

CHAPITRE 3: DISCUSSION

3.1 Caractérisation de la nature et du profil des VE

Le premier objectif de notre étude était de caractériser la nature et le nombre de VE dans le plasma de patients atteints de la MP afin d'évaluer leur potentiel comme biomarqueur de diagnostic ou de progression. Nous avons ainsi récolté le sang de 60 patients et 37 contrôles appariés pour le sexe et l'âge. Pour chaque participant, nous avons recueilli toutes les données cliniques disponibles (évaluations cliniques, médication, facteurs de comorbidités), effectué une analyse de formule sanguine complète et quantifié chaque sous-type de VE.

3.1.1 Biomarqueur de valeur diagnostique

Bien que l'analyse de la formule sanguine complète n'ait révélé aucune différence dans le nombre de cellules, nous avons observé une augmentation significativement différente de VEE entre les patients et les contrôles. Nous avons également observé une augmentation similaire du ratio entre les VEE et les érythrocytes, démontrant l'augmentation de la libération des VEE par les érythrocytes. La quantification des érythrocytes reste quant à elle similaire. Cependant, un examen plus approfondi de la quantification des VEE nous a révélé que seulement 5 patients sont responsables de cette différence significative. Ces patients se situent à un stade plus avancé de la maladie. On peut donc conclure que le nombre de VEE ne peut être utilisé comme caractéristique discriminatoire entre un patient et une personne saine.

3.1.2 Biomarqueur pour la progression de la maladie

Nous avons de surcroît évalué le potentiel des VEE comme biomarqueur des différents états de la MP. Pour ce faire, nous avons analysé les corrélations du ratio VEE par érythrocytes par rapport à certaines échelles cliniques de la maladie telles que le UPDRS, le H&Y, le MMSE, le BDI et le ACE. Nos résultats révèlent que le coefficient de corrélation linéaire entre l'échelle du UPDRS et le nombre de VEE se rapproche de 1. Les régressions linéaires montrent que 87 % de la variation du ratio VEE/érythrocyte est expliqué par la fluctuation du UPDRS. Les intervalles de confiance montrent un seuil d'erreur de moins de 5 %. Nos résultats révèlent également deux corrélations distinctes séparant les patients de divers stades.

Nous avons observé que les patients ayant un résultat inférieur à 37 au UPDRS sont caractérisés par une augmentation du nombre de VEE au stade précoce de la maladie. Il existe de façon similaire, une corrélation entre les scores de 37 et 75 qui définit les patients à un stade plus avancé de la MP. Comme le UPDRS comprend plusieurs sections, nous avons regardé si le lien entre cette échelle et la concentration de VEE est spécifique à une section (aspects non moteurs, aspects moteurs, langage, etc.). Nos résultats montrent qu'aucune catégorie spécifique du UPDRS ne semble associée aux fortes corrélations observées. Malgré notre analyse exhaustive, la scission est toujours difficile à expliquer puisque le UPDRS ne possède pas de stratification des résultats clairement détaillés comme le H&Y. La mise à jour du UPDRS par la Société des troubles du mouvement (MDS-UPDRS) à amener la communauté des cliniciens à réfléchir sur une méthode pour estimer la gravité de la maladie. Martínez-Martín et collaborateur ont montré qu'un résultat de MDS-UPDRS entre 30 et 35 semble marquer un seuil de distinction entre les patients précoces et les patients modérés (Martínez-Martín et al., 2015). Ce seuil est attribué principalement à l'évaluation motrice qui constitue la plus grande partie de l'échelle clinique. Bien que notre analyse ait été réalisée avec le UPDRS standard, nous pensons que la scission peut permettre de différencier deux stades de la maladie. La diminution précipitée de la concentration de VEE au début du stade modéré pourrait être une cause d'un changement systémique chez le patient. L'étude exhaustive des érythrocytes dans la MP pourrait potentiellement permettre d'expliquer ce phénomène.

3.1.3 Validation des résultats

Nous avons également reproduit la quantification totale des vésicules sur une cohorte indépendante de patients souffrant de la maladie d'Huntington. Les résultats ne révèlent aucune différence entre les prémanifestes, les manifestes et les contrôles sains pour tous sous-types de vésicules incluant les VEE. Nous pouvons ainsi présumer que le nombre de VEE corrèle spécifiquement avec le UPDRS et donc la MP.

Afin de valider nos résultats, nous avons étudié si des facteurs externes à la maladie pouvaient influencer la quantification de VEE. En premier lieu, nous avons étudié la prise de

médicaments pour chaque participant. Nous n'avons tenu compte d'aucune médication non parkinsonienne puisque les traitements entre les participants sont extrêmement variés. Chez les parkinsoniens, nous avons regardé le lien entre la dose équivalente journalière de lévodopa et le nombre de VEE. Les données montrent que l'augmentation de VEE n'est pas une conséquence du changement de médicaments liée à la lévodopa. De plus, nous avons observé une augmentation significative de la concentration de VEE dans le plasma des participants atteints de diabète et de cancer, patients et contrôles confondus. Il a été rapporté que le diabète réduit la déformabilité érythrocytaire et augmente l'agrégation de ces derniers (Cho et al., 2008). De plus, il semble que les VE dérivés du sang soient impliqués de diverses manières dans ces deux maladies (Tokarz et al., 2015; Żmigrodzka et al., 2016). Nous avons donc décidé d'exclure ces participants de nos analyses. Finalement, les plasmas comportant un niveau d'hémoglobine libre élevée ($> 45\ 000$ ng/ml), potentiellement due à l'hémolyse lors de la collecte de sang, ont également été exclus des analyses liées aux VEE.

3.2 Contenu protéique des VEE

Le deuxième objectif de notre étude était de caractériser le contenu protéique des VEE.

3.2.1 Méthodes d'activation

Pour l'étude des VEE, il est nécessaire de les isoler et les concentrer. Nous avons essayé, dans un premier temps, d'isoler les vésicules directement du plasma. Malheureusement, les techniques utilisées, optimisées davantage pour les cellules, n'ont pas fonctionné avec d'aussi petites et peu nombreuses particules. Nous avons donc tenté d'activer les érythrocytes d'une façon la plus physiologique possible. Selon plusieurs études, les ions calcium semblent être la clé de la biogénèse de vésicules extracellulaires. Ils participent à l'activation ou l'inhibition de protéines et phospholipides au niveau de la membrane cellulaire. Le calcium ionophore A23187 provoque un changement dans la concentration de calcium induisant la vésiculation. Contrairement à l'eau et la congélation, souvent utilisé pour provoquer la libération de VEE, ce composé évite de faire éclater ou de détruire la membrane des érythrocytes (Nguyen et al., 2016). Cependant, bien que le taux d'ion calcium change en

condition physiologique, notamment avec l'âge, le A23187 induit un changement d'ion supérieur à ce qui est réellement observé fixant ainsi une limite à notre méthode *in vitro*.

Nous avons imagé, par microscopie électronique à balayage, des érythrocytes au repos et activés de patients et contrôles afin de comparer la morphologie des cellules. Bien que ces images montrent la vésiculation des érythrocytes, aucune différence entre les individus n'a pu être observée.

3.2.2 Quantification d' α -Syn par ELISA et microscopie

Bien que l' α -Syn soit très présente dans les tissus cérébraux, des études montrent qu'on la retrouve également en quantité importante dans le sang et plus particulièrement dans les érythrocytes laissant présager sa présence dans les VEE (Barbour et al., 2008). Nous avons donc regardé la concentration d' α -Syn totale et d'une forme phosphorylée (Sérine 129) dans les VEE en microscopie électronique entre des patients à un stade modéré de la maladie et leurs contrôles. Suite aux résultats ne montrant aucune différence entre les groupes pour les deux types d' α -Syn, nous avons effectué une quantification de la protéine totale par ELISA chez des patients aux stades précoce et modéré ainsi que chez les contrôles. Contrairement à la méthode par microscopie électronique, l'ELISA est beaucoup plus quantitatif et nous permet d'obtenir des valeurs en nanogramme par millilitre. Les résultats confirment que la concentration d' α -Syn reste similaire entre les patients et les personnes saines. On peut donc conclure que le niveau d'expression de cette protéine dans les VEE ne peut servir de biomarqueur. Cependant, l' α -Syn pourrait tout de même jouer un rôle majeur au sein des érythrocytes.

3.2.3 Protéomique

À la vue des résultats précédents, nous avons décidé d'analyser le protéome entier des VEE de patients aux stades précoce et modéré ainsi que leurs contrôles afin de détecter une éventuelle signature protéique entre les participants. Étant donné la grande quantité d'hémoglobine qui subsiste dans les VEE, nous avons effectué deux types d'approches distinctes afin d'optimiser la détection de l'ensemble du protéome des VEE. Nous avons

réalisé une première approche où l'ensemble du protéome fût analysé en un bloc, révélant ainsi un total de 356 protéines. Nous avons, par la suite, utilisé une deuxième approche qui consiste à séparer l'hémoglobine des autres protéines et de les analyser séparément. Par cette méthode nous avons détecté 818 protéines. De plus, une analyse par *Gene Ontology*, comparant nos échantillons avec l'ensemble du génome humain, montre un enrichissement, des protéines associées aux vésicules et aux complexes d'hémoglobine.

Parmi les 818 protéines, il nous a été possible d'identifier 8 protéines significativement modulées entre les groupes. Une heat map nous a d'ailleurs permis de mettre en évidence 3 groupes de protéines. Le premier groupe constitué les protéines (gènes) AIDA, ABHD14B et NADSYN1 qui sont moins exprimées chez l'ensemble des patients. Les protéines (gènes) QDPR, AKR1A1 et CNRIP1 constituent le deuxième groupe où l'expression semble être plus importante chez les patients au stade précoce. Finalement, le troisième groupe constitué de USP24 et ATP5A1 est significativement plus exprimé chez les patients au stade modéré.

La documentation concernant l'implication de ces protéines dans la MP est rare. Toutefois, les ARN messagers pour la protéine CNR semblent diminués dans le striatum chez un modèle animal de MP (Zeng et al., 1999). On remarque également que des variantes génétiques de USP24 semblent responsables d'un risque associé à la MP (Li et al., 2006). De plus, on retrouve plusieurs formes d'ATP synthase à des concentrations anormales chez les parkinsoniens pouvant expliquer le changement d'expression de l'ATP5A1 (Ferrer et al., 2007).

En terminant, la heat map et la mise en cluster hiérarchique des individus (patients précoces, patients modérés, contrôles) permettent de les regrouper grâce à la similarité de l'expression des 8 protéines. Ces résultats suggèrent l'utilisation de ces 8 protéines comme biomarqueur. Cependant, on peut se demander si ces changements reflètent des modifications également présentes dans les globules rouges. Bien que ces cellules soient anucléées, elles possèdent plus de 2600 protéines dont toutes celles identifiées dans notre étude (Bryk and Wiśniewski, 2017). Malheureusement, on ne trouve pour l'instant, aucune étude détaillant les altérations du protéomes d'érythrocytes dans la MP.

3.3 Perspectives d'avenir

3.3.1 Perspectives expérimentales

Suivant les expériences que nous avons effectuées lors de ce projet, il serait intéressant de se pencher sur l'implication des VEE dans le développement de la pathologie. En effet, nous observons que ce type de vésicule peut potentiellement servir d'outil pour évaluer la progression de la maladie. Cependant, nous ignorons si elles jouent un rôle dans la pathogenèse ou si elles ne sont qu'une conséquence de celle-ci. Des données préliminaires visant à déterminer le rôle des VEE comme transporteur au niveau de la barrière hématoencéphalique nous ont permis de constater que les vésicules semblent interagir avec les cellules endothéliales. Nous avons incubé pendant 18 heures des VEE, préalablement marqués par la *green fluorescent protein* (GFP), avec une barrière de cellules endothéliales dans un modèle de chambre de Boyden tel que décrit par Prat et collaborateur (Prat et al., 2005). Les résultats nous ont montré que certaines VEE peuvent traverser la couche de cellules alors que d'autres sont internalisés par les cellules endothéliales. Cette étude, bien qu'incomplète, pourrait être optimisée notamment en faisant une analyse de l'interaction des vésicules et des cellules endothéliales en reprenant le modèle de la chambre de Boyden ou en utilisant des systèmes microfluidiques (ibidi, BioFlux) (Ganguly et al., 2012; Hayes et al., 2017). Selon les résultats, nous pourrions comprendre si les VEE ont la capacité de passer la barrière hématoencéphalique et d'agir comme véhicule de propagation de la pathologie. La conclusion de ces études pourrait nous permettre d'envisager de nouvelles voies thérapeutiques (Hall et al., 2016).

Il serait également intéressant de regarder dans les érythrocytes si les mécanismes impliqués dans le bourgeonnement des VEE sont altérés ou stimulés par la maladie. Comme l' α -Syn semble réguler les vésicules synaptiques au niveau présynaptique, nous pourrions émettre l'hypothèse d'une fonction similaire de régulation des vésicules dans les cellules sanguines (Wang et al., 2015). De plus, l'augmentation de l'éryptose, tel que discuter à la section 1.2.1, pourrait également être un facteur contribuant à l'augmentation du relâchement des vésicules. Les résultats nous permettraient de mieux comprendre le rôle des globules rouges et de l' α -Syn dans la pathologie, pouvant apporter potentiellement de nouvelles cibles thérapeutiques.

Finalement, l'analyse protéomique d'érythrocytes chez des patients et des personnes saines pourrait nous indiquer si le changement protéique observé dans les VEE est également présent dans les globules rouges.

3.3.2 Perspectives diagnostiques

Dans le but de faire valider notre biomarqueur au niveau clinique, il serait nécessaire de faire une nouvelle étude en augmentant le nombre de patients et leurs contrôles afin de couvrir un échantillon de population plus important. Ainsi, nous pourrions comparer davantage les patients selon leurs médications et leurs facteurs de comorbidités. De plus, il est nécessaire d'obtenir la contribution de ces individus afin de démontrer la valeur de notre biomarqueur comme échelle diagnostic. Il serait intéressant de voir si ces patients suivent la corrélation attribuée aux patients modérés ou s'ils forment une troisième corrélation distincte. Finalement, il pourrait être pertinent d'inclure une population de patients souffrant de forme atypique de la MP ou de maladies neurologiques dont le diagnostic est similaire à la MP par exemple, l'atrophie multisystématisée, la paralysie supranucléaire progressive et la démence à corps de Lewy (McKeith et al., 2005; Respondek and Höglinger, 2016; Laurens et al., 2017; Höglinger et al., 2017).

L'obtention récente d'une demande de fonds du *Weston Brain Institute* par le Dr Cicchetti va permettre de réaliser plusieurs de ces perspectives en allant chercher 200 patients parkinsoniens et 200 personnes saines. Les résultats préliminaires de cette nouvelle cohorte semblent reproduire la corrélation entre les VEE de patients au stade précoce et le UPDRS. La validation des corrélations et de la signature protéique sur de grandes cohortes représentera une avancée majeure pour la découverte de biomarqueurs dans la MP.

3.4 Conclusion

Ce projet nous a permis d'identifier un nouveau biomarqueur qui cible les états de la MP selon deux corrélations associées au stade précoce et au stade modéré de la maladie. Les analyses statistiques montrent en effet que la quantité de VEE dans le plasma corrèle