuronale sont encore méconnues, mais une des possibilités serait qu'un stress oxydant, engendré, entre autres, par l'hyperglycémie chronique, provoquerait la dégénérescence des neurones DAergiques de cette région. En effet, plusieurs études ont démontré un lien entre le diabète et les maladies neurodégénératives tel que la MP (Cereda *et al.* 2012; Cereda *et al.* 2011; Sun *et al.* 2012; Wahlqvist *et al.* 2012). Il faut dire que la prévalence du diabète chez les parkinsoniens est de 12,5 % contre 8,5 % dans la population générale (Cereda *et al.* 2011). Les traitements existants visent à atténuer les symptômes, mais il n'en existe aucun, à ce jour, capable de guérir la maladie (Marieb *et al.* 2010).

De plus, 50 % de toute la DA du corps humain est retrouvée dans le SNE (Young 2012). La DA sécrétée dans cette région servirait à la motilité intestinale, et il n'est pas rare de constater des cas de constipation chez les patients souffrants de la MP (Edwards *et al.* 1991; Edwards, Quigley, et Pfeiffer 1992). Fait intéressant, une grande proportion de personnes atteintes de la MP développe des symptômes intestinaux bien avant

l'observation de symptômes moteurs centraux (Schapira et al. 2017) C'est pour cette raison que de plus en plus d'études récentes s'intéressent à l'étude détaillée de la modulation de la neurotransmission dans le SNE chez les patients atteints de la MP.

La présente étude visait à caractériser la dégénérescence induite par l'hyperglycémie chronique sur les neurones DAergiques, dans les buts de : 1) documenter la perte neuronale due au stress oxydatif causée par une augmentation du glucose sanguin et 2) ouvrir la voie vers l'élaboration des stratégies de prévention des maladies neurodégénératives, dont l'incidence est élevée chez les patients diabétiques. Puisque notre laboratoire a d'ores et déjà démontré les effets neuroprotecteurs de certaines molécules végétales, comme les polyphénols et les phytoestrogènes, sur des neurones DAergiques en culture (Renaud *et al.* 2014; Bournival *et al.* 2012; Gelinat et Martinoli 2002), l'étape suivante était d'investiguer le pouvoir neuroprotecteur de ces mêmes molécules *in vivo*.

Pour ce faire, nous devons commencer par démontrer que notre modèle animal hyperglycémique développe une neurodégénérescence similaire à celle retrouvée chez les modèles animaux de la MP. Nous avons donc mené des expériences sur des rats hyperglycémiques en détruisant leurs cellules β -pancréatiques, les cellules produisant l'insuline. L'administration de la streptozotocine à des rats a été utilisée afin d'induire une hyperglycémie chronique (tel que décrit au chapitre II), puis à évaluer la possible perte de neurones DAergiques dans les régions cérébrales touchées par la MP, soit la SNpc du mésencéphale, le striatum ainsi que le SNE.

Suite à l'installation de l'hyperglycémie chronique, les animaux ont été divisés selon leur niveau d'atteinte hyperglycémique (HG), permettant ainsi d'obtenir un groupe de rat HG High (niveau d'atteinte HG élevée), un autre groupe HG medium (niveau d'atteinte HG moyenne) et un troisième groupe de rat HG low (niveau d'atteinte HG faible). La classification s'est faite selon différentes caractéristiques qui ont été décrites au chapitre IV.

De plus, tel qu'illustré dans les figures 4.1 et 4.2, les rats du groupe HG ont atteint l'état d'hyperglycémie chronique et ils l'ont maintenu pour toute la durée du protocole expérimentale. En effet, la glycémie des rats HG comparativement à celle des rats du groupe contrôle, est beaucoup plus élevée et ne tend pas à redescendre, signe de la présence de l'hyperglycémie. Aussi, le poids des rats HG cesse de croître normalement comparativement à la courbe représentant celui des rats du groupe contrôle, signe d'un dysfonctionnement métabolique important chez le groupe HG.

Plusieurs études soutiennent le fait que l'hyperglycémie, via des processus de stress oxydant et d'inflammation, peut engendrer des maladies neurodégénératives comme la MP (Morsi et al. 2018, Wijesakara et al. 2017). Le but de ce travail est donc de démontrer que notre modèle animal hyperglycémique a engendré des effets néfastes tels ceux observés dans la MP. L'objectif était d'obtenir un modèle animal qui engendre la MP de façon progressive, ce qui représente le plus la réalité clinique au quotidien. Ultérieurement, ce modèle pourra servir à tester des agents neuroprotecteurs afin de diminuer le taux de maladies neurodégénératives observées chez les patients diabétiques.

Spécifiquement, les objectifs de ces expérimentations étaient de vérifier s'il 1) s'y avait modulation de la quantité de neurones dans le SNC; 2) vérifier s'il y avait modulation de l'expression de la DA au niveau central, plus précisément au niveau de la voie nigro-striée au niveau du mésencéphale et du striatum; 3) vérifier s'il y avait modulation de la quantité de neurones totaux dans le SNC et 4) s'il y avait modulation de l'expression de la DA dans ce modèle expérimentale.

5.1 Vérification de la modulation de la quantité de neurones dans le système nerveux central

La perte neuronale dans le SNC, a été évalué en ciblant l'expression de la protéine NeuN, qui est un marqueur très connu d'identité neuronale et très utilisée (Mullen, Buck, et Smith 1992).

5.1.1 Le NeuN dans le mésencéphale

Les résultats obtenus à la figure 4.3 A du chapitre IV, démontrent que les niveaux d'expression de NeuN sont inférieurs chez les rats HG. En effet, plus les rats montrent un niveau d'hyperglycémie élevée, moins il y a expression de NeuN. Ceci suggère qu'il pourrait y avoir plus de mort neuronale chez les individus où la glycémie est plus élevée. De plus, chaque groupe HG présente une différence significative avec le groupe contrôle. Bien que ces résultats suggèrent une atteinte importante, il faudra toutefois, bien contrôler ces données avec d'autres mesures quantitatives comme l'immunohistochimie.

Les résultats obtenus par la suite en immunohistochimie, et présentés à la figure 4.3B, illustrent une importante diminution du nombre de neurones totaux dans la SNpc chez les rats HG comparativement au groupe contrôle. Ces résultats nous portent à croire que les réactions d'oxydation provoquées par le glucose tel que décrit au chapitre I, section 1.4, induisent une mort non sélective des neurones de la SNpc.

5.1.2 Le NeuN dans le striatum

La figure 4.4 représente des niveaux d'expression de NeuN plus faible chez les rats HG dans le striatum. Par contre, cette différence atteint un seuil significatif entre le groupe de rats HG high comparé aux contrôles. Tandis que les autres groupes de rats, HG med et HG low, montrent une différence moins importante. Ces résultats suggèrent que la perte neuronale au niveau du striatum est différente que dans la SNpc. De plus amples études quantitatives devront être menées dans le futur afin de vérifier cette hypothèse.

5.2 Vérification de la modulation de l'expression de la dopamine dans le système nerveux central

Dans le but d'observer l'expression de la DA, nous avons analysé la protéine TH. Cette enzyme constitue l'étape limitante dans la synthèse de la DA, comme expliqué au Chapitre I. En mesurant son expression, il est possible de déduire les niveaux de DA dans les régions d'intérêt. Ensuite, nous avons aussi observé le transporteur de DA, le DAT, qui est un autre marqueur spécifique des neurones contenant la DA dans les régions analysées.

5.2.1 La Tyrosine hydroxylase dans le mésencéphale

À la figure 4.5, une différence significative entre le groupe contrôle et chacun des groupe HG. En effet, les résultats obtenus en immunobuvardage de type western confirment cette différence. Cependant, les résultats obtenus en immunohistochimie sont moins évidents. En effet, il semble y avoir moins d'expression de TH chez les individus des groupes HG que chez ceux du groupe contrôle. À ce propos, une autre étudiante a débouté le compte précis de neurones marqués et ces résultats seront présentés dans une autre travail de recherche de notre laboratoire.

5.2.2 La Tyrosine hydroxylase dans le striatum

Les résultats d'immunobuvardage de type western de la figure 4.6A, montrent une différence significative entre le groupe HG high comparativement au groupe contrôle. La même observation est illustrée par les résultats d'immunohistochimie sur la figure 4.6B. Pour cette région, l'analyse de TH ne s'est faite que sur le groupe HG high et le groupe contrôle. Des analyses complémentaires sur les échantillons des rats avec hyperglycémie moyenne et faible (HG med et HG low) seront nécessaires dans le futur afin de compléter ces résultats.

5.2.3 Le Transporteur de la dopamine dans le mésencéphale

L'immunobuvardage de type western pour la protéine DAT dans le mésencéphale (Figure 4.7) a mis en évidence une différence significative entre chacun des groupes HG et le groupe contrôle. Par contre, les niveaux d'atteintes HG ne semblent pas corrélés avec les niveaux d'expression de DAT dans le mésencéphale. En effet, il semblerait que plus l'animal est touché par l'hyperglycémie, plus il exprime DAT dans cette région cérébrale. Puisque nous n'avons pas encore fait les expérimentations en immunohistochimie, il vaudrait donc mieux attendre avant de tirer des conclusions trop hâtives.

5.2.4 Le Transporteur de la dopamine dans le striatum

Les résultats d'immunobuvardage de type western de la figure 4.8, montrent une différence significative de l'expression du marqueur neuronal DAT pour chacun des groupes HG, comparativement au groupe contrôle. Par contre, ces résultats ne semblent pas être directement corrélés avec le niveau d'atteinte HG. En effet, selon nos résultats, tous les animaux HG, qu'ils soient « low », « med » ou « high », expriment le même niveau de DAT dans le striatum. Encore une fois, l'analyse n'a pas encore été réalisée en immunohistochimie, donc il est prématuré de justifier ces résultats.

En résumé, la diminution du marqueur NeuN chez les animaux HG démontre une mort neuronale dans les régions analysées comparativement au groupe contrôle. Ces régions sont celles touchées par la dégénérescence dans la MP (Dauer and Przedborski 2003). De plus, nos résultats montrent que cette mort neuronale est plus marquée au niveau de la SNpc du mésencéphale que dans le striatum. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les neurones de la voie nigro-striée, celle qui contrôle les mouvements dans la MP, qui contient la DA, ne fassent que terminer leur parcours dans le striatum. Il n'y a que les terminaisons axonales de ces neurones qui arrivent au striatum. Donc il serait possible que la disparition neuronale soit en réalité spécifique aux neurones DA puisque la SNpc contient beaucoup de corps neuronaux à DA, mais pas le striatum. De plus, dans ces deux régions du cerveau, une diminution de l'expression des marqueurs TH et DAT, marqueurs de neurones DAergiques, est présente chez les sujets HG comparativement au

groupe contrôle. La mort des neurones DAergiques dans la voie nigro-striée est justement ce qui caractérise la MP.

A priori, le modèle animal HG que nous avons analysé pourrait reproduire en partie les caractéristiques de la MP, il pourrait aussi être utilisé ultérieurement comme modèle animal dans le but de tester des agents neuroprotecteurs. Bien entendu, des études subséquentes sont nécessaires avant de tirer une telle conclusion, mais les résultats préliminaires de ce mémoire sont encourageants.

5.3 Vérification de la modulation de la quantité de neurones dans le système nerveux entérique

En parallèle, un autre objectif de ce projet de maîtrise était d'analyser le SNE des rats HG et contrôles afin de vérifier si l'hyperglycémie pouvait moduler l'expression de la neurotransmission dans les plexus myentérique et sous muqueux du SNE (fig. 1.23). Il est documenté la présence de troubles de la motilité intestinale chez les patients atteints de la MP, comme la constipation, par exemple (Shapira et al. 2017). Nous voulions donc savoir si notre modèle animal HG pouvait aussi reproduire des effets néfastes observés au niveau du SNC, dans ce système. Nous savions que l'hyperglycémie pouvait causer des troubles de motilité intestinale comme les diarrhées, telles que reportées chez les patients diabétiques (Zawada et al. 2018). Donc, à priori, notre modèle de rat HG ne semblait pas tout à fait correspondre à un modèle parkinsonien. Il est toutefois intéressant de caractériser comment l'hyperglycémie chronique affecte le contrôle entérique de la motilité intestinale.

5.3.1 Le NeuN dans l'intestin grêle

Pour la section du système digestif appelée « intestine grêle », là où la majorité de l'absorption alimentaire se fait, le marqueur neuronal NeuN a été analysé seulement pour le groupe contrôle et le groupe HG high. Les résultats préliminaires en immunobuvardage de type western montrent une différence significative entre les deux groupes

(Figure 4.12); spécifiquement, une plus grande mort neuronale générale (71.4% comparée au contrôles) dans les intestins chez les animaux HG.

5.4 Vérification de la modulation de l'expression de la dopamine dans le système nerveux entérique

5.4.1 La Tyrosine hydroxylase dans l'intestin grêle

Les résultats préliminaires pour le marqueur TH dans le SNE en immunobuvardage de type western dévoilent une forte augmentation de l'expression de TH (62%) chez les groupe HG high comparativement au groupe contrôle (Figure 4.13). Une des explications possibles serait qu'une augmentation des niveaux de TH provoquerait une inhibition de la motilité intestinale, probablement via le récepteur D2 (Zhu *et al.* 2012). (Anlauf 2003 et Noorian 2011). Le ralentissement de la motilité intestinale serait la cause de la constipation observée chez plusieurs rats hyperglycémiques (observation expérimentale des techniciennes de l'animalerie à l'UQTR et quantifiée dans une autre thèse de notre laboratoire). De plus, il n'est pas rare de constater des troubles de la motilité intestinale chez les patients atteints de la MP, comme la constipation, par exemple. Des analyses subséquentes seront nécessaires afin de répertorier les différents marqueurs dans les différentes zones du système digestif.

En résumé, la neurodégénérescence est présente dans le SNE chez le modèle HG, mais il est nécessaire de l'étudier plus en détail. Par ailleurs, il faudra vérifier les résultats en immunofluorescence ou immunocytochimie. Il faudra aussi procéder à la localisation des neurones entériques précise dans le duodénum et dans le gros intestin. Il faudra aussi ajouter d'autres marqueurs neuronaux de motilité intestinale, par exemple le marqueur ChAT (neurones à acétylcholine) et le marqueur nNOS (neurones produisant le NO). Ces deux types de neurones ont des effets excitateurs et inhibiteurs, respectivement, sur la motilité du système digestif (Sanders 2016). Il serait donc intéressant de caractériser s'ils sont affectés dans une situation d'hyperglycémie. À long terme, il faudra aussi déterminer le rôle de la neuroinflammation dans les dommages induits par l'hyperglycémie, que ce soit dans le SNC ou le SNE.

CHAPITRE VI

CONCLUSION

Lors de ce travail de recherche, j'ai démontré que le modèle de rat HG présentait des caractéristiques de la MP. Puisque c'était la première fois qu'un modèle d'hyperglycémie chronique était utilisé pour caractériser la neurodégénérescence, il y a fallu faire beaucoup de mise au point technique en partie reportée dans le chapitre II de ce mémoire. Ce modèle montrait en effet une dégénérescence neuronale au niveau du SNC, ainsi qu'une dégénérescence plus spécifique de type DAergique. De plus, la voie nigro-striée, qui est affectée dans la MP, présentait une importante neurodégénérescence, démontrée par des résultats en immunobuvardage de type western ainsi qu'en immunohistochimie. Ces résultats sont concluants et démontrent bien une dégénérescence importante dans certaines régions de la voie nigro-striée contenant la DA. D'autres expériences sont en cours pour comparer cette dégénérescence de la voie nigro-striée avec celle, possible, de la voie méso-cortico-limbique, elle aussi contenant la DA comme neurotransmetteur principale.

Le SNE serait aussi touché dans ce modèle animal. Il y aurait en effet une dégénérescence neuronale dans les intestins, démontrée par des résultats d'immunobuvardage de type Western illustrés à la fig. 4.12 qui montrent une baisse importante du marqueur neuronal NeuN. Cependant, l'activité DAergique semble être en augmentation dans cette même région, tel qu'illustré par une augmentation de l'expression du marqueur TH, à la fig. 4.13. Ceci nous semble plutôt paradoxale et il faudra des analyses plus précises en immunohistochimie. Il faudrait aussi cibler les récepteurs DAergiques, comme le récepteur D1 et D2, pour mieux comprendre l'action de la DA dans le SNE en général avant de conclure.

À ce propos, il serait intéressant d'évaluer la modulation des neurotransmetteurs par l'hyperglycémie dans des régions spécifiques du système digestif; par exemple, le

duodénum, le cæcum ou le côlon, afin de vérifier si les dommages neurologiques s'étendent sur tout le long du tube digestif. De plus, d'autres analyses peuvent aussi être réalisées comme l'immunofluorescence ou l'immunocytochimie en méthode « whole mount ». Ces techniques devront être mises au point dans le futur de façon spécifique sur le tissu intestinal. Finalement, d'autres marqueurs devront aussi être mesurés comme ChAT, afin d'observer les neurones cholinergiques, ainsi que nNOS, pour observer les neurones synthétisant le NO. En effet, ces deux types de neurones ont d'importants effets sur la motilité du système digestif, tel que mentionné à la sous-section 1.5.1.

Ce projet de maîtrise a mis en évidence l'importance de développer un nouveau modèle animal hyperglycémique pouvant reproduire des caractéristiques neuropathologiques de la MP, afin de supporter les études futures sur les polyphénols et phytoestrogènes naturels comme agents neuroprotecteurs dans cette maladie. En effet, si ces molécules sont aussi efficaces que nous le pensons, nous pourrions ralentir l'apparition des symptômes de la MP chez les patients diabétiques ou souffrant de désordres métaboliques liés à l'hyperglycémie.

Il était donc important de démontrer que notre modèle animal hyperglycémique est caractérisé par la dégénérescence neuronale au niveau DAergique. Dans un second temps, nous devons tester les polyphénols et phytoestrogènes, qui ont un potentiel neuroprotecteur déjà démontré sur des modèles cellulaires, sur ce modèle animal particulier, dans le but de démontrer leur capacité neuroprotectrice *in vivo*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Achour, Imène. 2015. 'Les propriétés neuroprotectrices et autophagiques de l'oleuropéine sur des neurones dopaminergiques soumis à un stress oxydatif', Université du Québec à Trois-Rivières.
- Aluyen, Julia Khristine, Quynhanh N Ton, Thuytram Tran, Alice E Yang, Helmut B Gottlieb, and Renee A Bellanger. 2012. 'Resveratrol: potential as anticancer agent', *Journal of dietary supplements*, 9: 45-56.
- Anderson, Grant, Ali Reza Noorian, Georgia Taylor, Mallappa Anitha, Doug Bernhard, Shanthi Srinivasan, and James G Greene. 2007. 'Loss of enteric dopaminergic neurons and associated changes in colon motility in an MPTP mouse model of Parkinson's disease', *Experimental Neurology*, 207: 4-12.
- Anlauf, Martin, Martin K-H Schäfer, Lee Eiden, and Eberhard Weihe. 2003. 'Chemical coding of the human gastrointestinal nervous system: cholinergic, VIPergic, and catecholaminergic phenotypes', *Journal of Comparative Neurology*, 459: 90-111.
- Aragno, Manuela, and Raffaella Mastrocola. 2017. 'Dietary Sugars and Endogenous Formation of Advanced Glycation Endproducts: Emerging Mechanisms of Disease', *Nutrients*, 9: 385.
- Arel-Dubeau, Anne-Marie, Fanny Longpré, Julie Bournival, Cindy Tremblay, Julie Demers-Lamarche, Pavlina Haskova, Everaldo Attard, Marc Germain, and Maria-Grazia Martinoli. 2014. 'Cucurbitacin E has neuroprotective properties and autophagic modulating activities on dopaminergic neurons', *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014.
- Arias-Carrion, Oscar, Xanic Caraza-Santiago, Sergio Salgado-Licon, Mohamed Salama, Sergio Machado, Antonio Nardi, Manuel Menéndez González, and Eric Murillo-Rodríguez. 2014. Orquestic Regulation of Neurotransmitters on Reward-Seeking behavior. *Int Arch Med*, 7:29.
- Arthur, JR. 2001. 'The glutathione peroxidases', *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 57: 1825-35.
- Badole SL, Chaudhari SM, Jangam GB, Kandhare AD, Bodhankar SL. 2015. Cardioprotective Activity of Pongamia pinnata in Streptozotocin-Nicotinamide Induced Diabetic Rats. *Biomed Res Int*, 2015:403291.

- Balaban, Robert S, Shino Nemoto, and Toren Finkel. 2005. 'Mitochondria, oxidants, and aging', *Cell*, 120: 483-95.
- Baldi, I, S Cordier, X Coumoul, A Elbaz, L Gamet-Payraastre, P Le Bailly, L Multigner, R Rahmani, J Spinosi, and G Van Maele-Fabry. 2013. 'Pesticides: effets sur la santé', *INSERM, Institut national de la santé et de la recherche médicale, Paris*.
- Banerjee, R. Beal, M. F. Thomas, B. 2010. 'Autophagy in neurodegenerative disorders: pathogenic roles and therapeutic implications', *Trends Neurosci*, 33: 541-9.
- Barbeau, André. 1960. 'Preliminary observations on abnormal catecholamine metabolism in basal ganglia diseases', *Neurology*, 10: 446-51.
- Barrenschee, Martina, Dimitri Zorenkov, Martina Böttner, Christina Lange, François Cossais, Amelie Bernadette Scharf, Günther Deuschl, Susanne A Schneider, Mark Ellrichmann, and Annette Fritscher-Ravens. 2017. 'Distinct pattern of enteric phospho-alpha-synuclein aggregates and gene expression profiles in patients with Parkinson's disease', *Acta neuropathologica communications*, 5: 1.
- Baynes, John W, and Suzanne R Thorpe. 1999. 'Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm', *Diabetes*, 48: 1-9.
- Beach, Thomas G, Charles H Adler, Lucia I Sue, Linda Vedders, LihFen Lue, Charles L White III, Haru Akiyama, John N Caviness, Holly A Shill, and Marwan N Sabbagh. 2010. 'Multi-organ distribution of phosphorylated α -synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders', *Acta neuropathologica*, 119: 689-702.
- Bear, Mark F, Barry W Connors, and Michael A Paradiso. 2016. 'Neurosciences (4^e édition): A la découverte du cerveau'.
- Beck, Martin, Anne Schlabrakowski, Falk Schrödl, Winfried Neuhuber, and Axel Brehmer. 2009. 'ChAT and NOS in human myenteric neurons: co-existence and co-absence', *Cell and tissue research*, 338: 37.
- Bell, Graeme I, Toshiaki Kayano, John B Buse, Charles F Burant, Jun Takeda, Denis Lin, Hirofumi Fukumoto, and Susumu Seino. 1990. 'Molecular biology of mammalian glucose transporters', *Diabetes care*, 13: 198-208.
- Bender, A., Krishnan, K. J., Morris, C. M., Taylor, G. A., Reeve, A. K., Perry, R. H., Jaros, E., Hersheson, J. S., Betts, J., Klopstock, T., Taylor, R. W., Turnbull, D. M. 2006. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat. Genet.*, 38, 515–517.

- Bender, A., Schwarzkopf, R. M., McMillan, A., Krishnan, K. J., Rieder, G., Neumann, M., Elstner, M., Turnbull, D. M., Klopstock, T. 2008. Dopaminergic midbrain neurons are the prime target for mitochondrial DNA deletions. *J. Neurol.*, 255, 1231–1235.
- Bloch, A, A Probst, H Bissig, H Adams, and M Tolnay. 2006. ' α -Synuclein pathology of the spinal and peripheral autonomic nervous system in neurologically unimpaired elderly subjects', *Neuropathology and applied neurobiology*, 32: 284-95.
- Bonnefont-Rousselot, Dominique. 2002. 'Glucose and reactive oxygen species', *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 5: 561-68.
- Boulanger, E, Ph Dequiedt, and JL Wautier. 2001. 'Advanced glycosylation end products (AGE): new toxins?', *Nephrologie*, 23: 351-59.
- Bournival, Julie, Marc-André Francoeur, Justine Renaud, and Maria-Grazia Martinoli. 2012. 'Quercetin and sesamin protect neuronal PC12 cells from high-glucose-induced oxidation, nitrosative stress, and apoptosis', *Rejuvenation research*, 15: 322-33.
- Bournival, Julie, Patrik Quessy, and Maria-Grazia Martinoli. 2009. 'Protective effects of resveratrol and quercetin against MPP⁺-induced oxidative stress act by modulating markers of apoptotic death in dopaminergic neurons', *Cellular and molecular neurobiology*, 29: 1169-80.
- Braak, Heiko, Rob AI de Vos, Jürgen Bohl, and Kelly Del Tredici. 2006. 'Gastric α -synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology', *Neuroscience letters*, 396: 67-72.
- Brissaud, E. 1895. "Leçon sur les maladies nerveuses." In. H. Meige: Paris: Masson.
- Broussolle, Emmanuel, Teodor Danaila, Chloé Laurencin, Émilien Bernard, Léon Tremblay, Véronique Sgambato-Faure, and Stéphane Thobois. 2016. 'Évolution des idées sur les signes moteurs et psychiques de la maladie de Parkinson de 1817 à 1926', *Revue Neurologique*, 172, Supplement 1: A155.
- Brown, RG, M Jahanshahi, N Quinn, and CD Marsden. 1990. 'Sexual function in patients with Parkinson's disease and their partners', *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 53: 480-86.
- Bussell, Robert, and David Eliezer. 2001. 'Residual structure and dynamics in Parkinson's disease-associated mutants of α -synuclein', *Journal of Biological Chemistry*, 276: 45996-6003.

- Cacabelos, Ramón. 2017. 'Parkinson's disease: From pathogenesis to pharmacogenomics', *International journal of molecular sciences*, 18: 551.
- Canada, Santé Canada et Société Parkinson. 2003. "La maladie de Parkinson : ses répercussions sociales et économiques." In, edited by Santé Canada.
- Canada, société Parkinson. 2014. "Ces Héros qui nous inspirent, Rapport annuel 2014." In.
- Carlsson, Arvid, Margit Lindqvist, Tor Magnusson, and Bertil Waldeck. 1958. 'On the presence of 3-hydroxytyramine in brain', *Science*, 127: 471-71.
- Castro, A, F Valldeoriola, G Linazasoro, MC Rodriguez-Oroz, F Stochi, C Marin, M Rodriguez, J Vaamonde, P Jenner, and L Alvarez. 2005. 'Optimization of use of levodopa in Parkinson's disease: role of levodopa-carbidopa-entacapone combination', *Neurologia (Barcelona, Spain)*, 20: 180-88.
- Caudle, W. M. 2015. 'Occupational exposures and parkinsonism', *Handb Clin Neurol*, 131: 225-39.
- Cereda, E, M Barichella, E Cassani, R Caccialanza, and G Pezzoli. 2012. 'Clinical features of Parkinson disease when onset of diabetes came first A case-control study', *Neurology*, 78: 1507-11.
- Cereda, Emanuele, Michela Barichella, Carlo Pedrolli, Catherine Klersy, Erica Cassani, Riccardo Caccialanza, and Gianni Pezzoli. 2011. 'Diabetes and Risk of Parkinson's Disease A systematic review and meta-analysis', *Diabetes care*, 34: 2614-23.
- Chaumette, T, T Lebouvier, P Aubert, B Lardeux, C Qin, Q Li, D Accary, E Bezard, S Bruley des Varannes, and P Derkinderen. 2009. 'Neurochemical plasticity in the enteric nervous system of a primate animal model of experimental Parkinsonism', *Neurogastroenterology & Motility*, 21: 215-22.
- Chen, X. L., Y. Y. Xiong, G. L. Xu, and X. F. Liu. 2013. 'Deep Brain Stimulation', *Interventional Neurology*, 1: 200-12.
- Chen, X. L., Y. Y. Xiong, G. L. Xu and X. F. Liu. 2013. 'Deep brain stimulation', *Interv Neurol*, 1: 200-12.
- Chiarelli, F., and A. Mohn. 2002. 'Angiopathy in children with diabetes', *Minerva Pediatr*, 54: 187-201.

- Cohen, Margo Panush. 2012. *Diabetes and protein glycosylation: measurement and biologic relevance* (Springer Science & Business Media).
- Cosson, E. 2010. 'Critères diagnostiques du diabète gestationnel', *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*, 39: S239-S50.
- Dauer, William, and Serge Przedborski. 2003. 'Parkinson's disease: mechanisms and models', *Neuron*, 39: 889-909.
- Davis, Glenn C, Adrian C Williams, Sanford P Markey, Michael H Ebert, Eric D Caine, Cheryl M Reichert, and Irwin J Kopin. 1979. 'Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues', *Psychiatry research*, 1: 249-54.
- Day, James F, Suzanne R Thorpe, and John W Baynes. 1979. 'Nonenzymatically glucosylated albumin. In vitro preparation and isolation from normal human serum', *Journal of Biological Chemistry*, 254: 595-97.
- De Lau, Lonneke ML, and Monique MB Breteler. 2006. 'Epidemiology of Parkinson's disease', *The Lancet Neurology*, 5: 525-35.
- De Rijk, MC, LJ Launer, K Berger, MMB Breteler, JF Dartigues, M Baldereschi, L Fratiglioni, A Lobo, J Martinez-Lage, and C Trenkwalder. 2000. 'Neurologic Dis Elderly Res Grp. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: a collaborative study of population-based cohorts', *Neurology*, 54: S21-S23.
- Defebvre, L. Marc Vérin. 2011. *La maladie de Parkinson 2e édition*.
- Defebvre, Luc, and Marc Vérin. 2011. *La maladie de Parkinson* (Elsevier Masson).
- Degenhardt, TP, SR Thorpe, and JW Baynes. 1998. 'Chemical modification of proteins by methylglyoxal', *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 44: 1139-45.
- Delattre, J, D Bonnefont-Rousselot, M Bordas-Fonfrède, and M Jaudon. 1999. "Diabetes mellitus and oxidative stress." In *Annales de biologie clinique*, 437.
- Di Domenico, Fabio, Antonella Tramutola, and D Allan Butterfield. 2016. 'Role of 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in the pathogenesis of alzheimer disease and other selected age-related neurodegenerative disorders', *Free Radical Biology and Medicine*.
- Fédération internationale du diabète. 2017. *Atlas du Diabète de la FID*. 8^e édition. pp. 150.

- Djang, David SW, Marcel JR Janssen, Nicolaas Bohnen, Jan Booij, Theodore A Henderson, Karl Herholz, Satoshi Minoshima, Christopher C Rowe, Osama Sabri, and John Seibyl. 2012. 'SNM practice guideline for dopamine transporter imaging with 123I-ioflupane SPECT 1.0', *Journal of Nuclear Medicine*, 53: 154-63.
- Drew, Barry, and Christiaan Leeuwenburgh. 2002. 'Aging and the role of reactive nitrogen species', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 959: 66-81.
- Edwards, LL, RF Pfeiffer, EMM Quigley, Ruth Hofman, and Mary Balluff. 1991. 'Gastrointestinal symptoms in Parkinson's disease', *Movement Disorders*, 6: 151-56.
- Edwards, Lorraine L, Eamonn Martin Quigley, and Ronald F Pfeiffer. 1992. 'Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease: frequency and pathophysiology', *Neurology*, 42: 726-32.
- Elbaz, Alexis, James H Bower, Brett J Peterson, Demetrius M Maraganore, Shannon K McDonnell, J Eric Ahlskog, Daniel J Schaid, and Walter A Rocca. 2003. 'Survival study of Parkinson disease in Olmsted county, Minnesota', *Archives of neurology*, 60: 91-96.
- Emre, Murat, Dag Aarsland, Alberto Albanese, E Jane Byrne, Günther Deuschl, Peter P De Deyn, Franck Durif, Jaime Kulisevsky, Teus van Laar, and Andrew Lees. 2004. 'Rivastigmine for dementia associated with Parkinson's disease', *New England Journal of Medicine*, 351: 2509-18.
- ENVIGO. <http://www.envigo.com/resources/data-sheets/94045.pdf>.
- Esposito, Ennio, Domenico Rotilio, Vincenzo Di Matteo, Camillo Di Giulio, Marisa Cacchio, and Sergio Algeri. 2002. 'A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes', *Neurobiology of aging*, 23: 719-35.
- American Diabetes Association. 2012. 'Executive Summary: Standards of Medical Care in Diabetes—2012'. *Diabetes Care*, 35: S4-S10.
- Fang, Yun-Zhong, Sheng Yang, and Guoyao Wu. 2002. 'Free radicals, antioxidants, and nutrition', *Nutrition*, 18: 872-79.
- Favier, A. 2006. 'Stress oxydant et pathologies humaines', *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 64: 390-96.
- Furness, JB. 2000. 'Types of neurons in the enteric nervous system', *Journal of the autonomic nervous system*, 81: 87-96.

- Furness, John B. 2006. 'Novel gut afferents: Intrinsic afferent neurons and intestinofugal neurons', *Autonomic Neuroscience*, 125: 81-85.
- Gélinas, Sylvie, Geneviève Bureau, Barbara Valastro, Guy Massicotte, Francesca Cicchetti, Keith Chiasson, Benoît Gagne, Julie Blanchet, and Maria-Grazia Martinoli. 2004. 'Alpha and beta estradiol protect neuronal but not native PC12 cells from paraquat-induced oxidative stress', *Neurotoxicity research*, 6: 141-48.
- Gélinas, Sylvie, and Maria-Grazia Martinoli. 2002. 'Neuroprotective effect of estradiol and phytoestrogens on MPP+-induced cytotoxicity in neuronal PC12 cells', *Journal of Neuroscience Research*, 70: 90-96.
- Gélinas, Sylvie, and Maria-Grazia Martinoli. 2002. 'Neuroprotective effect of estradiol and phytoestrogens on MPP+-induced cytotoxicity in neuronal PC12 cells', *Journal of Neuroscience Research*, 70: 90-96.
- Gershon, Michael D. 2005. 'Nerves, reflexes, and the enteric nervous system: pathogenesis of the irritable bowel syndrome', *Journal of clinical gastroenterology*, 39: S184-S93.
- Ghafourifar, Pedram, and Christoph Richter. 1997. 'Nitric oxide synthase activity in mitochondria', *FEBS letters*, 418: 291-96.
- Gilgun-Sherki, Yossi, Eldad Melamed, and Daniel Offen. 2001. 'Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier', *Neuropharmacology*, 40: 959-75.
- Gille, G, W-D Rausch, S-T Hung, R Moldzio, B Janetzky, HP Hundemer, T Kolter, and H Reichmann. 2002. 'Pergolide protects dopaminergic neurons in primary culture under stress conditions', *Journal of neural transmission*, 109: 633-43.
- Gille, G, W-D Rausch, S-T Hung, R Moldzio, A Ngyuen, B Janetzky, A Engfer, and H Reichmann. 2002. 'Protection of dopaminergic neurons in primary culture by lisuride', *Journal of neural transmission*, 109: 157-69.
- Gillery, P. 2005. "Oxidative stress and protein glycation in diabetes mellitus." In *Annales de biologie clinique*, 309-14.
- Goetz, Christopher G. 2011. 'The History of Parkinson's Disease: Early Clinical Descriptions and Neurological Therapies', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*., 1: a008862.

- Gowers, W.R. 1893. *A Manual of Diseases of the Nervous System*. London : J. & A. Churchill.
- Graham, D. G. 1978. 'Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones', *Molecular pharmacology*, 14: 633-43.
- Haan, Claude, and Iris Behrmann. 2007. 'A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background', *Journal of immunological methods*, 318: 11-19.
- Halliwell, Barry. 2006. 'Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?', *Journal of neurochemistry*, 97: 1634-58.
- Halliwell, Barry, and John MC Gutteridge. 1986. 'Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts', *Archives of biochemistry and biophysics*, 246: 501-14.
- Hansen, Mark Berner. 2003. 'The enteric nervous system I: organisation and classification', *Pharmacology & toxicology*, 92: 105-13.
- Hemalatha, S, and M Raghunath. 2004. 'Dietary sesame (Sesamum indicum cultivar Linn) oil inhibits iron-induced oxidative stress in rats', *British journal of nutrition*, 92: 581-87.
- Hennebelle, T., 2006. 'Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants: Marrubium peregrinum, Ballota larendana, Ballota pseudodictamnus (Lamiacées) et Lippia alba (Verbénacées)', Édads. Université Lille1 - Sciences et Technologies.
- Hirata, Fumihiko, Kazuyuki Fujita, Yoshiyuki Ishikura, Kazuaki Hosoda, Toshitsugu Ishikawa, and Haruo Nakamura. 1996. 'Hypocholesterolemic effect of sesame lignan in humans', *Atherosclerosis*, 122: 135-36.
- Holst, M. C., and T. L. Powley. 1995. 'Cuprolinic blue (quinolinic phthalocyanine) counterstaining of enteric neurons for peroxidase immunocytochemistry', *J Neurosci Methods*, 62: 121-7.
- Hu, Gang, Pekka Jousilahti, Siamak Bidel, Riitta Antikainen, and Jaakko Tuomilehto. 2007. 'Type 2 diabetes and the risk of Parkinson's disease', *Diabetes care*, 30: 842-47.
- Jenner, P. 1991. Oxidative stress as a cause of Parkinson's disease. *Acta Neurol. Scand. Suppl.*, 136, 6-15.

- Jomova, K., D. Vondrakova, M. Lawson, and M. Valko. 2010. 'Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders', *Mol Cell Biochem*, 345: 91-104.
- Kaakkola, Seppo. 2000. 'Clinical pharmacology, therapeutic use and potential of COMT inhibitors in Parkinson's disease', *Drugs*, 59: 1233-50.
- Kannan, Krishnaswamy, and Sushil K Jain. 2000. 'Oxidative stress and apoptosis', *Pathophysiology*, 7: 153-63.
- Katzenschlager, R, A Evans, A Manson, PN Patsalos, N Ratnaraj, H Watt, L Timmermann, R Van der Giessen, and AJ Lees. 2004. 'Mucuna pruriens in Parkinson's disease: a double blind clinical and pharmacological study', *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 75: 1672-77.
- Kazlauskaitė, Agnė, and Miratul MK Muqit. 2015. 'PINK1 and Parkin-mitochondrial interplay between phosphorylation and ubiquitylation in Parkinson's disease', *The FEBS journal*, 282: 215-23.
- Kitada, Tohru, Shuichi Asakawa, Nobutaka Hattori, Hiroto Matsumine, Yasuhiro Yamamura, Shinsei Minoshima, Masayuki Yokochi, Yoshikuni Mizuno, and Nobuyoshi Shimizu. 1998. 'Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism', *Nature*, 392: 605-08.
- Koeppen, Bruce M, and Bruce A Stanton. 2010. "Berne and Levy Physiology", 6th ed.
- Krishna, Surabhi Venkata Satya, Sunil K Kota, and Kirtikumar D Modi. 2013. 'Glycemic variability: clinical implications', *Indian journal of endocrinology and metabolism*, 17: 611.
- Laatikainen, Linda M, Trevor Sharp, Paul J Harrison, and Elizabeth M Tunbridge. 2013. 'Sexually dimorphic effects of catechol-O-methyltransferase (COMT) inhibition on dopamine metabolism in multiple brain regions', *PloS one*, 8: e61839.
- Landis, Gary N, and John Tower. 2005. 'Superoxide dismutase evolution and life span regulation', *Mechanisms of ageing and development*, 126: 365-79.
- Langston, J. W., P. Ballard, J. W. Tetrud, and I. Irwin. 1983. 'Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis', *Science*, 219: 979-80.
- Lee, Chun-Chung, Pey-Rong Chen, Shankung Lin, Shiow-Chwen Tsai, Bao-Wei Wang, Wei-Wen Chen, Chingmin E Tsai, and Kou-Gi Shyu. 2004. 'Sesamin induces nitric oxide and decreases endothelin-1 production in HUVECs: possible implications for its antihypertensive effect', *Journal of hypertension*, 22: 2329-38.

- Lee, Ki Won, Nam Joo Kang, Yong-Seok Heo, Evgeny A Rogozin, Angelo Pugliese, Mun Kyung Hwang, G Tim Bowden, Ann M Bode, Hyong Joo Lee, and Zigang Dong. 2008. 'Raf and MEK protein kinases are direct molecular targets for the chemopreventive effect of quercetin, a major flavonol in red wine', *Cancer research*, 68: 946-55.
- Lee, J. M., Derkinderen, P., Kordower, J. H., Freeman, R., Munoz, D. G., Kremer, T., Zago, W., Hutten, S. J., Adler, C. H., Serrano, G. E., Beach, T. G. 2017. The search for a peripheral biopsy indicator of α -synuclein pathology for Parkinson Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 76:2-15.
- Lindvall, Olle, and Anders Björklund. 2004. 'Cell Therapy in Parkinson's Disease', *NeuroRx*, 1: 382-93.
- Löhle, Matthias, and Heinz Reichmann. 2010. 'Clinical neuroprotection in Parkinson's disease—still waiting for the breakthrough', *Journal of the Neurological Sciences*, 289: 104-14.
- Lotharius, Julie, and Patrik Brundin. 2002. 'Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and α -synuclein', *Nature Reviews Neuroscience*, 3: 932-42.
- Manyam, Bala V. 1990. 'Paralysis agitans and levodopa in "Ayurveda": ancient Indian medical treatise', *Movement Disorders*, 5: 47-48.
- Marieb, Elaine Nicpon, René Lachaine, Katja Hoehn, and Linda Moussakova. 2010. *Anatomie et physiologie humaines* (Pearson; ERPI).
- Markowicz-Piasecka, Magdalena, Joanna Sikora, Aleksandra Szydłowska, Agata Skupień, Elżbieta Mikiciuk-Olasik, and Kristiina M Huttunen. 2017. 'Metformin—A Future Therapy for Neurodegenerative Diseases', *Pharmaceutical Research*: 1-14.
- Masiello P, Broca C, Gross R, Roye M, Manteghetti M, Hillaire-Buys D, Novelli M, Ribes G. 1998. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes*, 47:224–9.
- McGill, Université. 2016. 'le cerveau à tous les niveaux'. <http://thebrain.mcgill.ca>
- Mercer, Linda D, Belinda L Kelly, Malcolm K Horne, and Philip M Beart. 2005. 'Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures', *Biochemical pharmacology*, 69: 339-45.

- Miller, Rebecca L, Marilyn James-Kracke, Grace Y Sun, and Albert Y Sun. 2009. 'Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease', *Neurochemical research*, 34: 55-65.
- Milner, John A. 1994. 'Reducing the risk of cancer.' in, *Functional foods* (Springer).
- Mittal, Rahul, Luca H Debs, Amit P Patel, Desiree Nguyen, Kunal Patel, Gregory O'Connor, Jeenu Mittal, Denise Yan, Adrien A Eshraghi, and Sapna K Deo. 2017. 'Neurotransmitters: The Critical Modulators Regulating Gut-Brain Axis', *Journal of cellular physiology*, 232: 2359-72.
- Miyazaki, Ikuko, and Masato Asanuma. 2008. 'Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself', *Acta medica Okayama*, 62: 141-50.
- Mizuno, Yoshikuni, Nobutaka Hattori, Hideo Mori, Toshiaki Suzuki, and Keiji Tanaka. 2001. 'Parkin and Parkinson's disease', *Current opinion in neurology*, 14: 477-82.
- Monnier, Louis, and Carole Fumat. 2010. *Diabétologie* (Elsevier Masson: Issy-les-Moulineaux).
- Morsi, M., Maher, A., Aboelmagd, O., Johar, D., Bernstein, L. 2018. A shared comparison of diabetes mellitus and neurodegenerative disorders. *J Cell Biochem*, 119:1249-1256.
- Mullen, Richard J, Charles R Buck, and Alan M Smith. 1992. 'NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates', *Development*, 116: 201-11.
- Müller, A, M Müngersdorf, H Reichmann, G Strehle, and T Hummel. 2002. 'Olfactory function in Parkinsonian syndromes', *Journal of clinical neuroscience*, 9: 521-24.
- Nakai, Masami, Atsushi Mori, Akihito Watanabe, and Yasuhide Mitsumoto. 2003. '1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) decreases mitochondrial oxidation-reduction (REDOX) activity and membrane potential ($\Delta\Psi$ m) in rat striatum', *Experimental Neurology*, 179: 103-10.
- Narendra, Derek, John E Walker, and Richard Youle. 2012. 'Mitochondrial quality control mediated by PINK1 and Parkin: links to parkinsonism', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4: a011338.
- Neunlist, M, P Aubert, C Toquet, T Oreshkova, J Barouk, PA Lehur, M Schemann, and JP Galmiche. 2003. 'Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis', *Gut*, 52: 84-90.

- Noorian, Ali Reza, Georgia M Taylor, Dana M Annerino, and James G Greene. 2011. 'Neurochemical phenotypes of myenteric neurons in the rhesus monkey', *Journal of Comparative Neurology*, 519: 3387-401.
- Nutt, John G. 2008. 'Pharmacokinetics and pharmacodynamics of levodopa', *Movement Disorders*, 23: S580-S84.
- Oakley, AE, JF Collingwood, J Dobson, G Love, HR Perrott, JA Edwardson, M Elstner, and CM Morris. 2007. 'Individual dopaminergic neurons show raised iron levels in Parkinson disease', *Neurology*, 68: 1820-25.
- Oertel, WH, and NP Quinn. 1997. 'Parkinson's disease: drug therapy', *Bailliere's clinical neurology*, 6: 89-108.
- Olanow, CW, RA Hauser, L Gauguster, T Malapira, W Koller, J Hubble, K Bushenbark, D Lilienfeld, and J Esterlitz. 1995. 'The effect of deprenyl and levodopa on the progression of Parkinson's disease', *Annals of neurology*, 38: 771-77.
- Orth, Michael, and Sarah J Tabrizi. 2003. 'Models of Parkinson's disease', *Movement Disorders*, 18: 729-37.
- 'Parkinson's Disease | The Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research'. <https://www.michaeljfox.org/>.
- Parkinson, JAMES. 1817. 'An Essay on the Shaking Palsy', *Sherwood, Neely and Jones, London*.
- Phillips, Robert J, and Terry L Powley. 2001. 'As the gut ages: timetables for aging of innervation vary by organ in the Fischer 344 rat', *Journal of Comparative Neurology*, 434: 358-77.
- Phillips, Robert J., Sara L. Hargrave, Brie S. Rhodes, David A. Zopf, and Terry L. Powley. 2004. 'Quantification of neurons in the myenteric plexus: an evaluation of putative pan-neuronal markers', *Journal of Neuroscience Methods*, 133: 99-107.
- Pimont, S, S Bruley Des Varannes, JC Le Neel, P Aubert, JP Galmiche, and M Neunlist. 2003. 'Neurochemical coding of myenteric neurones in the human gastric fundus', *Neurogastroenterology & Motility*, 15: 655-62.
- Pincemail, Joël, Sophie Vanbelle, Ulysse Gaspard, Georges Collette, Jeanine Haleng, JP Cheramy-Bien, Corinne Charlier, Jean-Paul Chapelle, Didier Giet, and Adelin Albert. 2007. 'Effect of different contraceptive methods on the oxidative stress status

in women aged 40–48 years from the ELAN study in the province of Liege, Belgium', *Human Reproduction*, 22: 2335-43.

Pollak, Pierre. 2004. *Maladie de Parkinson (La)* (Odile Jacob).

Postuma, Ronald B, Anthony E Lang, Renato P Munhoz, Katia Charland, Amelie Pelletier, Mariana Moscovich, Luciane Filla, Debora Zanatta, Silvia Rios Romanets, and Robert Altman. 2012. 'Caffeine for treatment of Parkinson disease A randomized controlled trial', *Neurology*, 79: 651-58.

Priyadarshi, A., Khuder, S. A., Schaub, E. A., Shrivastava, S. 2000. A meta-analysis of Parkinson's disease and exposure to pesticides. *Neurotoxicology*, 21, 435-440.

Probst, A, A Bloch, and M Tolnay. 2008. 'New insights into the pathology of Parkinson's disease: does the peripheral autonomic system become central?', *European journal of neurology*, 15: 1-4.

Purves, Dale, Roberto Cabeza, Scott A Huettel, Kevin S LaBar, Michael L Platt, Marty G Woldorff, and Elizabeth M Brannon. 2008. *Cognitive Neuroscience* (Sunderland: Sinauer Associates, Inc).

Qiu, Shi, Shun Zhu, Shan Xu, Yanyan Han, Wen Liu, and Ji Zuo. 2017. 'Molecular dynamics simulations of human E3 ubiquitin ligase Parkin', *Molecular Medicine Reports*.

Quik, Maryka. 2004. 'Smoking, nicotine and Parkinson's disease', *Trends in Neurosciences*, 27: 561-68.

Ramsay, Rona R, Stephen K Youngster, William J Nicklas, Kathleen A McKeown, Yuan-Zhen Jin, Richard E Heikkila, and Thomas P Singer. 1989. 'Structural dependence of the inhibition of mitochondrial respiration and of NADH oxidase by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) analogs and their energized accumulation by mitochondria', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86: 9168-72.

Renaud, Justine, Julie Bournival, Ximena Zottig, and Maria-Grazia Martinoli. 2014. 'Resveratrol protects DAergic PC12 cells from high glucose-induced oxidative stress and apoptosis: effect on p53 and GRP75 localization', *Neurotoxicity research*, 25: 110-23.

Renaud, Justine, and Maria-Grazia Martinoli. 2011. 'Propriétés neuroprotectrices, antioxydantes et anti-inflammatoires du resvératrol dans les neurones dopaminergiques', *MSA/Acfas2011*, 1.

- Ribeiro, Joaquim A, and Ana M Sebastiao. 2010. 'Caffeine and adenosine', *Journal of Alzheimer's Disease*, 20: 3-15.
- Richard, Irene Hegeman, Roger Kurlan, and Parkinson Study Group. 1997. 'A survey of antidepressant drug use in Parkinson's disease', *Neurology*, 49: 1168-70.
- Riederer, Peter, Emin Sofic, Wolf-Dieter Rausch, Bruno Schmidt, Gavin P Reynolds, Kurt Jellinger, and Moussa BH Youdim. 1989. 'Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains', *Journal of neurochemistry*, 52: 515-20.
- Rojas-Gutierrez, Eduardo, Guadalupe Muñoz-Arenas, Samuel Treviño, Blanca Espinosa, Raúl Chavez, Karla Rojas, Gonzalo Flores, Alfonso Díaz, and Jorge Guevara. 2017. 'Alzheimer's disease and metabolic syndrome: A link from oxidative stress and inflammation to neurodegeneration', *Synapse*. doi: 10.1002/syn.21990.
- Rolland, Benjamin. 2012. 'Mécanismes dopaminergiques des symptômes schizophréniques et nouvelles perspectives de modulation thérapeutique', Université du Droit et de la Santé-Lille II.
- Rondeau, Philippe. 2009. 'Stress oxydant et glycation: relation structure et activités biologiques de l'albumine in vitro et in vivo dans le cadre de la pathologie diabétique', Université de la Réunion.
- Rosa, Flávia Troncon, M Ángeles Zulet, Julio Sérgio Marchini, and J Alfredo Martínez. 2012. 'Bioactive compounds with effects on inflammation markers in humans', *International journal of food sciences and nutrition*, 63: 749-65.
- Sanders, K. M. 2016. Enteric inhibitory neurotransmission, starting down under. *Adv Exp Med Biol*, 891:21-9.
- Sawada, Hideyuki, Masakazu Ibi, Takeshi Kihara, Makoto Urushitani, Akinori Akaike, and Shun Shimohama. 1998. 'Estradiol protects mesencephalic dopaminergic neurons from oxidative stress-induced neuronal death', *Journal of Neuroscience Research*, 54: 707-19.
- Sawada, Hideyuki, and Shun Shimohama. 2000. 'Neuroprotective effects of estradiol in mesencephalic dopaminergic neurons', *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 24: 143-47.
- Schapira, A. H. V., Chaudhuri, K. R., Jenner, P. 2017. Non-motor features of Parkinson disease. *Nat Rev Neurosci*, 18:435-450.

- Schemann, M, and M Neunlist. 2004. 'The human enteric nervous system', *Neurogastroenterology & Motility*, 16: 55-59.
- Schildknecht, Stefan, Donato A Di Monte, Regina Pape, Kim Tieu, and Marcel Leist. 2017. 'Tipping Points and Endogenous Determinants of Nigrostriatal Degeneration by MPTP', *Trends in Pharmacological Sciences*.
- Senard, Jean-Michel. 1998. 'Troubles tensionnels au cours de la maladie de Parkinson', *La maladie de Parkinson*: 125-35.
- Senard, JM, S Rai, M Lapeyre-Mestre, C Brefel, O Rascol, A Rascol, and JL Montastruc. 1997. 'Prevalence of orthostatic hypotension in Parkinson's disease', *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 63: 584-89.
- Sherer, Todd B, Ranjita Betarbet, and J Timothy Greenamyre. 2002. 'Environment, mitochondria, and Parkinson's disease', *The Neuroscientist*, 8: 192-97.
- Shimura, Hideki, Nobutaka Hattori, Shin-ichiro Kubo, Yoshikuni Mizuno, Shuichi Asakawa, Shinsei Minoshima, Nobuyoshi Shimizu, Kazuhiro Iwai, Tomoki Chiba, and Keiji Tanaka. 2000. 'Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase', *Nature genetics*, 25: 302-05.
- Simpson, Ian A, Anthony Carruthers, and Susan J Vannucci. 2007. 'Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 27: 1766-91.
- Singaram, Chandar, EA Gaumnitz, C Torbey, W Ashraf, EMM Quigley, A Sengupta, and Ronald Pfeiffer. 1995. 'Dopaminergic defect of enteric nervous system in Parkinson's disease patients with chronic constipation', *The Lancet*, 346: 861-64.
- Singer, Carlos, William J Weiner, J Sanchez-Ramos, and M Ackerman. 1991. 'Sexual function in patients with Parkinson's disease', *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 54: 942.
- Singh, Neha, Pillay, Viness, Choonara, Yahya E. 2007. 'Advances in the treatment of Parkinson's disease', *Prog Neurobiol*, 81: 29-44.
- Société de Parkinson, Canada. 2014. 'Qu'est-ce que la maladie de Parkinson?'
- Sotnikova, Tatyana D, Jean-Martin Beaulieu, Raul R Gainetdinov, and Marc G Caron. 2006. 'Molecular biology, pharmacology and functional role of the plasma membrane dopamine transporter', *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 5: 45-56.

- Spillantini, Maria Grazia, R Anthony Crowther, Ross Jakes, Masato Hasegawa, and Michel Goedert. 1998. ' α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 6469-73.
- Storz, Peter. 2011. 'Forkhead homeobox type O transcription factors in the responses to oxidative stress', *Antioxidants & redox signaling*, 14: 593-605.
- Suja, Kizhiyedathu Polachira, Anathasankaran Jayalekshmy, and Chami Arumughan. 2004. 'Free radical scavenging behavior of antioxidant compounds of sesame (*Sesamum indicum* L.) in DPPH system', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 912-15.
- Sun, Yu, Ya-Hui Chang, Hua-Fen Chen, Ying-Hwa Su, Hui-Fang Su, and Chung-Yi Li. 2012. 'Risk of Parkinson Disease Onset in Patients With Diabetes A 9-year population-based cohort study with age and sex stratifications', *Diabetes care*, 35: 1047-49.
- Surmeier, D. J., Obeso, J. A., Halliday, G. M. 2017. Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, 18, 101-113.
- Tabrizi, Sarah J, Michael Orth, J Max Wilkinson, Jan-Willem Taanman, Thomas T Warner, J Mark Cooper, and Anthony HV Schapira. 2000. 'Expression of mutant α -synuclein causes increased susceptibility to dopamine toxicity', *Human Molecular Genetics*, 9: 2683-89.
- Talior, Ilana, Tamar Tennenbaum, Toshio Kuroki, and Hagit Eldar-Finkelman. 2005. 'PKC- δ -dependent activation of oxidative stress in adipocytes of obese and insulin-resistant mice: role for NADPH oxidase', *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 288: E405-E11.
- Tanner, Caroline M. 1989. 'The role of environmental toxins in the etiology of Parkinson's disease', *Trends in Neurosciences*, 12: 49-54.
- Tas, J., D. Mendelson, and C. J. Noorden. 1983. 'Cuprolinic Blue: a specific dye for single-stranded RNA in the presence of magnesium chloride. I. Fundamental aspects', *Histochem J*, 15: 801-14.
- Valko, Marian Leibfritz, Dieter, Moncol, Jan, Cronin, Mark T. D. Mazur, Milan Telser, Joshua. 2007. 'Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39: 44-84.

- Wahlqvist, Mark L., Meei-Shyuan Lee, Chih-Cheng Hsu, Shao-Yuan Chuang, Jiunn-Tay Lee, and Hsin-Ni Tsai. 2012. 'Metformin-inclusive sulfonylurea therapy reduces the risk of Parkinson's disease occurring with Type 2 diabetes in a Taiwanese population cohort', *Parkinsonism & Related Disorders*, 18: 753-58.
- Wardman, Peter, and Luis P Candeias. 1996. 'Fenton chemistry: an introduction', *Radiation research*, 145: 523-31.
- Waseem, Shamaila, and Katrina Gwinn-Hardy. 2001. 'Pain in Parkinson's disease: common yet seldom recognized symptom is treatable', *Postgraduate Medicine*, 110: 33-46.
- Weyer, Anja, and Karl Schilling. 2003. 'Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum', *Journal of Neuroscience Research*, 73: 400-09.
- Wijesekara, N., Gonçalves, R. A., De Felice, F. G., Fraser, P. E. 2017. Impaired peripheral glucose homeostasis and Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, pii: S0028-3908(17)30536-1.
- Wijeyekoon, R., and R. A. Barker. 2009. 'Cell replacement therapy for Parkinson's disease', *Biochim Biophys Acta*, 1792: 688-702.
- Xu, Qun, Yikyung Park, Xuemei Huang, Albert Hollenbeck, Aaron Blair, Arthur Schatzkin, and Honglei Chen. 2011. 'Diabetes and risk of Parkinson's disease', *Diabetes care*, 34: 910-15.
- Yau, Suk-yu, Joana Gil-Mohapel, Brian R. Christie, and Kwok-fai So. 2014. 'Physical Exercise-Induced Adult Neurogenesis: A Good Strategy to Prevent Cognitive Decline in Neurodegenerative Diseases?', *BioMed Research International*, 2014: 403120.
- Youdim, Moussa BH, Dale Edmondson, and Keith F Tipton. 2006. 'The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors', *Nature Reviews Neuroscience*, 7: 295-309.
- Young, Emma. 2012. 'Gut instincts: The secrets of your second brain', *New Scientist*, 216: 38-42.
- Zagnoli, Fabien, and François Rouhart. 2006. *Maladie de Parkinson* (Wolters Kluwer France).

- Zawada A. E, Moszak, M., Skrzypczak, D., Grzymislawski, M. 2018. Gastrointestinal complications in patients with diabetes mellitus. *Adv Clin Exp Med*, doi: 10.17219/acem/67961.
- Zecca, Luigi, Luigi Casella, Alberto Albertini, Chiara Bellei, Fabio A Zucca, Mireille Engelen, Andrzej Zadło, Grzegorz Szewczyk, Mariusz Zareba, and Tadeusz Sarna. 2008. 'Neuromelanin can protect against iron-mediated oxidative damage in system modeling iron overload of brain aging and Parkinson's disease', *Journal of neurochemistry*, 106: 1866-75.
- Zhu, Hong Can, Jing Zhao, Chang Yue Luo, and Qian Qian Li. 2012. 'Gastrointestinal Dysfunction in a Parkinson's Disease Rat Model and the Changes of Dopaminergic, Nitric Oxidergic, and Cholinergic Neurotransmitters in Myenteric Plexus', *Journal of Molecular Neuroscience*, 47: 15-25.
- Zigmond, M. J., Cameron, J. L., Leak, R. K., Mirnics, K., Russell, V. A., Smeyne, R. J., Smith, A. D. 2009. Triggering endogenous neuroprotective processes through exercise in models of dopamine deficiency. *Parkinsonism and Related Disorders*, 15S3:S42–S45.