

INTRODUCTION ET OBJECTIF

- La maladie de Parkinson (MP) est chronique, progressive et se manifeste par des symptômes moteurs et non-moteurs. L'étiologie exacte demeure inconnue. De plus, une perte jusqu'à 80 % de la dopamine striatale peut être présente avant que les symptômes moteurs menant au diagnostic clinique ne se manifestent et aucun traitement curatif n'est connu à ce jour [1] [2].
 - La neurodégénérescence dopaminergique au niveau de la substance noire se projette dans le striatum par la voie nigrostriatale et mène à une perte marquée de la dopamine au cerveau [2].
 - Une baisse de l'expression de l'enzyme limitante de la synthèse de la dopamine, la tyrosine hydroxylase (TH), a été identifiée dans la MP [3].
 - Plusieurs études démontrent que la déplétion dopaminergique est aussi accompagnée par des protéinopathies. Elle se caractérise par l'accumulation de protéines agrégées ou avec une conformation anormale [4].
 - L'agrégation d'alpha-synucléine (α -syn) dans les Corps de Lewy est une protéinopathie caractéristique de la MP. Il existe d'autres agrégats protéiques impliqués dans la pathogénèse tels que la « TAR DNA-binding protein 43 » (TDP-43) [4].
- L'hypothèse est qu'il y aura une baisse des niveaux de TH et de TDP-43 phosphorylé soluble ainsi qu'une augmentation des niveaux d' α -syn et de TDP-43 phosphorylé insoluble dans le putamen humain des patients atteints de la MP en comparaison au groupe contrôle [3] [4] [5].

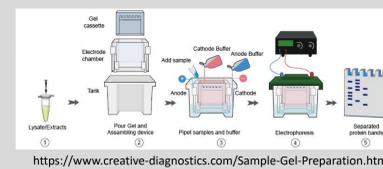
L'objectif principal consiste à décrire les protéinopathies d'alpha-synucléine, de TH et de TDP-43 dans le putamen humain de patients atteints de la MP.

MÉTHODES

Extraction protéique: Les protéines des échantillons ont été extraites en deux fractions:

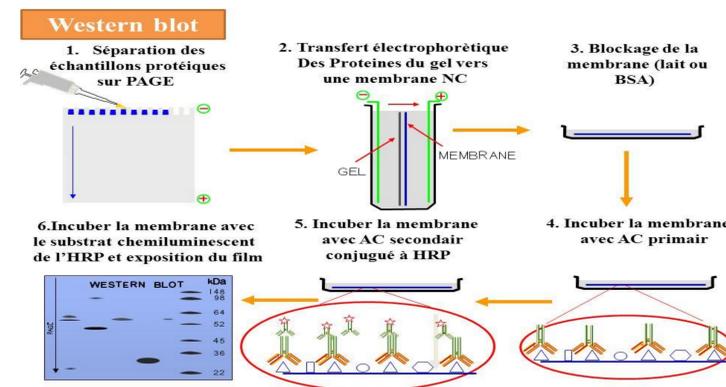
- TBS soluble: les protéines cytosoliques, inter-cellulaires et celles qui se retrouvent à l'intérieur du noyau.
- Culot (détergents-insolubles): les protéines soluble dans l'acide formique et donc probablement agrégées.

Chacune de ces fractions a été préparée dans une solution tampon à l'aide d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases, suspendues dans le tampon laemmli et dénaturé.



Immunobuvardage de type western (Western blot):

Des quantités égales de protéines ont été placées dans chaque puits et soumises à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). Ils ont migré avec un courant 150V sur des gels Tris-glycine de 10 % d'acrylamide. Ensuite, les protéines ont été transférées sur des membranes de PVDF (immobilon-p) puis ont été bloquées avec une solution de 5 % lait. Les anticorps (Ac) primaires dilués dans du SuperBlock (Thermo) ont été incubés avec les membranes, suivi par l'incubation des Ac secondaires avec les membranes. Les images ont été révélées à l'aide du système d'imagerie de chemiluminescence et fluorescence : My ECL Imager (Thermo MyECL).



RÉSULTATS

1. Alpha-Synucléine soluble: Aucun changement significatif

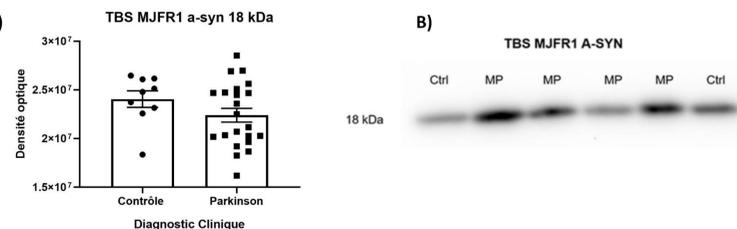


Figure 1: Quantification d' α -syn dans la fraction soluble du putamen de patients parkinsoniens et le putamen de sujets humains contrôles (Ctrl) par Western blot. (A) α -syn mesuré. (B) Exemple de Western blot.

2. TH: Baisse significative des niveaux

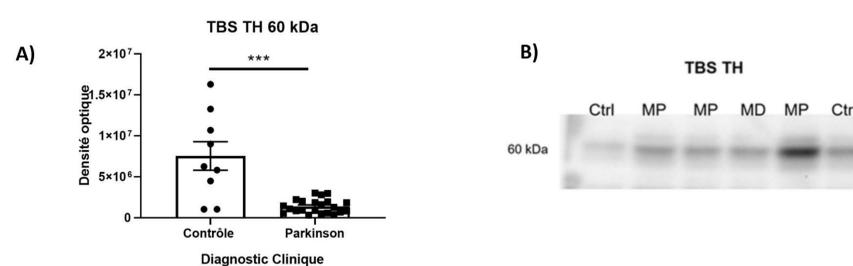


Figure 2: Quantification de TH dans la fraction soluble du putamen de patients parkinsoniens et le putamen de sujets humains contrôles (Ctrl) mesuré par Western blot. (A) TH. (B) Exemple de Western blot.

3. TDP-43 phosphorylé soluble: Augmentation significative des niveaux pour les fragments 43 kDa et 35 kDa

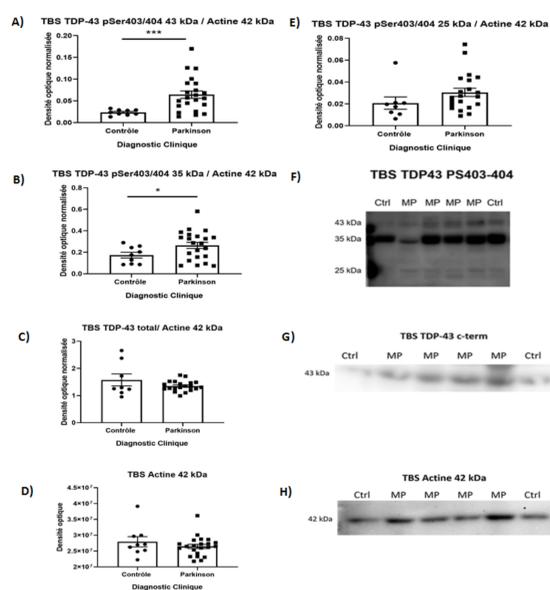


Figure 3 : Accumulation de TDP-43 phosphorylé dans la fraction soluble (TBS) du putamen de patients parkinsoniens et de sujets humains contrôles (Ctrl) mesuré par Western blot. (A, B, E) Représentation graphique des différentes hauteurs de bandes : 43 kDa (A), 35 kDa (B), 25 kDa (E) de TDP-43 phosphorylé normalisé avec l'actine. (C) Représentation graphique de TDP-43 total normalisé avec l'actine. (D) Représentation graphique d'Actine. (F, G, H) Exemple de Western blot.

* : valeur $p < 0.05$
*** : valeur $p < 0.005$

4. TDP-43 phosphorylé insoluble: Augmentation significative des niveaux pour les fragments 43 kDa

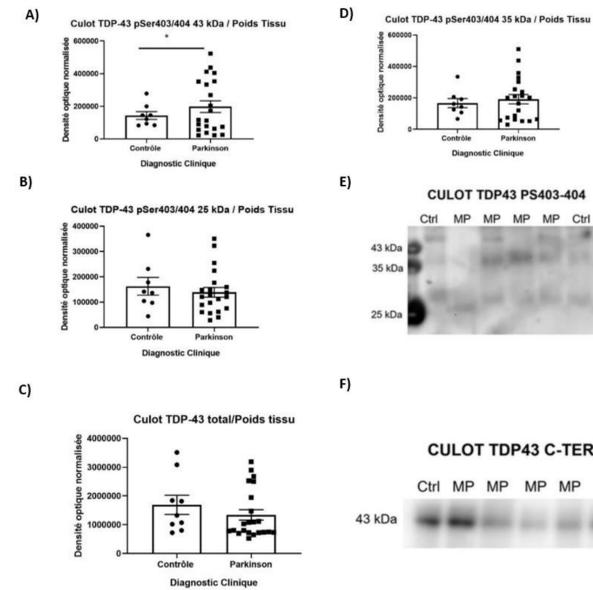


Figure 4 : Accumulation de TDP-43 phosphorylé dans la fraction détergent-insoluble (culot) du putamen de patients parkinsoniens et de sujets humains contrôles (Ctrl) mesuré par Western blot. (A,B,D) Représentation graphique des différentes hauteurs de bandes : 43 kDa (A), 35 kDa (D), 35 kDa (B) de TDP-43 phosphorylé normalisé avec le poids du tissu de départ. (C) Représentation graphique de TDP-43 total phosphorylé normalisé avec le poids du tissu de départ. (E-F) Exemple de Western blot.

* : valeur $p < 0.05$

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

- Les observations notées par rapport à TDP-43 phosphorylée ne concordent pas complètement avec les résultats attendus étant donné qu'il y avait non seulement une hausse dans les niveaux de la forme agrégée, mais aussi dans les formes nucléaire et soluble dans le cytoplasme.
- La baisse importante de TH concorde avec les résultats attendus et confirme le diagnostic de la MP.
- Une corrélation inverse a été identifiée entre la TH et le TDP-43 phosphorylé soluble et insoluble.
- Il n'y avait pas de différence statistiquement significative dans les niveaux d'alpha-synucléine dans la fraction cytoplasmique des échantillons avec la MP. Ceci est possiblement lié au fait que seuls les niveaux d'alpha-synucléine sous sa forme agrégée soient augmentés lorsqu'elle s'accumule dans les corps de Lewy.
- Ces résultats confirment donc la possibilité d'une protéinopathie provenant de la TDP-43 et l'implication de la baisse de TH dans la neuropathologie de la MP.
- La suite : examiner les niveaux d'alpha-synucléine dans sa forme insoluble, réaliser l'immunohistochimie pour permettre la localisation cellulaire, l'hybridation in situ afin d'apporter de l'information sur la distribution 2D de l'expression de l'ARNm, etc.

RÉFÉRENCES

- Müller T. Drug therapy in patients with Parkinson's disease. *Transl Neurodegener.* 2012;1(1):10. Published 2012 May 24. doi:10.1186/2047-9158-1-10
- DeMaagd G, Philip A. Parkinson's Disease and Its Management: Part 1: Disease Entity, Risk Factors, Pathophysiology, Clinical Presentation, and Diagnosis. *P T [En ligne].* 2015 [consulté le 21 août 2019];40(8):504-532
- Zhu Y, Zhang J, Zeng Y. Overview of Tyrosine Hydroxylase in Parkinson's Disease. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets [En ligne].* 2012 [consulté le 21 août 2019];11:350. Disponible : <http://www.eurekaselect.com/99090/article> doi:10.2174/187152712800792901.
- Sweeney P, Park H, Baumann M et al. Protein misfolding in neurodegenerative diseases: implications and strategies. *Transl Neurodegener [En ligne].* 2017 [consulté le 21 août 2019];6:6. Disponible : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5348787/> doi:10.1186/s40035-017-0077-5.
- Tremblay C, St-Amour I, Schneider J, Bennett DA, Calon F. Accumulation of Transactive Response DNA Binding Protein 43 in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease. *J Neuropathol Exp Neurol [En ligne].* 2011 [consulté le 21 août 2019];70(9):788-798. Disponible : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12217634>

REMERCIEMENTS



UNIVERSITÉ
LAVAL
Faculté de pharmacie

Fonds
d'enseignement et de
recherche