

1.1.5.6 L'avenir des biomarqueurs

Dans beaucoup de maladies, notamment la MP, la recherche de biomarqueurs est alimentée par la progression de nos connaissances biologiques (tissus, cellules, molécules) reliées à la pathologie. Dans la MP, l'étude des tissus cérébraux post-mortem a été la clé dans l'identification des sentiers protéiques et des gènes permettant l'avancée des thérapies, le développement de modèle d'étude et la compréhension du mécanisme des médicaments, etc. Grâce à ces stratégies, le domaine des biomarqueurs a grandement évolué, augmentant les cibles potentielles (Yadav et al., 2012; Garbayo et al., 2013; Valera and Masliah, 2013). Les nouvelles stratégies s'orientent davantage sur les méthodes globales non ciblées comme la génomique et la protéomique.

Enfin, l'effort des prochaines années devrait être orienté à combiner les différentes découvertes sur les biomarqueurs avec l'analyse des grandes banques de données déjà existante, l'analyse d'échantillons de tissus et de fluides archivés de grandes études et la collecte d'échantillons répétés sur de longues périodes. Il est crucial d'utiliser la bio-informatique pour combiner ces approches et monter des modèles de progression et de diagnostic.

1.2 Biomarqueur sanguin

Bien que la recherche explore toutes les directions possibles pour trouver rapidement un biomarqueur robuste, nous pouvons penser qu'un outil de détection au niveau du sang serait idéal. En effet, un biomarqueur sanguin serait facilement accessible, peu invasif et peu coûteux (Chahine et al., 2014). Les études sur le sang se sont penchées majoritairement vers l' α -Syn, encore une fois pour son importance dans la maladie, mais également sur DJ-1, pour son potentiel comme biomarqueur diagnostique dans le LCS, et l'acide urique, pour son habileté à diminuer l'oxydation de la DA (Church and Ward, 1994; Polymeropoulos et al., 1997; Hong et al., 2010). C'est d'ailleurs l'acide urique qui montre le meilleur potentiel de biomarqueur puisque des études ont révélé une diminution de ce composé dans le plasma de patients pouvant indiquer une croissance des risques de développer la MP (Cipriani et al., 2010; Schwarzschild et al., 2011). Dans la recherche de cible aléatoire, ApoA1 et *l'epidermal*

growth factor semblent diminués dans le plasma de patient démontrant une augmentation des risques pour la MP (Chen-Plotkin et al., 2011; Qiang et al., 2013).

On retrouve également pour chaque type de cellules sanguines, plusieurs études visant à découvrir si l'une ou l'autre de ces cellules est affectée par la pathologie et si elles peuvent être utilisées comme biomarqueur.

1.2.1 Érythrocytes

En 2007, Nakai et collaborateurs ont montré la présence d' α -Syn dans les érythroblastes, les réticulocytes et les érythrocytes (Nakai et al., 2007). De plus, certains chercheurs soutiennent que les érythrocytes constituent la principale source d' α -Syn dans le sang (Barbour et al., 2008). Finalement, une étude récente rapporte que la concentration d'oligomères d' α -Syn présent dans les érythrocytes est plus élevé chez les patients parkinsoniens (Wang et al., 2015). Pour l'instant, aucune étude ne permet de comprendre l'implication de cette protéine dans le système hématopoïétique.

Une augmentation de l'éryptose, une sorte de mort cellulaire programmée propre aux érythrocytes, a également été remarquée chez les patients souffrant de la MP (Pretorius et al., 2014). En effet, l'augmentation de la peroxydation lipidique des érythrocytes de patients parkinsoniens observés par Sudha expliquerait la hausse de mort érythrocytaire (Sudha et al., 2003). Ce phénomène pourrait devenir un marqueur de progression de la maladie puisque le stress oxydatif, produit par la peroxydation, est une caractéristique importante dans la pathogenèse de la MP (Nikam et al., 2009). Finalement, on remarque que les molécules antioxydantes telles que la catalase, la glutathion peroxydase et la superoxyde dismutase (SOD), responsables de la détoxification des radicaux hydroxyles, sont diminuées dans les érythrocytes de patients, marquant, encore une fois, l'altération de ces cellules avec la maladie (Ihara et al., 1999; Serra et al., 2001; Chen et al., 2009; Abraham et al., 2005).

1.2.2 Plaquettes

Les plaquettes sont largement utilisées pour la détection de changement structural, biochimique et moléculaire dans un très grand nombre de maladies (Camacho and Dimsdale, 2000; Pretorius et al., 2008; Boilard et al., 2010). De plus, des études valident leur importance dans certaines maladies neurodégénératives comme la MP (Shrivastava and Vivekanandhan, 2011; Gowert et al., 2014). Il a été montré que le 1-Methyl-4-Phenylpyridinium (MPP+), utilisé comme neurotoxine pour simuler la MP chez certains animaux, peut modifier l'ultrastructure et la morphologie des plaquettes (Factor et al., 1994). En effet, une diminution de l'agrégation des plaquettes, une déplétion en ATP, une augmentation de l'activité de la monoamine oxydase B, une diminution de l'activité des chaînes de transport d'électrons et une diminution de SOD ont été observées chez des parkinsoniens (Schapira et al., 1998; Husain et al., 2009). Une augmentation du taux de glutamate et une diminution de son absorption dans les plaquettes ont d'ailleurs déjà été remarquées chez des patients idiopathiques (Ferrarese et al., 1999, 2001). Des évidences suggèrent même l'utilisation des plaquettes pour l'étude de marqueurs de méthylation et de l' α -Syn dans la MP (S-adenosyl methionine, S-adenosyl homocysteine) (Li et al., 2002a; Obeid et al., 2009).

1.2.3 Leucocytes

Tout comme les érythrocytes et les plaquettes, plusieurs évidences suggèrent que les leucocytes de patients parkinsoniens pourraient subir des altérations biochimiques. Il a d'ailleurs été montré que les lymphocytes de personnes malades sont susceptibles d'être la cible d'une mauvaise régulation des protéines du cytosquelette et d'une augmentation du stress oxydatif (Mila et al., 2009). De plus, certaines populations de lymphocytes T semblent modulées en périphérie. Un phénomène qui pourrait être lié aux processus inflammatoires dans le cerveau des patients (Baba et al., 2005; Rocha et al., 2017). Finalement, des études de cas précoces de la MP montrent une réduction des concentrations de DA au niveau intracellulaire et d'immunoréactivité de la tyrosine hydroxylase dans les leucocytes (Caronti et al., 1999). Les monocytes pourraient eux aussi être altérés au niveau de leur fonction et de leurs compositions de par la prédisposition inflammatoire chez les patients (Grozdanov et al., 2014).

Bien que l'implication des cellules sanguines dans la MP soit encore peu comprise, il semble qu'elles pourraient apporter à notre compréhension de la pathologie. On peut donc penser et suggérer que l'excrétion de particules issues d'érythrocytes, de plaquettes et de leucocytes pourrait refléter le degré d'activité pathologique.

1.3 Vésicules extracellulaires

La communication intracellulaire est un mécanisme essentiel des organismes multicellulaires. Elle peut être modulée directement par le contact de cellule à cellule ou par le transfert de molécules sécrétées. Au cours des deux dernières décennies, un troisième mécanisme de communication intercellulaire impliquant le transfert de vésicules entre cellules a été découvert. Bien que l'espace extracellulaire des organismes multicellulaires contienne des ions, des protéines et des polysaccharides, on retrouve également un très grand nombre de vésicules mobiles appelées, vésicules extracellulaires (VE). La majorité des cellules du corps humain ont la capacité de relâcher une variété de vésicules membranaires dans leur environnement extracellulaire. Les VE fonctionnent comme des navettes en transportant des protéines, des ARN messager et des micro-ARN de cellules en cellules.

1.3.1 Exosomes

Dans les années 80, les exosomes ont été décrits par Trams et al. comme étant des vésicules exfoliées pouvant servir à des fonctions physiologiques grâce à l'activité d'ectoenzyme (Trams et al., 1981). Par la suite, des études ont décrit et montré, par microscopie électronique, le relâchement de vésicules lors de la maturation des réticulocytes chez le rat et le mouton (Harding et al., 1983; Pan et al., 1985; Johnstone et al., 1987). Ces vésicules formées d'une bicouche lipidique ont une taille similaire à celle des virus, soit de ~50 à 100 nm. Les exosomes sont relâchés par exocytose depuis les corps multivésiculaires (CMV) par induction ou de manière constitutive (Simons and Raposo, 2009). Les CMV sont la clé intermédiaire dans le transport endolysosomal, formé lui-même de l'invagination et la scission de vésicules (Gruenberg and Stenmark, 2004; Piper and Katzmann, 2007; Hurley et al., 2010). Bien qu'il subsiste encore plusieurs interrogations quant à leur genèse, on sait que

le *endosomal sorting complex required for transport* et certains sphingolipides comme le céramide et la sphingosine -1-phosphate contribuerait au relâchement des exosomes. En effet, le céramide favorise la flexion membranaire alors que la sphingosine -1-phosphate régule la production constitutive d'exosomes dans le CMV (Trajkovic et al., 2008; Hurley et al., 2010). Les exosomes ont été principalement décrits pour leurs fonctions chez les cellules immunitaires et les tumeurs. Leurs mécanismes permettent 1) le contact direct entre leurs molécules de surface et les cellules, 2) l'endocytose des vésicules et 3) la fusion des membranes de l'exosome et de la cellule (Théry et al., 2009). Les exosomes peuvent également moduler le transfert d'ARN messager, de micro ARN et de particules du virus de l'immunodéficience humaine (Valadi et al., 2007; Izquierdo-Useros et al., 2009). On retrouve sur la surface membranaire externe la phosphatidylsérine ainsi que des marqueurs comme CD63, CD81, CD9, Alix et TSG101 (Sarko and McKinney, 2017; Zhao et al., 2017).

1.3.2 Microvésicules

Chargaff et West ont été les premiers à décrire les microvésicules en 1946 comme étant un précipité ayant la possibilité de générer de la thrombine dans du plasma sans plaquettes (Chargaff and West, 1946). Tout comme les exosomes, les microvésicules ou ectosomes sont formées d'une bicouche lipidique. Par contre, leurs tailles se situent entre 100 et 1000 nm, selon le type cellulaire d'où elles émergent (György et al., 2011). La formation des microvésicules résulte d'une interaction dynamique entre les phospholipides et les protéines du cytosquelette. La répartition des flippases et des floppases est déterminante pour le transfert de phospholipides ; étape initiale du bourgeonnement (Akers et al., 2013). De plus, les interactions d'actine-myosine vont mener à la contraction du cytosquelette dans le but de finaliser le bourgeonnement (Cocucci et al., 2009). Étant enrichies d'une multitude de protéines et de lipides provenant de la cellule mère, les fonctions des microvésicules peuvent énormément varier. Elles peuvent participer, par exemple, à l'activité procoagulante (Leroyer et al., 2008), à la sécrétion d'IL1beta (Boilard et al., 2010), au caractère pro-invasif des tumeurs (Giusti et al., 2008) et à l'induction de la transformation oncogénique cellulaire (Antonyak et al., 2011). On retrouve majoritairement à leur surface des protéines

membranaires issues de la cellule mère et bien souvent la phosphatidylsérine (Connor et al., 2010).

1.3.3 Corps apoptotiques

Les corps apoptotiques possèdent un diamètre entre 1 et 5 μm (Hristov et al., 2004). Ces vésicules plasmiques composées de débris cellulaires sont relâchées lors du processus apoptotique d'une cellule. Elles peuvent par ailleurs contenir des fragments du noyau et des organelles plus ou moins intactes. Ces corps sont destinés à être phagocytés, entre autres par les macrophages (Elmore, 2007). Le but de ces vésicules est de permettre à la cellule apoptotique de mourir et d'être phagocytée sans déclencher de réponse inflammatoire potentiellement nuisible pour ses voisines. Bien que le corps apoptotique possède une taille et une quantité de matériel beaucoup plus importantes que les autres VE, le mécanisme de suppression par les macrophages, suite au changement spécifique de la membrane, reste similaire (Erwig and Henson, 2008). On observe, de façon similaire aux exosomes et aux microvésicules, une translocation de la phosphatidylsérine qui se liera à l'Annexin V, reconnu par les phagocytes (Martínez and Freyssinet, 2001).

Bien que les différences entre les exosomes et les microvésicules soient détaillées dans les revues de littérature, les articles de recherche utilisent généralement le terme « exosomes » ou « VE ». Les méthodes utilisées pour différencier ces deux types de vésicules ne sont souvent pas utilisées ou pas assez précises pour les catégoriser (Maas et al., 2017).

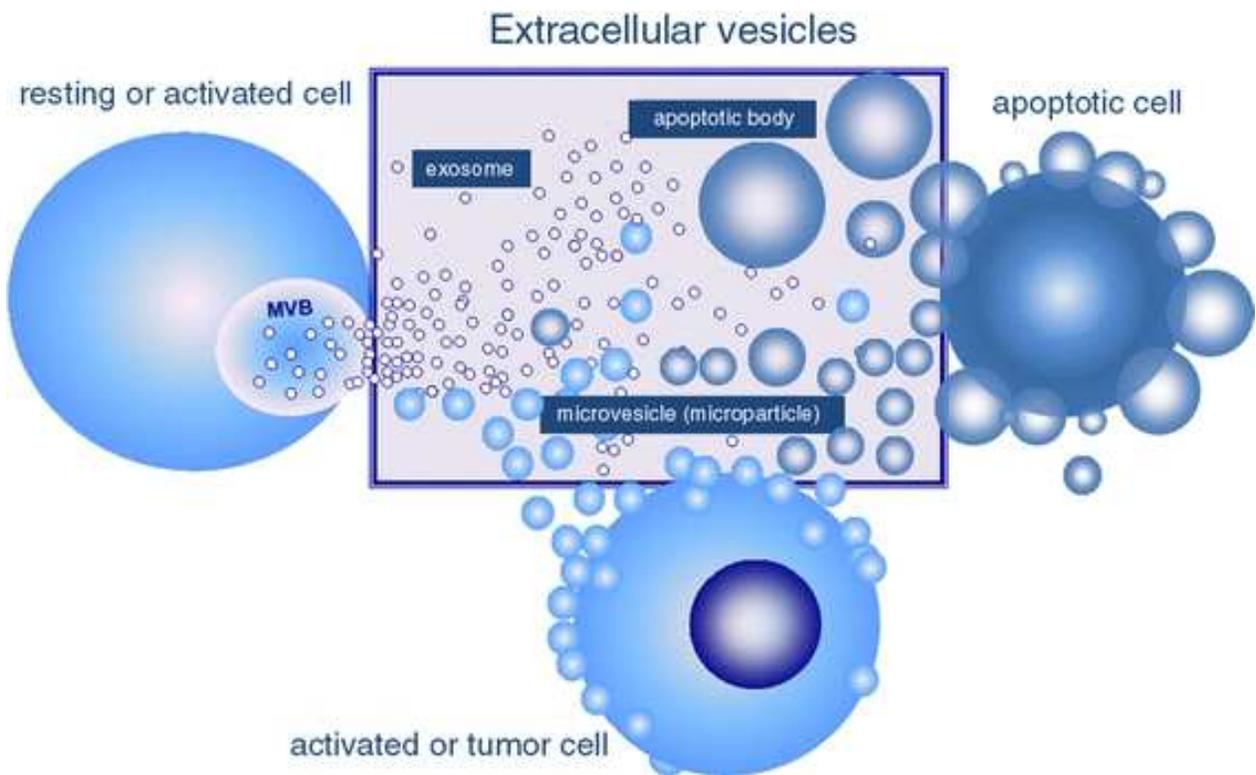


Figure 1.2. Représentation schématique des vésicules extracellulaires.

Les VE sont représentés de sorte que l'on puisse comparer leur taille et leur mode de relâchement. Figure tirée de (György et al., 2011).

Tableau 1.2. Comparaison des types de vésicules extracellulaires

	Exosomes	Microvésicules	Corps apoptotiques
Taille	50-100 nm	100-1000 nm	1-5 µm
Mécanisme de production	Exocytose du CMV	Bourgeonnement de la membrane plasmique	Formation de bulles lors de l'apoptose
Isolation	<ul style="list-style-type: none"> • Ultracentrifugation à gradient • Centrifugation différentielle 100 000g 	<ul style="list-style-type: none"> • Centrifugation différentielle 20 000g 	<ul style="list-style-type: none"> • Co-culture avec cellule
Détection	<ul style="list-style-type: none"> • Nanosizer • Microscopie électronique • Immunobuvardage de type Western • Spectrométrie de masse 	<ul style="list-style-type: none"> • Nanosizer • Microscopie électronique • Cytométrie de flux 	<ul style="list-style-type: none"> • Microscopie électronique • Cytométrie de flux
Marqueurs	Annexin V, CD63, CD81, CD9, Alix, TSG101	Annexin V, marqueurs spécifiques à la cellule	Annexin V, marqueurs spécifiques à la cellule, marqueurs nucléiques
Références	(Sarko and McKinney, 2017; Barile and Vassalli, 2017)	(Porro et al., 2015; Lai et al., 2015)	(Hristov et al., 2004; György et al., 2011)

1.3.4 Rôles des VE dans la maladie de Parkinson

Il a été proposé que les VE provenant des neurones, des oligodendrocytes, des astrocytes et des microglies puissent jouer des rôles majeurs dans la pathogenèse de maladies

neurodégénératives grâce à leurs diverses fonctions (Budnik et al., 2016). Ces fonctions pourraient notamment permettre aux VE de contribuer à la propagation de protéines pathologiques au niveau du cerveau et ainsi accentuer la progression de la maladie (Quek and Hill, 2017).

1.3.4.1 Études des VE dans le système nerveux central (*in vitro*)

En raison de la nature de la MP, des mécanismes de propagation et de neurotoxicité ont d'abord été étudiés *in vitro* sur des neuroblastomes (SH-SY5Y) ou des neurogliomes (H4). Ces études démontrent que l' α -Syn pourrait être excrétée des cellules neuronales par les exosomes via un processus dépendant du calcium, suggérant que ces vésicules seraient impliquées dans le transport de l' α -Syn et la propagation de la pathologie (Emmanouilidou et al., 2010). De même, il semble que le dysfonctionnement du lysosome dans le cerveau de patients augmente la libération d' α -Syn via les exosomes et, par conséquent, accentue l'agrégation et la transmission de la protéine à des cellules voisines (Alvarez-Erviti et al., 2011). En effet, les exosomes permettent l'accumulation d' α -Syn dans l'espace extracellulaire, ce qui permettrait d'accélérer l'agrégation de la protéine (Melachroinou et al., 2013; Grey et al., 2015). Il a d'ailleurs été proposé que la libération des oligomères d' α -Syn associée aux exosomes soit un mécanisme par lequel les cellules peuvent rejeter la protéine toxique (Danzer et al., 2012). Finalement, on note que la mutation ATP13A2 sur le gène Park9, impliqué dans le parkinsonisme familial et juvénile, semble réduire les niveaux d' α -Syn intracellulaires en augmentant le relargage de la protéine par les exosomes (Kong et al., 2014; Tsunemi et al., 2014).

1.3.4.2 Études des VE dans le liquide céphalo-rachidien

Des études montrent que les VE du LCS contiennent également l' α -Syn et ses formes pathologiques (Kunadt et al., 2015). L'analyse de cette protéine dans des exosomes du LCS chez des patients souffrant de neurodégénérescence révèle que ce type de vésicules a la capacité de produire des structures en forme d'oligomère à partir de la protéine soluble (Stuendl et al., 2016). En outre, la protéine LRRK2, identifiée dans de nombreuses formes de parkinsonisme familial, est retrouvée dans les exosomes du LCS (Fraser et al., 2013).

Cependant, l'échantillonnage systématique de LCS présente un très grand défi, soit celui d'être extrêmement invasif.

1.3.4.3 Études des VE dans l'urine

L'urine est également étudiée comme réservoir de biomarqueurs grâce à son rôle d'excrétion des déchets et du fait qu'elle est facilement récupérable. La présence de diverses formes de LRRK2 à l'intérieur d'exosomes provenant des cellules endothéliales du rein a d'ailleurs déjà été rapportée. Cependant, l'expression de cette protéine dans les vésicules urinaire semble variable dans une même population ce qui sème un doute quant à son utilité comme biomarqueur de la MP (Fraser et al., 2013). On retrouve également la protéine DJ-1 dans les exosomes urinaires, augmentée près de deux fois chez les patients parkinsoniens (Ho et al., 2014). Bien que l'urine pourrait potentiellement contenir un bon marqueur de la progression ou de la détection de la MP, il existe encore une grande lacune quant à nos connaissances sur les vésicules de ce liquide corporel.

1.3.4.4 Études des VE dans le système circulatoire

Le plasma est un fluide facile d'accès qui peut être prélevé fréquemment. Il s'agit donc d'un environnement propice aux études de biomarqueurs. Tout d'abord, il a été montré que les oligomères d' α -Syn présents dans le plasma offrent une nouvelle cible pour la création de tests de diagnostic pour les patients parkinsoniens (El-Agnaf et al., 2006). L'identification des mécanismes de transport et de sécrétion de la protéine chez les patients montre une augmentation de sa concentration dans les exosomes dérivées du système nerveux central localisé dans le plasma (Shi et al., 2014). Toutefois, il a également été montré que la concentration d' α -Syn n'est pas modulée dans les vésicules de plasma, mais que 23 protéines associées aux exosomes sont plus abondants chez les patients (Tomlinson et al., 2015). Ces résultats appuient l'hypothèse que l' α -Syn ne peut pas être utilisé comme biomarqueur, mais qu'un changement de plusieurs protéines dans les vésicules pourrait servir d'outil de diagnostic.

1.4 Les objectifs de recherche

L'étude des biomarqueurs dans la MP connaît une expansion considérable ces dernières années. Considérant que le diagnostic est exclusivement clinique et apparaît très tard durant les processus dégénératifs, il est nécessaire de développer des outils permettant de cibler les patients à un stade précoce afin de stopper la pathologie rapidement. L'objectif global de l'étude était donc d'identifier un biomarqueur non invasif permettant 1) de discriminer un patient d'une personne saine et 2) d'instaurer une échelle de progression au niveau biologique pouvant appuyer les échelles cliniques. Dans le but de réaliser ce projet, nous avons quantifié et caractérisé le protéome des vésicules extracellulaires présentes dans le plasma. Bien que plusieurs études s'attardent sur les cellules sanguines et les VE de fluides corporels comme potentiel biomarqueur, à notre connaissance, les vésicules plasmatiques n'ont jamais été caractérisées dans le cadre de la MP.

Nous avons utilisé un cytomètre de flux conçu spécialement pour détecter les vésicules (Rousseau et al., 2015). Comme les cellules sanguines semblent affectées par la pathologie, nous pensons que la quantité de vésicules pourrait être augmentée ou diminuée, dû à l'altération de processus biologique dans ces cellules. Nous avons donc émis une première hypothèse suggérant que la concentration de vésicules peut non seulement varier de manière significative entre un patient et son contrôle, mais également entre des patients de différents stades de la maladie.

Nous avons également caractérisé les vésicules d'intérêts au niveau protéique. Bien que plusieurs études tendent à démontrer la présence et l'importance de l' α -Syn dans les vésicules et les cellules sanguines, la littérature n'est toujours pas en mesure de désigner cette protéine comme biomarqueur (Bartels et al., 2011; Grey et al., 2015). De plus, plusieurs études ayant déjà fait une analyse protéique globale laissent présager qu'une multitude de facteurs sont capables d'influencer l'ensemble des protéines des vésicules (Bosman et al., 2008, 2012; Tomlinson et al., 2015). De ce fait, nous avons poursuivi une deuxième hypothèse de recherche voulant que la pathologie puisse affecter la composition protéique des VE sans toutefois changer les concentrations d' α -Syn et ainsi identifier un profil spécifique à la MP.

[MCours.com](https://www.MCours.com)