



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

Département : Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Science de la Nature et de la vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie moléculaire et santé

Intitulé :

**Recherche Préliminaire des Biomarqueurs des
Maladies « Alzheimer et Parkinson » dans la salive
humaine**

Présenté et soutenu par : DIB Ouadiaa

Le : 30 /06 /2016

AZIZ Djallel-eddine

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr. KHELIFI D. Professeur (UFM Constantine)

Rapporteur : Mme. BELLIL I. Maître de conférences (UFM Constantine)

Examineur : Mme. MOUAS T.N. Maître de conférences (UFM Constantine)

Année universitaire

2015-2016

DEDICACES

A toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de ce mémoire.

Tout particulièrement à ma famille, aux deux étoiles qui éclairent ma vie mes très chers parents, mes deux frères Sofiane et Hichem et ma sœur Faten : pour votre soutien quotidien sans faille, vos conseils, votre aide précieuse tout le long de mes études, votre compréhension, vos encouragements qui m'ont amené là où je suis aujourd'hui. Merci de m'avoir tant donné.

Et à tous ceux qui me sont chers...

Djallel-Eddine AZIZ

Dedicaces

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail

A la reine de ce monde, et l'héro de ma vie... (Mes chers parents).

Aucune dédicace, aucun mot ne pourraient exprimer à leur juste valeur la gratitude et l'amour que je vous porte.

Je mets entre vos mains, le fruit de longues années d'études, votre soutien et votre encouragement m'ont toujours donné de la force pour persévérer et pour prospérer dans la vie. J'ai jamais manqué à quoi que ce soit grâce à vous, Chaque réussite dans ma vie est pour vous. Dieu m'aide à vous offrir tout ce qui est fait meilleur dans ce monde, et qu'il vous procure une longue vie. Merci d'être mes parents les plus parfaits.

A mes frères Oussama, Hocine et Moussaab.

Veillez trouver dans ces lignes, le témoignage de mon affection la plus Sincère et de mon attachement le plus profond, vous êtes ma sécurité, dieu vous protège.

A mon grand-père bien aimé Mohamed el Salah Lezzar

Je n'ai jamais su t'exprimer mon estime le plus profond, je te le dis aujourd'hui à travers chaque effort fourni en ce travail.

Un effort que tu me l'as redessiné dans une image d'effort simple et facile, grâce à tes prières, grâce à la noblesse de tes pensées et grâce à la douceur de tes mots. Merci pour ton soutien perpétuel, merci de m'avoir offert le plus cher des trésors dans ce monde : ma mère....

A mes meilleurs amis, ma 2eme famille

A toi Islam Khaled Ajissi, merci d'être toujours cette personne encourageante, merci d'avoir cru en moi, et d'être présent dans tous ces joyeux ou moins joyeux moments...

A ma meilleur chkp au monde, tu es ma personne je n'ai même pas su comment te dire merci. tu es un cadeau du ciel Meriem charifi.

A Wafa Ghaoui mon amie d'enfance mon amie de toujours ma kinga qui ne cesse de me rappeler que tout est possible, tout est réalisable

A Med.T d'être cette personne speciale

A mes chères Hasna et Amina et leurs adorables petits anges (Nada tajeddine, Maria et serine)...merci pour votre soutien. A ma tante Nadjiha adorée

A ma grand-mère Hadria, cette personne qui marque l'esprit, qui m'a offert la personne la plus chère a mon cœur (mon père)

A tous ceux qui me sont chers, que je n'ai pas pu citer, à ceux qui m'aiment et qui contribuent à ma réussite et font mon bonheur de près ou de loin

Ouadiaa Dib

ABREVIATIONS

SNC	Système nerveux central
MA	Maladie d'Alzheimer
MP	Maladie de Parkinson
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
APP	Protéine précurseur de l'amyloïde
MAP	Microtubules associated proteins
A β	Beta-amyloïde
MPTP	1 méthyl-1,2,4,6 tétrahydropyridine
GB	Ganglions de la base
SNC	Substance noire pars compacta.
SNr	Substance noire pars reticulata.
GPi	Globus pallidus interne.
Gpe	Globus pallidus externe.
NST	Noyau sous thalamique
Ig	Immunoglobulines
NGF	Nerve growth factor
IRM	Résonances magnétique
FPM	Faible poids moléculaire
HPM	Haut poids moléculaire
IRS	Indice relatif de similarité
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
PAGE	polyacrylamid Gel Electrophoresis

Résumé

Les maladies neurodégénératives constituent un groupe de pathologies progressives liées à une affection au sein du tissu nerveux, qui sont largement progressés dans le monde au cours de ces dernières années. Les plus célèbres et les plus fréquentes sont la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson, la première est une lésion progressive des neurones du cortex cérébral et l'hippocampe du cerveau traduit par une démence alors que la deuxième est une atteinte spécifique du système dopaminergique entraînant des anomalies du mouvement.

L'utilisation des biomarqueurs protéiques apparaît prometteuse comme outil biologique permettant de distinguer un état médical normal d'un état pathologique et notamment dans le diagnostic précoce. L'objectif de cette étude est d'investiguer et explorer le protéome salivaire des patients atteints de la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson par l'utilisation de la technique d'électrophorèse monodimensionnelle pour la recherche des biomarqueurs salivaires de ces deux pathologies. Pour cela 7 patients ayant la maladie d'Alzheimer et 7 parkinsoniens âgés de 50 ans jusqu'à 85 ans ont été recrutés pour un prélèvement salivaire. Nous avons comparé les profils électrophorétiques obtenus des protéines salivaires du sujet sain et les malades. Les protéines salivaires sont extraites dans deux conditions différentes (dénaturantes réductrices et non dénaturantes non réductrices).

L'analyse des gels a permis de dénombrer 21 bandes protéiques de mobilités différentes dans les conditions dénaturantes et réductrices pour le cas d'Alzheimer et 25 bandes protéiques pour le cas de Parkinson, et puis 38 bandes protéiques de mobilités différentes dans les conditions non dénaturantes non réductrices pour le cas d'Alzheimer et 36 bandes protéiques pour le cas de Parkinson dans les mêmes conditions.

Afin d'apprécier numériquement la diversité de ces protéines salivaires, une étude statistique a été effectuée en calculant les fréquences, l'indice de similarité, également en établissant des diagrammes types et une classification hiérarchique des individus selon la composition des protéines salivaires.

Ces résultats préliminaires ont montré des protéines salivaires spécifiques et/ou variantes au cours des maladies d'Alzheimer et de Parkinson susceptibles d'être considérées comme des marqueurs de ces deux pathologies étudiées, ouvre des champs d'investigation nouveaux tant dans le domaine du diagnostic que dans le suivi de ces pathologies.

Mots clés : Alzheimer, Parkinson, salive, électrophorèse, diagnostique.

Summary

Neurodegenerative diseases are a group of progressive diseases linked to a disorder in the neuronal tissue, which are widely progressed in the world in recent years, the most famous and the most common are Alzheimer's and Parkinson diseases, the first is a progressive lesion of neurons in the cerebral cortex and hippocampus of the brain resulting in dementia, while the second is a specific impairment of the dopaminergic systems causing abnormal movement. The use of protein biomarkers appears promising as an organic tool to distinguish a normal medical condition of a pathologic one and especially in early diagnosis. The objective of this study is to investigate and explore the salivary proteome of patients with Alzheimer's disease and Parkinson disease, by the use of the one-dimensional electrophoresis technique for the detection of salivary biomarkers of both pathologies. For this, 7 patients with Alzheimer's disease and 7 patients with Parkinson disease, aged between 50 to 85 were recruited for a saliva sample. We compared the electrophoretic profiles obtained from saliva proteins in healthy subject and patients suffering from the 2 diseases. Salivary proteins are extracted and separated in two different conditions (Reducing and non-reducing denaturing non-denaturing). The gel's analysis allowed to count 21 protein bands of different mobilities in the denaturing and reducing conditions for the case of Alzheimer's, and 25 protein bands for the Parkinson's. and then 38 protein bands of different motilities in non-reducing non-denaturing conditions for the case of Alzheimer's, and 36 protein bands in the case of Parkinson's in the same conditions. In order to have (in numbers) the diversity of these salivary proteins, a statistical study was performed by calculating the frequency, similarity index, also establishing model charts and a hierarchical classification of individuals according to the composition of salivary proteins. Those preliminary results showed specific salivary proteins and / or variants over the Alzheimer and Parkinson diseases that may be considered markers of these pathologies studied, and open up new fields of investigation both in the diagnostic field, and the monitoring of these pathologies.

Key Words :

Alzheimer, Parkinson, Biomarkers, saliva, electrophoresis, diagnosis

الملخص

الأمراض العصبية هي مجموعة من الأمراض المعاصرة المرتبطة باضطراب في النسيج العصبي، وعرفت ارتفاعاً على نطاق واسع في العالم في السنوات الأخيرة، والأكثر شهرة والأكثر شيوعاً هي مرض الزهايمر ومرض باركنسون، الأول هو انحلال للخلايا العصبية في القشرة المخية والحصين من المخ مما يؤدي إلى الخرف، في حين أن الثاني هو ضعف محدد في أنظمة الدوبامين مما تسبب شلل في الحركة. استخدام المؤشرات الحيوية البروتينية يبدو واعداً كأداة حيوية للتمييز بين حالة عادية من حالة مرضية وخاصة في التشخيص المبكر. الهدف من هذه الدراسة هو دراسة واستكشاف بروتينوم اللعابي عند المرضى الذين يعانون من مرض الزهايمر ومرض باركنسون عن طريق استخدام تقنية الهجرة الكهربائية ذات البعد الواحد للكشف عن المؤشرات الحيوية اللعابية لهذين المرضين لهذا الغرض تم أخذ 7 أشخاص يعانون من مرض الزهايمر و7 مصابين بالباركنسون تتراوح أعمارهم بين 50-85 تم أخذ عينات من اللعاب منهم. قارنا نتائج الهجرة الكهربائية للبروتينات اللعابية بين الأشخاص المصابين مع الحالة المعافاة. يتم استخراج البروتينات اللعابية في شرطين مختلفين (مرجعة وغير مرجعة، مغيرة للحالة الطبيعية وغير مغيرة) فصل المواد الهلامية يسمح بحساب 21 شريط بروتيني من الهجرات الكهربائية المختلفة حسب شروط الطريقة لحالة من مرض الزهايمر و25 شريط بروتيني بالنسبة لحالات الباركنسون، و38 شريط بروتيني بمسافات هجرة كهربائية مختلفة في الشروط الغير محددة وغير المرجعة من شروط عدم تغيير طبيعة لحالة من مرض الزهايمر و36 شريط بروتيني لمرضى الباركنسون في ظل نفس الظروف. لكي نحدد تنوع البروتينات اللعابية نقوم براسات احصائية و نلک بحساب الترددات، مؤشر التشابه، أيضاً بإنشاء المخططات النمذجية والتصنيف الهرمي للأفراد وفقاً لتكوين البروتينات اللعابية. وأظهرت هذه النتائج الأولية بروتينات محددة أو متغيرة بالنسبة للمرضين الزهايمر وباركنسون اللعابية يمكن اعتبارها مؤشرات للمرضين المدروسين، تفتح مجالات جديدة في كل من التشخيص ومتابعة هذه الامراض

الكلمات المفتاحية:

مرض الزهايمر، باركنسون، المؤشرات الحيوية، اللعاب، الكهربائي، التشخيص

Table des matières

Table des figures

Table des tableaux

Abréviation

Résumé

Introduction 1

Chapitre 1 : revue bibliographique..... 3

I. Généralité sur le système nerveux central(SNC)..... 3

I. . L'organisation du SNC..... 3

II. La maladie d'Alzheimer..... 4

1. Définition..... 4

2. Epidémiologie 4

3. Les Facteurs de risques..... 5

4. Physiopathologie..... 6

4.1.Les plaques séniles 6

4.2.dégénérescence neurofibrillaire : protéine tau..... 6

4.3.Caractéristiques macroscopiques de MA..... 7

III. La maladie de Parkinson 7

1. Définition 7

2. Epidémiologi 8

3. Etiopathogénie..... 9

3.1.Facteurs de risque 9

3.1.1. Facteurs génétiques..... 9

3.1.2. Facteurs environnementaux..... 9

4. Physiopathologie de la maladie de Parkinson 10

4.1.Dénervation neuronale dopaminergique..... 10

4.2.Lésions non dopaminergiques..... 11

4.3.Dépigmentation du locus Niger et accumulation de corps de Lewy.....	11
---	----

IV. La salive..... 11

1. Définition.....	11
2. Composition de la salive.....	12
2.1.Composés inorganiques.....	13
2.2.Constituants organiques.....	13
2.3.Protéines extrinsèques.....	13
2.4.Protéines intrinsèques.....	13
2.5.Autres composants organiques.....	13
3. Rôle de la salive.....	14
3.1. Protection et lubrification.....	14
3.2.Digestion.....	14
3.3.Maintien du PH salivaire	14
3.4.Le mécanisme antimicrobien.....	14
4. Possibilité d'un diagnostic précoce des pathologies par la salive.....	14
v. Les biomarqueurs	15
1. Définition.....	15
2. Biomarqueurs sanguins et urinaires de la MP.....	15
2.1. Synucleine.....	15
3. Les biomarqueurs pour un diagnostic plus précis de la MA.....	16
4. Les biomarqueurs salivaires.....	16

Chapitre2 : Matériel et Methodes..... 17

I. Matériel biologique..... 17

1. Recrutement des patients	17
2. Recueil de la salive.....	17

II. Techniques d'électrophorèse..... 17

1. Extraction des protéines.....	17
----------------------------------	----

1.1. Dans les conditions dénaturantes réductrices.....	17
1.2. Conditions non dénaturantes et non réductrices.....	18
2. Electrophorèse monodimensionnelle en gel de polyacrylamide.....	18
III. Analyse des gels et étude statistique.....	18
1. Analyse des gels	18
2. Analyse statistique	18

Chapitre 3 : Résultats et discussion.....	19
--	-----------

1. Fractionnement des protéines et recherche de biomarqueurs	20
1.1. Analyse des profils électrophorétiques	20
1.1.1. Analyse des protéines salivaires dénaturées et réduites fractionnées par SDS-PAGE pour le cas d'Alzheimer	20
1.1.2. Analyse des protéines salivaires dénaturées et réduites fractionnées par SDS-PAGE pour le cas de Parkinson	22
1.1.3. Analyse des protéines salivaires non dénaturées et non réduites pour le cas de Parkinson.....	23
1.1.4. Analyse des protéines salivaires non dénaturées et non réduites pour le cas de Parkinson.....	25
2. Etude de la variabilité des protéines salivaires	28
2.1. En conditions dénaturantes et réductrices cas d'Alzheimer.....	28
2.1.1. Étude des protéines salivaires de HPM.....	28
2.1.2. Étude des protéines salivaires de FPM.....	28
2.2. En conditions dénaturantes et réductrices cas de Parkinson.....	30
2.2.1. Étude des protéines salivaires de HPM.....	30
2.2.2. Étude des protéines salivaires de FPM.....	31
2.1. Etude de la variabilité des protéines salivaires non dénaturante et non réductrice Cas d'Alzheimer.....	32
3.1.1. Étude des protéines salivaires de HPM.....	32
3.1.2. Étude des protéines salivaires de FPM.....	34
2.2. En condition non dénaturante et non réductrices Cas de Parkinson.....	35
3.2.1. Étude des protéines salivaires de HPM.....	35
3.2.2. Étude des protéines salivaires de FPM.....	36

3. Classification hiérarchique des protéines salivaires.....	38
3.1.Dendrogramme des protéines salivaires dénaturées et réduites pour le cas d'Alzheimer.....	38
3.2.Dendrogramme des protéines salivaires dénaturées et réduites pour le cas de Parkinson.....	39
3.3.Dendrogramme des protéines salivaires non dénaturées et non réduites pour le cas de d'Alzheimer.....	40
3.4.Dendrogramme des protéines salivaires non dénaturées et non réduites pour le cas de Parkinson.....	41
4. Etablissement des diagrammes type.....	42
4.1.Tableau15: Diagrammes types des protéines salivaires dans des conditions dénaturantes et réductrices pour le cas d'Alzheimer.....	44
4.2.Tableau16 : Diagrammes types des protéines salivaires dans les conditions dénaturantes et réductrices pour le cas de Parkinson.....	44
4.3.Tableau 17: Diagrammes types des protéines salivaires dans les conditions non dénaturantes et non réductrices pour le cas d'Alzheimer.....	45
4.4.Tableau18:Diagrammes types des protéines salivaires dans des conditions non dénaturantes et non réductrices pour le cas de Parkinson.....	47
5. Indice de similarité des diagrammes protéiques.....	48
5.1.Indice de similarité des protéines salivaires non dénaturées et non réduites cas d'Alzheimer	49
5.2.Indice de similarité des protéines salivaires dénaturées et réduites dans le cas de parkinson.....	49
5.3.Indice de similarité des protéines salivaires non-dénaturées et non réduites cas d'Alzheimer.....	50
5.4.Indice de similarité des protéines salivaires dénaturées et réduites Dans le cas du parkinson.....	51

<i>Chapitre 4 : Conclusion et Perspectives.....</i>	<i>53</i>
---	-----------

<i>Chapitre5 : Références bibliographiques.....</i>	<i>55</i>
---	-----------

Annexes

Table des figures

Chapitre1 : Revue Bibliographique

Figure 1 : Distribution des causes de la charge de morbidité des maladies neuropsychiatriques en Algérie (2004) [42].....	5
Figure 2 : clivage de B amyloïde par le précurseur de protéines amyloïde (Marie-Céline Jacquier, Futura-Sciences2009).....	6
Figure 3: Le précurseur de la protéine amyloïde (APP) [64].....	6
Figure 4: L'accumulation extracellulaire d'A β et l'accumulation intracellulaire de protéine Tau. [59].....	6
Figure5: Phosphorylation normal et pathologique de la protéine Tau dans la MA [86].....	7
Figure 6 : Caractéristiques macroscopiques de la MA [56].....	5
Figure7 : Comparaison entre la maladie de Parkinson et la Chorée de Huntington.....	8
Figure 9 : Corps de Lewy67.....	9

Chapitre3 : Résultats et discussion

Figure10 : profils électrophorétiques des protéines salivaires dans les conditions dénaturantes et réductrices révélées par SDS/PAGE pour le cas d'Alzheimer. 1 : témoin. 2 à 8 patients malades.....	21
Figure11 : profils électrophorétiques des protéines salivaires dans les conditions dénaturantes et réductrices révélées par SDS/PAGE pour le cas de Parkinson. 1 : témoin. 2 à 8 : patients malades.....	23
Figure12 : profils électrophorétiques des protéines salivaires dans les conditions non dénaturantes et non réductrices révélées par PAGE pour le cas d'Alzheimer. 1 : témoin. 2 à 8 : patients malades.....	25
Figure 13: profils électrophoretiques des protéines salivaires dans les conditions non dénaturantes et non réductrices révélées par PAGE pour le cas de Parkinson. 1 : témoin. 2 à 8 : patients malades.....	27
Figure14 : Dendrogramme de protéines salivaires dénaturées et réduites pour le cas d'Alzheimer.....	39
Figure15 : Dendrogramme des protéines salivaires dénaturées et réduites pour le cas de Parkinson.....	40

Figure16 : Dendrogramme des protéines salivaires non dénaturées et non réduites pour le cas de d'Alzheimer.....	41
Figure17 : Dendrogramme des protéines salivaires non dénaturées et non réduites pour le cas de Parkinson.....	42

Table des tableaux

Chapitre1 Revue Bibliographique

Tableau1 : Les propriétés physiques de la salive.....12

Tableau 2 : Composés inorganiques de la salive humaine.....13

Chapitre3: Résultats et discussion

Tableau3 : Variation des bandes protéiques B2, B9, B14 et B15.....20

Tableau4: Variation des bandes protéiques B6, B8 et B16.....22

Tableau5 : Variation des bandes protéiques B23, B27, B34 et B38.....24

Tableau6: Variation des bandes protéiques B23, B26, B29, B33 et B36.....26

Tableau 7: Variabilité des protéines salivaires de HPM en conditions dénaturantes et réductrices cas d'Alzheimer.....28

Tableau 8: Variabilité des protéines salivaires de FPM en conditions dénaturantes et réductrices cas d'Alzheimer.....29

Tableau 9: variabilité des protéines salivaires de HPM conditions dénaturantes et réductrices cas de Parkinson30

Tableau 10: variabilité des protéines salivaires de FPM conditions dénaturantes et réductrices cas de Parkinson31

Tableau 11: variabilité des protéines salivaires de HPM conditions non dénaturantes non réductrices cas d'Alzheimer.....32

Tableau 12: Variabilité des Protéines salivaires de FPM conditions non dénaturantes non réductrice cas d'Alzheimer.....34

Tableau 13 : Variabilité des Protéines salivaires de HPM conditions non dénaturantes non réductrices cas de Parkinson.....35

Tableau 14: Variabilité des Protéines salivaires de FPM conditions non dénaturantes non réductrice Parkinson.....37

Tableau15: Diagrammes types des protéines salivaires dans des conditions dénaturantes et réductrices pour le cas d'Alzheimer.....43

Tableau16 : Diagrammes types des protéines salivaires dans les conditions dénaturantes et réductrices pour le cas de Parkinson.....	44
Tableau 17: Diagrammes types des protéines salivaires dans les conditions non dénaturantes et non réductrices pour le cas d'Alzheimer.....	45
Tableau18:Diagrammes types des protéines salivaires dans des conditions non dénaturantes et non réductrices pour le cas de Parkinson.....	47
Tableau 19: Indice de similarité des protéines salivaires dénaturées et réduites cas d'Alzheimer.....	49
Tableau20 : Indice de similarité des protéines salivaires dénaturées et réduites dans le cas de parkinson	50
Tableau21 : Indice de similarité des protéines salivaires non-dénaturées et non réduites le cas d'Alzheimer	51
Tableau 22: Indice de similarité des protéines salivaires non dénaturées et non réduites dans le cas du parkinson.....	52

INTRODUCTION

« **L'Alzheimer** ... C'est un mal qui vole les cœurs, les âmes et les souvenirs. »

Nicholas Sparks

« **Parkinson** est un processus lent mais inévitable. Il est difficile de vivre avec sur une base quotidienne. La difficulté que le malade vit est qu'il se demande au quotidien « Pourrai-je ou pas survivre aujourd'hui? »

Helen Mirren

Les maladies neurodégénératives se caractérisent par la destruction progressive d'une population ciblée et délimitée de cellules nerveuses. Cette mort neuronale est plus rapide que celle observée lors du vieillissement normal et intervient dans une région précise du système nerveux central. Il peut s'agir de zones du cortex associées aux fonctions intellectuelles et émotionnelles (maladie d'Alzheimer), ou de structures profondes du cerveau davantage impliquées dans la motricité (maladie de Parkinson). Leur origine n'est pas toujours connue précisément. Si la génétique semble impliquée dans certains cas, elles surviennent la majorité du temps de manière isolée. Certains produits chimiques et toxines environnementales peuvent être la cause de ces maladies.

La maladie d'Alzheimer (MA) décrite pour la première fois en 1907 par Aloïs Alzheimer représente 75-80% de tous les cas de la démence, et affecte 3% de la population âgée plus de 65 ans [37]. La MA se définit comme une affection neurodégénérative qui entraîne une détérioration progressive et définitive des cellules nerveuses, en particulier les neurones, et induit des altérations progressives des fonctions nerveuses traduit par une démence et perte de mémoire [7].

La maladie de Parkinson (MP) est décrite pour la première fois en 1817 par un médecin anglais qui lui donne son nom. Depuis 1960, il est admis qu'il s'agit d'une affection neurodégénérative chronique, lentement évolutive, atteignant le système nerveux central et spécifiquement le système dopaminergique ce qui entraîne progressivement des anomalies du mouvement [70]. Selon des études épidémiologiques réalisées la MP touchait 4 million de personnes dans le monde en 2013[19].

Les maladies neurodégénératives et notamment la MP et la MA sont de plus en plus fréquentes, du fait du vieillissement de la population. Une personne de 90 ans a un risque sur trois de souffrir de ces maladies. La prévalence double tous les 20 ans. Le retard diagnostique dans la MA et la MP, porte préjudice aux malades en réduisant leurs chances de recevoir rapidement un traitement. De plus, certains patients sont parfois dépistés « à tort » comme atteints de la pathologie car les critères de diagnostic restent encore assez peu fiables, notamment en phase précoce. Le diagnostic précoce et spécifique de ces deux maladies est un enjeu crucial pour les patients et la recherche du fait qu'elles présentent d'une part de forte similitude avec d'autres maladies neurodégénératives et d'autre part l'absence actuelle des tests permettant de détecter avec certitude la maladie sauf après l'apparition de ses propres symptômes connus [74, 75].

L'utilisation de biomarqueurs apparaît prometteuse. Ils sont recommandés dans les nouveaux critères diagnostiques internationaux de la MA et MP, avec l'imagerie et les IRM. Un biomarqueur est une caractéristique que l'on peut doser dans les liquides biologiques et dont les variations de la concentration sont le témoin d'une pathologie. Ces variations peuvent être observées dès le stade préclinique de ces maladies donnant l'avantage d'un diagnostic précoce [5, 45].

Dans ce contexte la salive peut être considérée comme un milieu privilégié de diagnostic et/ou de suivi de l'évolution de certaines maladies et de leurs complications par la recherche de biomarqueurs salivaires [43].

L'objectif principal de ce travail consiste à explorer de manière aléatoire les protéines salivaires du sujet sain et des patients atteints de la MA et la MP puis de mener une caractérisation la plus exhaustive possible des différents biomarqueurs (protéines salivaires variantes) de ces deux pathologies. Une telle démarche fait appel autant à des méthodologies biochimiques d'extraction et de caractérisation des protéines qu'à des calculs statistiques analysant les relations existantes entre les différents patients.

Le premier chapitre de ce travail comprend une synthèse bibliographique avec une présentation générale des deux pathologies, et leur physiopathologie. La salive, les biomarqueurs et leurs relations sont aussi abordés. Le second chapitre décrit l'étude effectuée en faisant un rappel sur le matériel biologique et les différentes méthodes utilisées. Le troisième chapitre est consacré à l'exploitation des résultats ainsi que leurs interprétations. Enfin, une conclusion résumant l'essentiel de cette recherche clôture cette étude.

Revue bibliographique

I. Généralité sur le système nerveux central (SNC)

Le SNC intègre toutes sortes de messages sensoriels afférents. Il est en outre le siège des pensées, des émotions et des souvenirs. La plupart des influx nerveux qui provoquent la contraction des muscles et l'activité sécrétrice des glandes proviennent du SNC [50].

1. L'organisation du SNC

-La moelle épinière située dans le canal rachidien. Son rôle est de recevoir, enregistrer, interpréter les signaux qui parviennent de la périphérie, et l'organiser la réponse à envoyer.

-L'encéphale est en entier situé dans la boîte crânienne. Il est constitué par :

- **Le cerveau** : situé en entier dans l'espace sus-tentorial, formé de deux hémisphères droit et gauche, incomplètement séparés, reliés entre elles par un ensemble de fibres nerveuses appelées corps calleux.
- **Le cortex**, (substance grise) est la partie extérieure, La partie intérieure, les axones myélinisés (substance blanche) (SB) [36].

Le cortex contient plusieurs aires :

-l'aire motrice commande le mouvement du muscle

-aire associative non spécifiques ingèrent les informations des aires sensorielles et motrices

-les champs sensoriels reçoivent les entrées sensorielles et les convertissent en perception (conscience) [12].

- **Le système limbique** : se situe à la périphérie des hémisphères cérébraux après le cortex. Le système limbique est donc la couche du milieu [12].
- **Les noyaux gris centraux** : ganglions de la base, ils sont un relais pour les axones provenant de la moelle épinière ou du cortex. Leur atteinte est susceptible d'entraîner un tremblement et une rigidité des mouvements (la maladie de Parkinson).
- **Le thalamus** : est constitué de neurones qui relie différentes parties de l'encéphale entre elles. -assure la régulation de la conscience, de la vigilance et du sommeil.
- **L'hypothalamus** : aide à la régulation du milieu interne de l'organisme et de certains aspects du comportement.
- **Amygdale** : responsables de l'émotion et la mémoire.
- **Hippocampe** : Structure corticale ancienne bilatérale et symétrique, du système limbique ; repliée sur elle-même et face médiane du lobe temporal.

L'atteinte de ces deux dernières structures provoque la maladie d'Alzheimer (MA).

- **Tronc cérébral**

Située au niveau de la fosse postérieure entre le cerveau et la moelle en distingue trois

niveaux ; le mésencéphale, la protubérance annulaire, et le bulbe rachidien. Il assure le maintien de la conscience, la régulation des cycles biologiques, le contrôle de la respiration, du rythme cardiaque. Lieu d'émergence de la majorité des nerfs crâniens [54].

- **Le cervelet**

Situé sous le lobe occipital, en arrière du tronc cérébral et relié au cerveau par les pédoncules cérébelleux. Il est impliqué dans la coordination des mouvements, la marche et station debout et le tonus [49].

II. La maladie d'Alzheimer

1. Définition

La maladie d'Alzheimer, fut initialement décrite par le médecin allemand Alois Alzheimer en 1906, est une maladie neurodégénérative « atrophie cérébrale généralisée progressive présénile entraînant l'apparition d'une démence lentement évolutive. C'est donc la perte irréversible des fonctions mentales et notamment de la mémoire [7]. Elle est considérée comme la cause la plus fréquente de démence chez l'être humain et elle n'est point la conséquence du processus normal du vieillissement, mais elle est dû à l'accumulation des protéines anormales dans le cerveau.

La démence de type Alzheimer a deux formes présentant les mêmes caractéristiques anatomopathologiques qui sont les plaques séniles dont le constituant majeur est le peptide A β et les dégénérescences neurofibrillaire dont le constituant important est la protéine Tau [27].

2. Epidémiologie

La maladie d'Alzheimer est la cause de démence la plus fréquente et constitue aujourd'hui un enjeu de santé publique majeur

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) s'attend à un plus grand nombre de personnes souffrant d'Alzheimer à cause de la longévité. Plus de 35,6 millions de personnes dans le monde sont touchées par la démence. Chaque année, on dénombre 7,7 millions de nouveaux cas. Selon les prévisions de l'OMS, le nombre de malades devrait presque doubler tous les 20 ans, pour passer à 65,7 millions en 2030 et à 115,4 millions en 2050 [36]. La MA est la cause la plus fréquente des démences chez les sujets âgés. Mais touche aussi les sujets jeunes.

Plus de 100 000 personnes sont atteintes par le syndrome d'Alzheimer en Algérie. C'est une estimation nationale réelle, même avec la réception de 10 000 malades seulement en consultation [66].

La maladie d'Alzheimer touche 3 % de la population âgée de plus de 65 ans : 2 à 5 % autour de 65 ans à 12-20 % environ au-delà de 85 ans [37]. C'est la cause la plus fréquente de démence chez le sujet âgé : elle représente plus de 70 % des démences en France [27].

Une étude effectuée en Algérie en 2004 signale que la MA représente 0,416 % des maladies neuropsychiatrique (figure1)

3. Les Facteurs de risques

- **L'âge** : le facteur de risque le plus évoqué dans les études épidémiologiques. Le nombre de nouveaux cas de malades Alzheimer augmente de façon exponentielle avec l'avancée dans l'âge après 65 ans [29]. Une étude américaine portant chez les personnes très âgées a récemment montré que le taux d'incidence de la démence augmente de 12,7% par an chez les personnes âgées entre 90 et 94 ans, de 21,2% par an chez les personnes âgées entre 95 et 99 ans, pour atteindre 40,7% par an chez les âgés de plus de 100 ans [41].
- **Les antécédents familiaux** : la présence d'une démence chez un parent multiplierait par deux ou quatre le risque de démence [44].
- **Les facteurs génétiques** : la mutation de trois gènes situés sur les chromosomes 14 et 21 serait responsable de la moitié des formes familiales de la maladie d'Alzheimer (forme précoce) [59]. De plus, la présence de l'allèle E4 de l'apolipoprotéine E (apoE) serait également un facteur de risque de la maladie d'Alzheimer.
- **Des facteurs de risque vasculaires** comme l'obésité, l'hypertension, le diabète de type 2 [34]. Les antécédents d'accidents vasculaires et les traumatismes crâniens pourraient également accroître le risque de maladie d'Alzheimer, du fait de la réduction du débit sanguin.
- **Le sexe** : la maladie touche deux fois plus de femmes que d'hommes. Les changements hormonaux qui surviennent à la ménopause, particulièrement la diminution de l'oestrogène a été évoquée pour expliquer le phénomène.

4. Physiopathologie

La maladie d'Alzheimer est caractérisée d'un point de vue global par une perte de neurones (dégénérescence corticale). La nature neurodégénérative de la maladie se traduit par des lésions histopathologiques bien précises qui sont les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires et qui sont associées à une perte neuronale avec atrophie corticale. Ces lésions cérébrales, dont l'association est caractéristique de la maladie. Une troisième lésion associée à la maladie d'Alzheimer est l'atrophie corticale.

4.1. Les plaques séniles

(Ou plaques amyloïdes), observées au microscope sont de petites sphères comprenant un dépôt dense entouré de prolongements de neurones dégénérésents. Le centre de la plaque contient un enchevêtrement de fibrilles. Le principal constituant des plaques séniles est un peptide de 42-43 acides aminés appelé peptide beta amyloïde [67]. Le peptide beta est issu du clivage enzymatique de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP), (figure3) une protéine transmembranaire dont on ignore encore la fonction. Les peptides amyloïdes sont présents normalement dans l'organisme et circulent dans le liquide céphalo-rachidien ou dans le sang. Chez les malades, les peptides beta amyloïde forment les plaques séniles en s'agrégeant en feuillets. Lorsque des plaques séniles commencent à se former, elles favorisent le recrutement de nouveaux peptides amyloïdes "longs" pour former des enchevêtrements, d'où la multiplication rapide des plaques séniles [57].

Le rôle exact de la beta amyloïde est de couper la communication synaptique Dans les neurones. Elle agit principalement au niveau cholinergique. Dans un premier temps, elle bloque la recapture de choline, indispensable à la synthèse de l'un des plus importants neurotransmetteurs impliqués dans la mémorisation : l'acétylcholine. Ensuite, la protéine bêta-amyloïde inhibe l'enzyme nécessaire à la re-transformation de la choline en acétylcholine [13] (Figure 2). Selon l'hypothèse de la "cascade amyloïde", il semblerait que l'accumulation de ce peptide amyloïde induise une toxicité pour les cellules nerveuses, se traduisant par l'augmentation de la phosphorylation d'une protéine de structure des neurones, la protéine tau.

4.2. Dégénérescence neurofibrillaire : protéine tau

C'est la seconde lésion histopathologique caractéristique de la maladie d'Alzheimer. Il s'agit de conglomérats de filaments anormaux constitués d'une forme hyperphosphorylée de la protéine tau (une protéine MAP microtubules associated proteins) permet l'assemblage de la tubuline en microtubules en diminuant l'instabilité de la tubuline. Impliquées dans le transport axonal [25].

La protéine tau normalement phosphorylée joue un rôle dans la polymérisation-dépolymérisation des microtubules du cytosquelette neuronal et dans le transport axonal [32]. En quantité excessive, la protéine tau hyperphosphorylée peut perturber le fonctionnement des neurones et entraîner leur destruction : il y a dès lors ce qu'on appelle « dégénérescence neurofibrillaire ». Celle-ci n'est pas distribuée au hasard, mais suit les voies de connexions intracorticales.

La phosphorylation de tau (figure 5) est réglée par de multiples kinases (par ex. GSK-3 β et CDK5) et phosphatases (par ex. PP-1 et PP-2A). La phosphorylation anormale associée à la maladie d'Alzheimer peut être due à une augmentation de l'activité kinase ou à une diminution de l'activité phosphatase. L'atteinte de ce système vital entraîne la dégénérescence du neurone. Le taux de la forme anormalement clivée de la protéine tau s'avère être proportionnel à l'atteinte des capacités cognitives chez les patients [33, 56].

Les connaissances actuelles sur la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer ne permettent pas d'établir si l'hyperphosphorylation de tau est une cause ou une conséquence de la démence.

4.3. Caractéristiques macroscopiques de MA

Lors de la MA, le volume du cerveau se diminue de façon hétérogène, cette diminution concerne principalement la région hippocampique, l'amygdale temporale et le pôle du lobe temporal. Cette atrophie du cortex ne porte pas seulement sur la substance grise, elle concerne également la substance blanche (où passent les axones et les dendrites des neurones situés dans la substance grise). Le cortex tel qu'il peut être visualisé en coupe apparaît comme un long ruban, replié sur lui-même en circonvolutions

[11]. (Figure 6)

III. La maladie de Parkinson

1. Définition

La maladie de Parkinson (MP) est une maladie neurodégénérative qui se manifeste principalement par des troubles du mouvement. Contrairement à la situation qui existe dans beaucoup d'autres cas d'atteintes neurologiques, l'anomalie à la base de la maladie de Parkinson est connue [72]. Elle s'explique par la perte de cellules dans une partie du cerveau que l'on nomme la substance noire. Ces cellules sont responsables de la production d'un élément chimique appelé dopamine, qui agit comme messager entre les cellules du cerveau impliquées dans le contrôle du mouvement, d'où son appellation de neurotransmetteur. On estime qu'au moment où le diagnostic est prononcé, environ 80 % des cellules produisant la dopamine ont déjà cessé de fonctionner. La diminution significative de dopamine qui en résulte entraîne ainsi l'apparition des symptômes de la maladie de Parkinson [49].

Autrefois, la maladie de Parkinson était considérée comme une maladie purement sporadique qui est idiopathique, mais depuis quelques années, avec l'avènement de nouvelles technologies les scientifiques ont montré une 2^{ème} forme qui est la forme héréditaire ou familiale mais la première reste toujours plus abondante que la deuxième [42].

Les premiers signes de la MP, à savoir des tremblements, une difficulté à réaliser des mouvements et une rigidité, n'apparaissent que dans les cinq à dix ans après le début de la dégénérescence des neurones

Comme elle entraîne un handicap physique, cette maladie neuro dégénérative réduit fortement l'autonomie des personnes atteintes à cause par exemple de difficultés à se déplacer et d'une réduction de la vitesse de réalisation des gestes de la vie quotidienne [76].

2. Epidémiologie

La maladie de Parkinson est la maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer [23]. Sa prévalence dans la population générale est de 827,5 pour 100 000, s'élevant à 2 % au-delà de 65 ans [19]. Schématiquement les plus basses prévalences sont observées dans les pays orientaux et africains alors que les plus hautes concernent les pays occidentaux. Le risque vie entière de MP est d'environ 1,5 % [23].

Compte tenu du vieillissement de la population mondiale et sous l'hypothèse d'une incidence constante, une nette augmentation de la prévalence de la maladie de Parkinson est attendue [23].

La MP peut survenir à tout âge mais débute en moyenne entre 55 et 65 ans. Dans 10 % des cas le début est précoce, avant 40 ans [19]. Sa fréquence est 1,5 fois plus élevée chez les hommes que chez les femmes [23], ce qui pourrait être expliqué par l'exposition aux facteurs environnementaux toxiques supérieure chez les hommes [9].

On retiendra que la Maladie de Parkinson est 2 à 5 fois plus fréquente dans les pays industrialisés que dans les pays en voie de développement.

C'est la 2ème cause de handicap moteur chez les sujets âgés après les AVC. La durée moyenne de la maladie était de 9 à 10 ans avant la mise en place des traitements par Lévodopa (L-Dopa). Elle est actuellement de 14 à 15 ans [15].

3. Etiopathogénie

Dans la plupart des cas, la cause est vraisemblablement complexe ou multifactorielle et fait intervenir de multiples facteurs de risques, qu'ils soient génétiques ou environnementaux. [23].

3.1.Facteurs de risque

3.1.1. Facteurs génétiques

Seule une minorité des cas de Parkinson est expliquée par des facteurs uniques, en particulier des facteurs génétiques, les formes « familiales » ne représentant que 5 à 15 % des cas, essentiellement des formes précoces pour lesquelles quelques locus et gènes ont été identifiés [9]. Il s'agit de treize loci et neuf gènes, soit à des formes autosomiques dominantes (SNCA/PARK1 et PARK 4 pour le gène de l'alpha-synucléine;

UCHL1/PARK5; LRRK2/PARK8 codant pour la protéine kinase dardarine; GIGYF2/PARK11; Omi/HTRA2/PARK13), soit à des formes autosomiques récessives (Parkine/PARK2 pour l'enzyme ligase E3 de l'ubiquitine; PINK1/PARK6 pour une kinase des mitochondries; DJ-1/PARK7; ATP13A2/PARK9). Ces mutations sont pour la plupart en cause dans la formation des corps de Lewy.

3.1.2. Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux les plus fréquemment cités sont les substances neurotoxiques. La plus classique est le MPTP (1 méthyl-1,2,4,6 tétrahydropyridine), substance dérivée de la mépéridine présente dans une forme d'héroïne frelatée, qui entraîne des symptômes typiques de la maladie de Parkinson. Le MPTP est un toxique sélectif pour les neurones dopaminergiques par inhibition du complexe 1 de leur chaîne respiratoire mitochondriale. Des substances proches du MPTP, comme le paraquat ou la roténone, respectivement herbicide et pesticide sont également en cause, de même que les insecticides organochlorés tels que le lindane et le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT). Ces composants conduiraient à la mort neuronale par augmentation du stress oxydatif et formation de corps de Lewy. La maladie de Parkinson est reconnue comme maladie professionnelle chez les agriculteurs par décret au journal officiel le 6 mai 2012[23].

L'exposition aux solvants organiques, aux métaux lourds (plomb, mercure, cadmium) et au manganèse (profession de soudeur) est également en cause dans le déclenchement d'une maladie de Parkinson [31].

4. Physiopathologie de la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est la conséquence clinique d'une destruction, relativement sélective, du système dopaminergique nigrostriatal avec l'atteinte d'autres systèmes neuronaux non dopaminergiques dans une moindre mesure.

4.1.Dénervation neuronale dopaminergique

Les symptômes de la maladie de Parkinson sont principalement le résultat de la dépigmentation des neurones dopaminergiques de la pars compacta de la substance noire des ganglions de la base(GB). Ces neurones responsables de la production de dopamine (neurotransmetteur responsable de l'activation des neurones de GB et l'hypothalamus) se projettent vers le striatum et leur dégénérescence vient perturber l'activité neuronale des GB qui régulent, entre autres, les mouvements. La dégénération dans les faits provoque une inhibition des voies directes et une

excitation des voies indirectes, alors que ces deux voies sont régulées de façon opposée chez le sujet sain [61].

- la voie directe : activatrice et modulée par la dopamine qui stimule les récepteurs D1 activés par la substance P. L'effet global est stimulant sur le cortex.

- la voie indirecte : inhibitrice et modulée par la dopamine qui stimule les récepteurs D2 activés par l'enképhaline. La modulation de la dopamine sur la voie indirecte inhibitrice elle-même se transforme en effet stimulant [70].

Dans le cadre de la maladie de Parkinson, les troubles moteurs proviennent du déficit dopaminergique de la substantia nigra sur les récepteurs du putamen. L'absence de dopamine provoque une inhibition renforcée du thalamus sur le cortex frontal (responsable de la réalisation du mouvement), résultant d'une hausse du tonus inhibiteur du GPi, elle-même résultat conjoint de la sur-stimulation du NST (voie indirecte) et une absence d'inhibition du GPe (voie directe) (figure 7). En remontant les circuits neuronaux, on voit comment le déficit en dopamine et les différents récepteurs dopaminergiques (D1 pour la voie directe et D2 pour la voie indirecte) sont responsables de la symptomatologie. Les dommages de la voie indirecte sont responsables de l'incapacité d'adapter les programmes moteurs pour celui qui est désiré à un instant donné : c'est-à-dire à un effet hypo-kinétique inhibant le mouvement. Les perturbations de la voie directe, elles, facilitent le mouvement [30].

4.2. Lésions non dopaminergiques

Bien que le cœur des lésions trouvées durant la maladie de Parkinson soit l'atteinte du système dopaminergique nigrostriatal, cette pathologie ne se résume pas à la simple destruction de ce système dopaminergique. Il apparaît ainsi que d'autres systèmes dopaminergiques peuvent être touchés avec une sévérité généralement moindre, ainsi que d'autres systèmes non dopaminergiques tels des systèmes noradrénergiques, des systèmes cholinergiques et des systèmes sérotoninergiques [31].

4.3. Dépigmentation du locus Niger et accumulation de corps de Lewy

La dépopulation neuronale s'accompagne d'anomalies histologiques, les corps de Lewy. Il s'agit d'agrégats d'alpha-synucléine insolubles formant des inclusions neuronales éosinophiles intracytoplasmiques dans de nombreuses zones du cerveau [4]. L'accumulation anormale de ce composant au sein des corps neuronaux est due au dysfonctionnement du système d'épuration cellulaire (complexe ubiquitine protéasome) à évacuer cette protéine.

L'agrégation anormale d'alpha-synucléine jouerait un rôle clé dans la dégénérescence neuronale. Il a été proposé que cette protéine produite en excès, ou mutée, comme dans certaines

formes familiales de MP de transmission autosomique dominante pourrait acquérir une nouvelle fonction, toxique, en s'assemblant en protofibrilles puis fibrilles amyloïdes, provoquant une neurodégénérescence [58].

IV. La salive

1. Définition

La salive est le liquide biologique sécrété à l'intérieur de la bouche par les glandes salivaires (glandes annexes de la cavité buccale). C'est un fluide tissulaire riche et complexe qui présente un aspect liquidien, incolore, insipide, filant [53]. La salive est impliquée dans une grande variété de processus biologiques essentiels au bon déroulement des fonctions orales. Sa production est assurée, dès le huitième mois in utero, par un ensemble de glandes dites majeures (glandes parotides, submandibulaires et sublinguales) et mineures (disséminées dans la muqueuse buccale).

Les propriétés physiques de la salive sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau1 : Les propriétés physiques de la salive.

PH : la compris entre 6,5 – 7,4. [26].
Viscosité : varie selon l'origine :1,5 centipoises pour les parotides 3,4 centipoises pour les submandibulaires 13,4 centipoises pour les sublinguales.[47]
Débitmétrie La production journalière est de 0,5 à 1 L chez un sujet sain (Pedersen, 2007). Le flux salivaire varie entre 0,3 et 0,5 ml/min (la salive au repos) et entre 1 et 1,5 ml/min (la salive stimulée) (Pedersen, 2007). [60].

2. Composition de la salive

La salive totale est composée d'environ 99% d'eau et 1% des composés inorganiques et organiques. Elle est constituée d'un mélange complexe de sécrétions produites par les glandes salivaires, les résidus alimentaires, du fluide gingival, de cellules épithéliales et de nombreux électrolytes d'origine plasmatique [39].

2.1. Composés inorganiques

Les principaux composés inorganiques sont d'une part le sodium, les bicarbonates et le chlorure dont les concentrations sont basses au repos et augmentent progressivement après stimulation, et d'autre part, le potassium, le magnésium et le phosphate dont les concentrations sont élevées au repos et diminuent progressivement après stimulation.

A l'exception des bicarbonates, ces ions proviennent directement du sang. De façon générale, leur concentration salivaire est inférieure à la concentration plasmatique, à l'exception du calcium et le phosphate qui a une concentration 2 à 3 fois plus élevée dans la salive [73].

Tableau 2 : Composés inorganiques de la salive humaine

Ion	Non-stimulée (mEq/l)	Stimulée (mEq/l)	Plasma (mEq/l)
Na^+	2,7	54,8	143,3
K^+	46,3	18,7	4,1
Cl^-	31,5	35,9	100,9
HCO_3^-	0,6	29,7	27,5

Na^+ : sodium ; K^+ : potassium ; Cl^- chlore ; HCO_3^- : bicarbonate

2.2. Constituants organiques

L'essentiel des composants organiques de la salive est représenté par deux catégories de protéines : les protéines extrinsèques issues du sérum, et les protéines intrinsèques, synthétisées par les glandes salivaires. Plus de 1166 protéines ont été identifiées à ce jour par diverses approches protéomiques [17]. La nature et le rôle précis de nombre d'entre elles sont encore inconnus. Il y a environ 2,5 grammes de protéines dans 1 litre de salive émise à faible débit. La concentration en protéines augmente en général avec le débit salivaire [40].

2.3. Protéines extrinsèques

Le taux de protéines extrinsèques (sériques) passant dans la salive est assez élevé (20% des protéines totales), et leur concentration décroît lorsque le débit salivaire augmente. Elles sont représentées par des immunoglobulines de type IgA, IgG, IgM dont : IgA présente la principale immunoglobuline de la salive, des albumines sériques 5 à 10% des protéines totales, auxquelles s'ajoutent des alpha- et β -globulines et des lactoferrines [40].

2.4. Protéines intrinsèques

Elles sont synthétisées par les glandes salivaires elles-mêmes et sont très nombreuses incluant entre autres des glycoprotéines, telles que les mucines ou les IgA, les protéines riches en proline, des enzymes telles que l'amylase ou l'anhydrase carbonique VI, les lipases, les lysozymes, les

kallicréines, les cystatines, les histatines et des facteurs de croissance principalement le nerve growth factor (NGF) et l'epithelial growth factor (EGF) [69, 73].

2.5. Autres composants organiques

De plus, la glande submandibulaire semble être le siège d'une synthèse hormonale concernant principalement les androgènes, l'insuline et les hormones thyroïdiennes.

On retrouve en faible concentration de l'urée, du glucose, de la créatinine, du cholestérol [3]. Plus de 3000 acides ribonucléiques ARN messagers ont été identifiés, leur dosage pourrait être un futur marqueur diagnostique des cancers de la sphère buccale.

3. Rôle de la salive

La salive a de multiples fonctions : mécanique, d'humidification et lubrification, protectrice, digestive, trophique pour les dents et fonction d'élimination et de détoxification.

3.1. Protection et lubrification

La salive est la cause essentielle de la très grande résistance de la cavité buccale à l'infection. Son action est aussi bien physique, car elle permet l'auto-nettoyage de la cavité buccale et l'humidification des muqueuses, qu'antibactérienne par la présence de lysozyme, et d'immunoglobulines.

3.2. Digestion

L'action chimique de la salive transforme certains composants des aliments pour les rendre plus facilement assimilables par notre organisme. Elle ramollit aussi les aliments, facilite la mastication et la déglutition [35, 55]. Deux principales enzymes salivaires sont impliquées, l' α -amylase et la lipase [60].

3.3. Maintien du PH salivaire

Le pouvoir tampon de la salive dépend des ions bicarbonates, des ions phosphates et des peptides riches en histidine (PRH) qui régulent également le pH de la plaque dentaire [52].

3.4. Propriétés antimicrobiennes

Le mécanisme antimicrobien se résume souvent en une interaction entre les molécules de surface des éléments pathogènes et les cellules immunitaires afin de faciliter leur reconnaissance, puis leur élimination [55].

4. Possibilité d'un diagnostic précoce des pathologies par la salive

Les scientifiques ont identifié toutes les protéines de la salive humaine, une avancée qui pourrait bientôt offrir un nouvel outil de diagnostic précoce des différentes pathologies avant même l'apparition des symptômes pour certains cas [71].

Des équipes de recherche ont pu grâce à une technique de spectrométrie de masse identifier la totalité des 1.116 différentes protéines se trouvant dans la salive [17]. Cette découverte pourrait bientôt conduire à de nouveaux tests salivaires plus simples et plus pratiques que les analyses de sang, selon les auteurs qui soulignent que plus d'un tiers des protéines de la salive se trouvent également dans le sang.

La recherche internationale tente de trouver un moyen de diagnostiquer les maladies neurodégénératives plus tôt notamment l'Alzheimer. Un test salivaire pourrait repérer les substances cérébrales anormales avant les premiers symptômes [14].

v. Les biomarqueurs

1. Définition

Selon la définition proposée par l'institut national de santé un biomarqueur est : « une caractéristique qui est objectivement mesurée et évaluée comme un indicateur de processus biologiques normaux ou pathologiques, ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique » [48].

En général les biomarqueurs correspondent à des molécules ou des protéines dosables dans les fluides biologiques et détectables dans l'urine permettant un dosage invasif et rapide qui s'expriment de manière anormale soit par sa sur-expressivité, soit par son absence [28].

Cette définition introduit deux notions importantes : `

- un biomarqueur doit être mesuré avec fiabilité et précision.
- le caractère potentiellement indirect du biomarqueur qui est porté par un ou plusieurs paramètres biologiques (caractéristiques génétiques, protéines, métabolites...) qui permettent de caractériser un état physiologique, un état pathologique, l'évolution d'une maladie ou la réponse à un traitement.

2. Biomarqueurs sanguins et urinaires de la MP

2.1. Synucleine

Le dosage de l'alpha-synucleine sérique ou sanguine dans la MP est justifié par le fait qu'une faible quantité d'alpha-synucleine est physiologiquement présente dans le plasma [22] et les plaquettes [46]. S'il n'existe aucune différence quantitative [46], une étude récente montre que la présence d'oligomères solubles de l'alpha-synucleine discrimine faiblement les parkinsoniens des témoins [62], avec une sensibilité et une spécificité de 53 et 85 % respectivement. La mise en évidence de ces oligomères est fondée sur une technique d'ELISA en conditions non dénaturantes. Ces résultats sont intéressants dans le contexte général des maladies neurodégénératives, qui sont toutes caractérisées par la présence d'agrégats protéiques

neuronaux ou gliaux. Les oligomères solubles, première étape sur la voie de formation des polymères insolubles, sont les formes présumées toxiques pour le neurone [64].

3. Les biomarqueurs pour un diagnostic plus précis de la MA

Actuellement, l'utilisation de biomarqueurs est recommandée dans les nouveaux critères diagnostiques internationaux de la maladie d'Alzheimer, avec l'imagerie.

Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, ils reflètent des lésions neuropathologiques caractéristiques. Trois biomarqueurs sont dosés dans le liquide céphalorachidien : le peptide amyloïde A β -24-1, la protéine tau totale (ou protéine MAPT pour Microtubule Associated Protéin Tau) et les protéines tau hyperphosphorylées (Ptau) [8, 45].

En combinant les données de ces trois indicateurs, on peut plus aisément offrir un diagnostic plus spécifique de la maladie d'Alzheimer : le peptide amyloïde A β -24-1 abaissé, la protéine tau élevée (2 à 3 \times la normale) et les protéines tau hyperphosphorylées augmentées sont des critères en faveur de diagnostic de MA. "L'utilisation combinée de ces biomarqueurs va se généraliser [24].

4. Les biomarqueurs salivaires

Les experts sont tous persuadés, désormais, que les processus biologiques à l'origine de la maladie d'Alzheimer et de Parkinson commencent des années avant que les problèmes de mémoire ou de confusion deviennent perceptibles pour les malades d'Alzheimer et le tremblement de repos et la rigidité pour les parkinsoniens.

Lors de la Conférence annuelle de l'Association internationale de la maladie d'Alzheimer, les chercheurs ont annoncé qu'ils avaient découvert certaines substances présentes dans la salive et qui pourraient être des marqueurs de la maladie. La mise au point d'un test salivaire permettrait de distinguer les personnes qui souffrent de vieillissement normal, celles atteintes de démence cognitive légère et celles qui souffrent de la maladie d'Alzheimer.

La maladie de Parkinson pourrait être diagnostiquée à un stade précoce de son évolution ce qui permet aussi aux médecins d'exclure d'autres maladies présentant des symptômes de fortes similitudes avec la MP. Tout a commencé par des analyses profondes de la salive des patients atteints de la maladie de Parkinson, des chercheurs ont constaté que les tests salivaires de ces personnes décryptent une protéine anormale dont la présence semblait être liée à leur maladie [5], dont plusieurs études autoptiques ont permis d'établir que les glandes sous-maxillaires sont atteintes par la pathologie de Lewy chez la quasi-totalité des patients parkinsoniens [5, 16].

Matériel et Méthodes

I. Matériel biologique

1. Recrutement des patients

Notre étude a porté sur 14 patients, sept parmi eux sont atteints de la maladie d'Alzheimer, et les sept qui restent sont atteints de la maladie de Parkinson, ces patients provenant du service de neurologie Médicale du CHU de Constantine. Les patients recrutés sont âgés entre 60 et 85 ans dont la pathologie est au stade initial ou avancé. Les patients ayant une pathologie non régulée et ne présentant pas une bonne hygiène buccale ont été exclus de l'étude. Ces deux populations ont été comparées à un sujets sains, sans pathologies connues et possédant une bonne hygiène buccale.

2. Recueil de la salive

Pour le recueil de la salive nous avons adopté la méthode décrite par Hirtz et al. (2005) avec quelques modifications. La salive totale est prélevée le matin, 2 heures après le petit déjeuner (environ 10 heures du matin) après que le patient se soit brossé les dents avec une brosse à dent dépourvu de dentifrice. Afin de favoriser la salivation, le patient doit boire un verre d'eau 15 minutes avant le prélèvement, et mâcher un petit bout de parafilm (environ 3 cm²), pendant quelques minutes. Trois ml de salive totale sont ainsi prélevés dans des tubes eppendorf stériles. Les échantillons salivaires sont ensuite centrifugés à 10000 x g pendant 15 minutes afin de supprimer les mucines et les débris cellulaires et alimentaires encore présents dans la salive. Une fois prélevé, le surnageant est immédiatement congelé (-20°C) jusqu'aux analyses.

II. Techniques d'électrophorèse

1. Extraction des protéines

L'extraction des protéines a été réalisée à partir de la salive des patientes malades et du sujet sains obtenue après centrifugation de la salive totale.

1.1. Dans les conditions dénaturantes réductrices

100 µ de salive des patients malades et du sujet sain sont mélangés avec 75 µ de solution d'extraction contenant 35% (V/V) de glycérol, 22% (V/V) de tri/HCL 1M pH 6.8, 43% (V/V) d'eau distillée, 7%(P/V) de SDS et quelques grains de bleu de bromophenol 2.5% (V/V) de β-mecrptoethanol sont rajoutés au mélange pour réduire les protéines salivaires. Après agitation pendant 1h à température ambiante, les mélanges sont incubés à 65°C pendant 30 minutes puis centrifugés à 10000t/min pendant 1 minute. Les surnageant contenant les protéines salivaires dissociées et réduites dont récupérés.

1.2. Dans les conditions non dénaturantes et non réductrices

100 µ de salive des patients malades et du sujet sain sont mélangés avec 75 µ de solution d'extraction précédemment décrite, mais sans l'agent dénaturant (SDS) et sans le réducteur (β-

mecraptoethanol). Le mélange est agité 1h à température ambiante, puis centrifugés à 10000t/min pendant 1 minute. Les surnageant contenant les protéines salivaires non dissociées et non réduites sont récupérés.

2. Electrophorèse monodimensionnelle en gel de polyacrylamide

Aux différentes étapes d'extraction, la composition protéique des deux conditions est caractérisée par migration électrophorétique en gel de polyacrylamide de 1,5 mm d'épaisseur en condition dénaturante (présence de SDS) et pour la deuxième extraction en condition non dénaturantes (absence de SDS) avec un système vertical.

L'électrophorèse est réalisée suivant la méthode de Laemmli (1970) modifiée par Singh et al. (1991). Le gel de séparation contient 12,56% de polyacrylamide et le gel d'alignement 2,88%. Les marqueurs. Les échantillons sont déposés à raison de 50µl par puits. La migration est effectuée à 40 mA par gel dans un tampon Tris 25 mM pH 8,3 contenant 1,4 % (p/v) de glycine et 0,1% (p/v) de SDS. Une fois la migration électrophorétique achevée, le gel est révélé au moyen d'une coloration au Bleu de Coomassie à 12% (p/v) de TCA et 5%(v/v) de solution mère de Bleu de Coomassie R250 à 1% dans l'éthanol pendant toute la nuit. Les gels sont colorés toute la nuit avec la solution de coloration. Ils sont enfin décolorés dans l'eau de robinet.

III. Analyse des gels et étude statistique

1. Analyse des gels

Il s'agit d'une lecture biochimique qui consiste à déterminer et révéler la mobilité de la bande considérée comme biomarqueur et à de chaque bande décelable dans le gel. Le traitement des données d'électrophorèse fait appel au calcul des indices de similarité.

2. Analyse statistique :

Le traitement des données a fait appel à des méthodes statistiques. Les fréquences et les indices de similarité ont été effectués à l'aide de Excel 2010. L'établissement des dendrogrammes est réalisé à l'aide du logiciel Statistica version 6.0.

Résultats et discussion

1. Fractionnement des protéines et recherche de biomarqueurs

1.1. Analyse des profils électrophorétiques

La technique adoptée pour l'analyse est celle décrite par Laemelli (1970) et modifiée par Singh et al. (1991) qui a été utilisée pour fractionner les protéines salivaires. Cette technique permet d'obtenir l'ensemble des protéines. La lecture des diagrammes consiste à révéler la mobilité de chacune des bandes protéiques réparties dans les deux zones de protéines de haut et de faible poids moléculaire (HPM et FPM), en mesurant la distance parcourue par chaque bande dans le gel de séparation.

1.1.1. Analyse des protéines salivaires dénaturées et réduites fractionnées par SDS-PAGE pour le cas d'Alzheimer

Les diagrammes électrophorétiques des 8 échantillons (7 malades et 1 témoin) analysés renferment de 6 à 17 bandes décelables qui se répartissent dans les deux zones des protéines salivaires avec des mobilités allant de 47 à 149 mm (Figure 10).

Les diagrammes sont lus par zone. Nous dénombrons 21 bandes protéiques de mobilités différentes qui se répartissent comme suit : 2 bandes protéiques dans la zone 1 des protéines salivaires HPM et 19 bandes protéiques dans la zone 2 des protéines salivaires FPM.

La comparaison des profils électrophorétiques des malades et du sujet sain révèle des variations dans la composition protéique, dont les variations les plus importantes observées étaient dans la zone de FPM (zone 2). Les bandes protéiques nommées B2, B3, B9, B14 et B15 sont les plus variables qualitativement et quantitativement. La variation de ces derniers est représentée dans le tableau.

Tableau 3 : Variation des bandes protéiques B2, B9, B14 et B15

	B2/intensité	B9/ intensité	B14/intensité	B15/intensité
Témoin	P(+)	P (traces)	A(0)	P (traces)
E2	P (+++)	P (++)	P (++)	P (+)
E3	A (0)	P (++)	P (+)	P (+)
E4	P (+++)	P (++)	P (+)	P (+)
E5	P (+++)	P (+++)	P (+++)	P (++)
E6	P (+++)	P (+)	A(0)	A (0)

E7	P (+++)	P (+)	A(0)	A (0)
E8	P (+++)	P (++)	P(+)	P (traces)

P : présence A : absence E : échantillon

Des différences sont constatées entre le sujet sain et les patients malades dans la composition protéique où la bande B14 est présente chez les malades mais absente chez le témoin.

Cette dernière peut être considérée comme étant un biomarqueur qualitatif.

On peut également constater des variabilités quantitatives au niveau des bandes B2, B3 et B9 qui sont présentes avec une forte intensité chez les patients malades contrairement au témoin (faible intensité). Par ailleurs la bande B15 absente chez quelques patients et présente chez les autres y compris le témoin.

Les différences observées entre les malades peuvent être probablement due à des facteurs tels que l'âge et le stade de la maladie. L'âge est considéré sans conteste le principal facteur de risque de la MA, plus l'âge augmente plus le risque est grand [65]

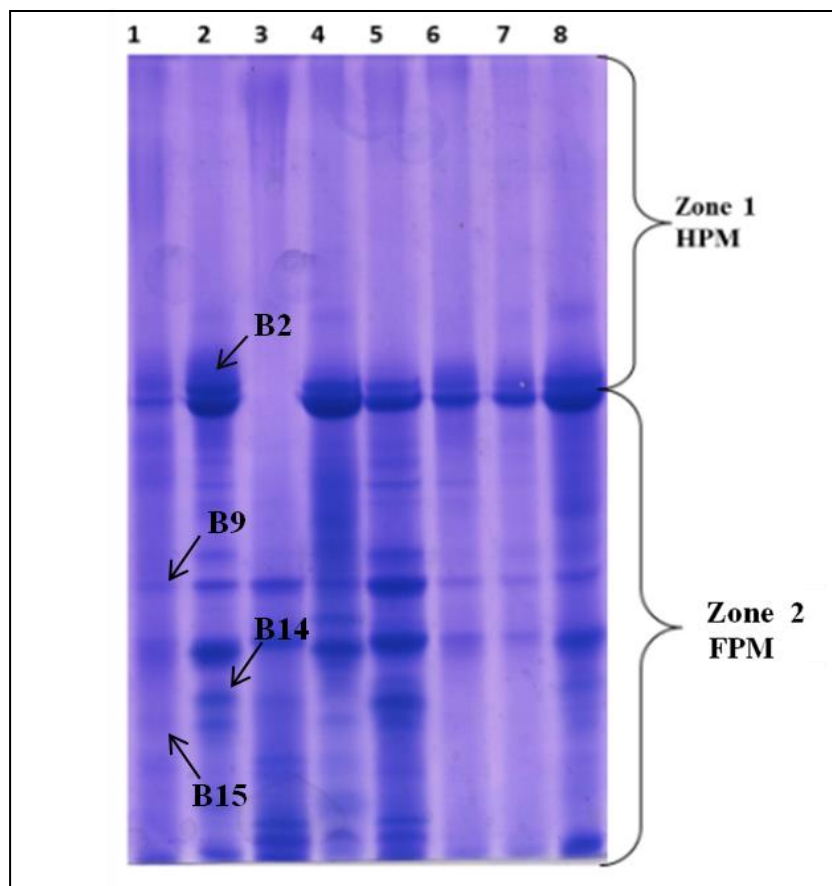


Figure10: profils électrophorétique des protéines salivaires dans les conditions dénaturantes et réductrices révélées par SDS/PAGE pour le cas d'Alzheimer. 1 : témoin. 2 à 8 patients

1.1.2. Analyse des protéines salivaires dénaturées et réduites fractionnées par SDS-PAGE pour le cas de Parkinson

Les diagrammes électrophorétiques des 8 échantillons (7 malades et 1 témoin) analysés renferment de 7 à 13 bandes décelables qui se répartissent dans les deux zones des protéines salivaires de haut et de faible poids moléculaire avec des mobilités variant entre de 3 à 149 mm (Figure 11).

Nous avons dénombré 25 bandes protéiques de mobilité différente : 9 bandes protéiques dans la zone 1 des protéines salivaires HPM et 16 bandes protéiques dans la zone 2 des protéines salivaires FPM.

La comparaison des profils électrophorétiques des malades et du sujet sains révèle des variations dans la composition protéique dans les deux zones des protéines salivaires HPM et FPM. Les bandes protéique nommées B6, B8 et B16 sont les plus variables qualitativement et quantitativement. La variation de ces derniers est représentée dans le tableau4.

Tableau4: Variation des bandes protéiques B6, B8 et B16

	B6/intensité	B/8 intensité	B16/intensité
Témoin	A (0)	P (+)	P (traces)
E2	P (+)	P (+++)	P (traces)
E3	P (+)	P (++)	A (0)
E4	A(0)	P (traces)	P (+)
E5	P (+)	P (+++)	P (+)
E6	P (++)	P (+++)	P (traces)
E7	A (0)	P (+++)	P (+)
E8	A (0)	P (++)	P (+)

P : présence A : absence E : échantillon

Nous constatons clairement des différences entre les patients malades et le sujet sain dans la composition protéique où la bande B6 variable qualitativement est présente uniquement chez les malades. D'après Scaros et Fisler (2005), les caractéristiques biologiques identifiées

uniquement dans l'échantillon du patient par mesure répétées ou différenciellement par rapport à un témoin peuvent alors être considérées comme des biomarqueurs de l'état physiologique correspondant.

Pour les variations quantitatives, l'exemple le plus important est celui des bandes protéiques B8 et B16, ces bandes sont présentes presque chez tous les échantillons (témoins et malades), en effet elles sont faiblement concentrées chez le témoin, et présentent des concentrations très variables entre le reste des malades, les patients présentant les concentrations les plus élevées (2, 4, 5 et 6) sont des patients avec des pathologies associées. Ces différences observées entre les malades peuvent être probablement dues à des facteurs tels que l'âge, le stade de la maladie et les antécédents familiaux. R Katzenschlager et al. (2004) ont prouvés qu'un patient ayant un parent au premier degré a un risque accru de la maladie de parkinson.

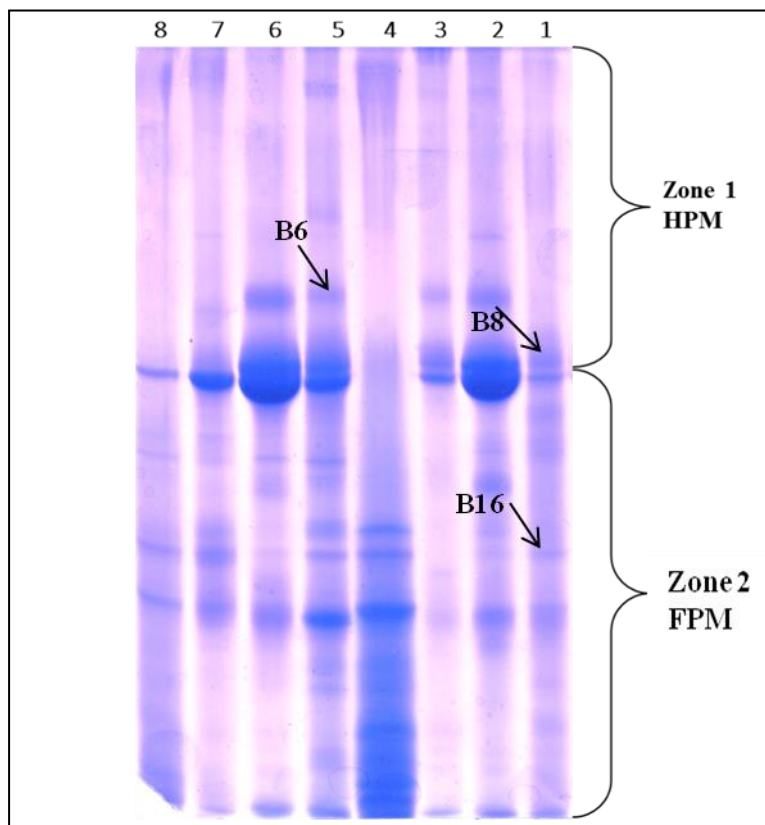


Figure11 : profils électrophorétique des protéines salivaires dans les conditions dénaturantes et réductrices révélées par SDS/PAGE pour le cas de Parkinson. 1 : témoin. 2 à 8 : patients.

1.1.3. Analyse des protéines salivaires non dénaturées et non réduites pour le cas de l'Alzheimer

Les diagrammes électrophorétiques des 8 échantillons (7 malades et 1 témoin) analysés renferment de 10 à 20 bandes décelables qui se répartissent dans les deux zones des protéines salivaires avec des mobilités allant de 5 à 136 mm (Figure 12)

Les diagrammes sont lus par zone. Nous dénombrons 38 bandes protéiques de mobilités différentes qui se répartissent comme suit : 17 bandes protéiques dans la zone 1 des protéines salivaires HPM et 21 bandes protéiques dans la zone 2 des protéines salivaires FPM.

La comparaison des profils électrophorétiques des malades et du sujet sains révèle des variations dans la composition protéique où les différences résident dans la zone 2 de FPM contenant les bandes protéiques nommées B23, B27, B34 et B38 qui sont les plus variable qualitativement et quantitativement. La variation de ces bandes est représentée dans le tableau 5

Tableau5: Variation des bandes protéiques B23, B27, B34 et B38

	B23/intensité	B27/intensité	B34/intensité	B38/intensité
Témoin	A (0)	P (traces)	P (traces)	P(+)
E2	P (++)	P (++)	P (+)	A (0)
E3	A (0)	P (traces)	P (+)	A (0)
E4	P (+++)	P (++)	P (+)	A (0)
E5	P (++)	P (+)	P (+)	A (0)
E6	P (traces)	A (0)	P (traces)	A (0)
E7	A (0)	P (traces)	A (0)	A (0)
E8	P (+++)	P (++)	P (++)	A (0)

P : présence

A : absence

E : échantillon

Nous avons observé des variabilités au niveau des bandes B27 et B34 qui sont présentes sous forme de traces chez le sujet sain et chez quelques patients alors qu'elles sont présentes avec des intensités plus élevées ou absentes chez les autres patients. Par exemple la bande B27 se trouve chez le témoin ainsi que chez les échantillons E3 et E7 sous forme de traces, avec une intensité élevée chez les patients E2, E4, E5 et E8 et elle est introuvable chez les autres malades. Donc les bandes B27 et B34 varient qualitativement et quantitativement ce qui leur confère la propriété de biomarqueurs qualitatifs et quantitatifs

Nous avons également observé des différences dans le profil électrophorétique des patients où la bande B38 n'existe que chez le témoin et est absente chez tous les malades, alors que la bande

B23 est absente chez le sujet sain de même que chez d'autres patients (E3, E7) mais présente avec une intensité forte pour les malades E2, E4, E5 et E8. Donc ces bandes varient qualitativement et peuvent être considérées comme des biomarqueurs qualitatifs.

Ces différences observées entre les profils électrophorétique des malades sont probablement dues à des facteurs tels que : l'âge, le sexe, stade de la maladie, les antécédents familiaux et les pathologies associées.

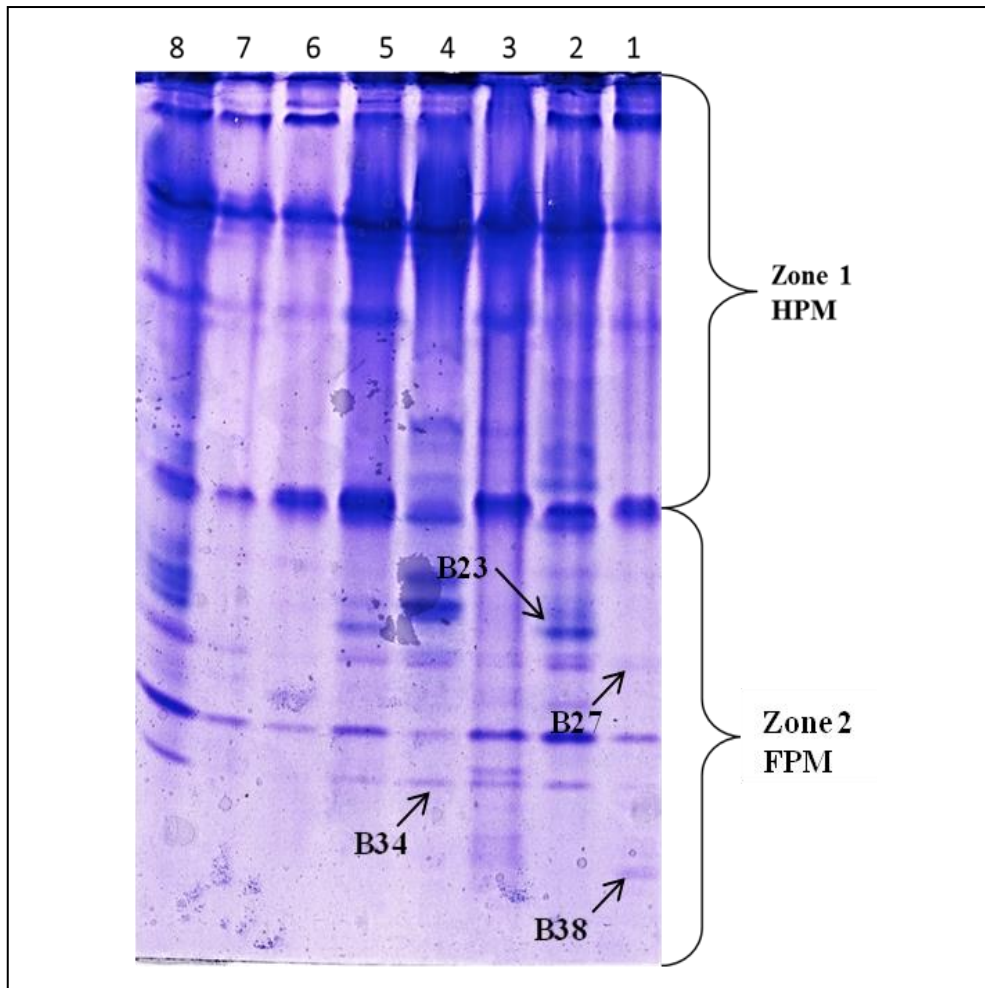


Figure12: profils électrophorétiques des protéines salivaires dans les conditions non dénaturantes et non réductrices révélées par PAGE pour le cas d'Alzheimer. 1 : témoin. 2 à 8 : patients

1.1.4. Analyse des protéines salivaires non dénaturées et non réduites pour le cas de Parkinson

Les diagrammes électrophorétiques des 8 échantillons analysés (7 malades et 1 témoin) renferment de 10 à 20 bandes décelables qui se répartissent dans les deux zones des protéines salivaires HPM et FPM avec des mobilités variant de 4 à 135 mm (Figure 13).

Nous avons identifié 36 bandes protéiques répartis comme suit : 19 bandes protéiques dans la zone 1 des protéines salivaires HPM et 17 bandes protéiques dans la zone 2 des protéines salivaires FPM.

L'observation du profil électrophorétique du protéome salivaire du témoin et celui des patients, révèle des variations dans la composition protéique. En effet, la zone de HPM présente peu de variations (non significatives), les différences se situent surtout au niveau de la zone FPM des protéines salivaires contenant les bandes B23, B26, B29, B28, B33 et B36 qui sont les plus variables qualitativement et quantitativement. La variation de ces dernières est représentée dans le tableau 6

Tableau6: Variation des bandes protéiques B23, B26, B29, B33 et B36

	B23/intensité	B26/intensité	B29/intensité	B33/intensité	B36/intensité
Témoin	A (0)	P (traces)	A (0)	P (traces)	P (+)
E2	P (++)	P (+++)	P (+)	P (+++)	A (0)
E3	A (0)	P (++)	A(0)	A (0)	A (0)
E4	P (++)	P (+)	P (+)	P (++)	A (0)
E5	P (+)	P (++)	P (+)	P (+)	A (0)
E6	P (traces)	A (traces)	A (0)	A (0)	A (0)
E7	A (0)	A (0)	P (+)	A (0)	A (0)
E8	A (0)	P (++)	P (+)	P (++)	A (0)

P : présence A : absence E : échantillon

Nous constatons que les bandes B26 et B33 sont considérées comme étant les bandes les plus variables quantitativement et qualitativement, ces bandes sont fortement concentrées chez certains malades (figure12) avec une concentration modérée chez d'autres, et à l'état de traces chez le témoin et absentes chez d'autres patients. A titre d'exemple la bande B26 se trouve sous forme de traces chez le témoin, fortement concentrée pour les patients E2, E3 et E5, faible pour E4, E6 et absente chez le patient E7. Donc ces bandes peuvent être considérées comme des biomarqueurs qualitatifs et quantitatifs.

Autres différences sont constatées entre le sujet sain et les malades dans la composition protéique où la bande B36 est présente uniquement chez le témoin. Etant donné que la bande B36 n'existe que chez le témoin, nous pouvons la suggérer comme un biomarqueur de la MP. En revanche, les bandes B28, B29 et B23 sont absentes chez le sujet sain et même chez d'autres malades mais elles sont présentes avec une intensité élevée pour les patients E2, E4, et E5 (surtout les hommes). Les différences observées entre les malades peuvent être due à des facteurs tels que les facteurs génétiques, stade de la maladie et le sexe. Les hommes ont un risque plus élevé de développer la MP que les femmes [23].

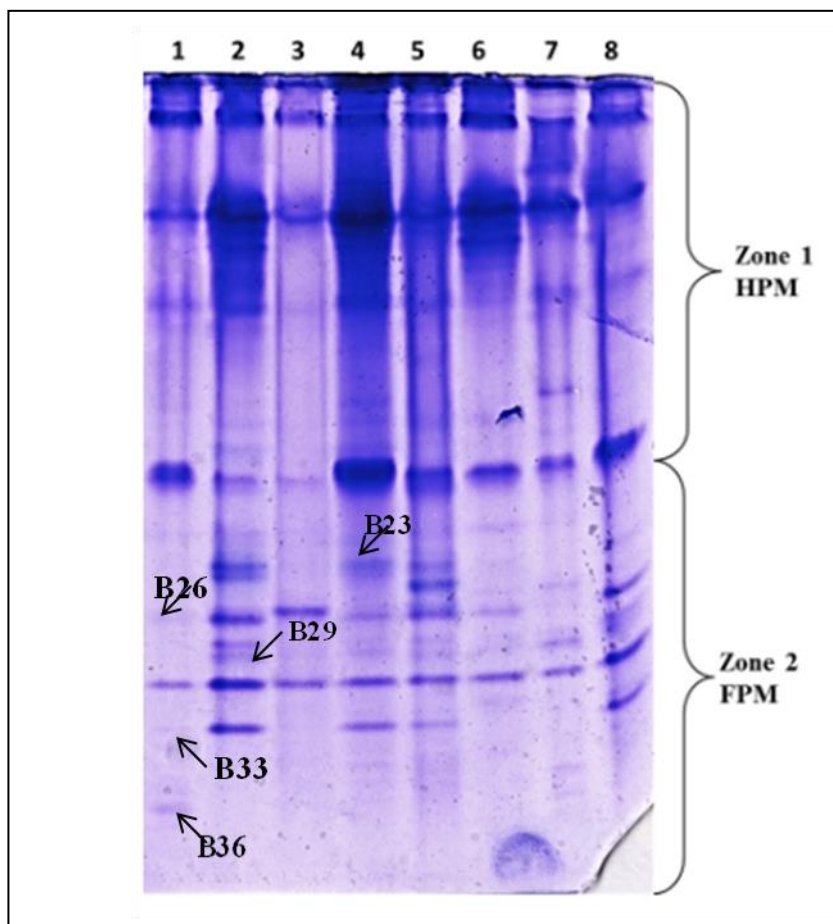


Figure13: profils électrophorétiques des protéines salivaires dans les conditions non dénaturantes et non réductrices révélées par PAGE pour le cas de Parkinson. 1 : témoin. 2 à 8 : patients

2. Etude de la variabilité des protéines salivaires

2.1. En conditions dénaturantes et réductrices cas d'Alzheimer

L'étude est faite selon le poids moléculaire des protéines séparées, on dénombre 20 bandes protéiques de mobilités différentes on divise notre gel a 2 zones : Zone1 qui contient les protéines ayant un haut poids moléculaire et la Zone 2 qui contient les protéines ayant un faible poids moléculaire.

2.1.1. Étude des protéines salivaires de HPM

La diversité des bandes protéiques est peu importante dans la zone 1 de haut poids moléculaire (Figure 10).

Tableau 7: Variabilité des protéines salivaires de HPM en conditions dénaturantes et réductrices cas d'Alzheimer

Bandes	Mobilités (mm)	Echantillons	Fréquences(%)
1	47.4	E1 E4 E5 E8	50
2	61.4	E1 E E3 E4 E5 E6 E7 E8	100

On remarque que sur la zone 1 de haut poids moléculaire, la diversité des bandes protéiques est très peu importante, dans cette zone la bande protéique 2 est la bande la plus fréquente observée chez tous les patients avec une fréquence maximale de 100% , suivie par la deuxième et la dernière bande dans cette zone la bande 2 ayant une mobilité de 47.4 mm présente dans les 4 échantillons avec une fréquence de 50%.(Tableau7)

2.1.2. Étude des protéines salivaires de FPM

La zone 2 de faible poids moléculaire présente une diversité très importante de bandes protéiques.

Tableau 8: Variabilité des protéines salivaires de FPM en conditions dénaturantes et réductrices cas d'Alzheimer

Bandes	Mobilité (mm)	Echantillons	Fréquences (%)
3	65.4	E1 E2 E4 E5 E6 E7 E8	87.5
4	71.4	E2 E5	25
5	75.4	E1 E4	25
6	79.4	E2 E5 E6 E7	50
7	83.4	E2 E5 E6 E8	50
8	91.4	E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8	87.5
9	98.4	E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8	100
10	104	E4	12.5
11	108	E3 E5 E6 E7 E8	62.5
12	114	E2 E4 E1	37.5
13	117.5	E1 E5	25
14	119.4	E2 E3 E5	37.5
15	123.4	E2 E4 E5 E8	50
16	134	E3 E5	25
17	140	E2 E4	25
18	143	E3 E5	25
19	146	E3 E4 E5 E6 E8	50
20	149	E1 E2 E3 E5 E6 E7 E8	87.5

Sur la base de la variabilité protéique observée au niveau de cette zone et d'après le tableau 8 la bande protéique la plus fréquente est la bande 9 de mobilité 98.4 mm avec une fréquence maximale de 100%, suivies des bandes 6, 7, 15 et 19 de mobilités 79.4 mm 83.4 mm, 123.4 mm et 146 mm retrouvées chez 4 patients, présentant une fréquence de 50%. Enfin la bande 10 de mobilité 104 mm est retrouvée chez un seul patient avec une faible fréquence (12.5 %).

2.2. En conditions dénaturantes et réductrices cas de Parkinson

Comme les cas précédents, l'étude est faite selon le poids moléculaire des protéines séparées, on dénombre 25 bandes protéiques de mobilités différentes on divise notre gel a 2 zones : Zone1 qui contient les protéines ayant un haut poids moléculaire et la Zone 2 qui contient les protéines ayant un faible poids moléculaire

2.2.1. Étude des protéines salivaires de HPM

L'analyse électrophorétique des 8 échantillons a permis de distinguer 9 types de protéines salivaires de HPM (Tableau 9).

Tableau 9: Variabilité des protéines salivaires de HPM condition dénaturantes réductrices cas de Parkinson

Bandes	Mobilités (mm)	Echantillons	Fréquence(%)
1	3	E1 E3 E6	37.5
2	6	E6	12.5
3	8	E1 E2 E4	37.5
4	33	E4	12.5
5	37	E1 E4 E5 E6	50
6	48	E2 E3 E5 E6	50
7	52	E7	12.5
8	62	E1 E2 E3 E5 E6	62.5
9	63.9	E8	12.5

D'après le tableau La diversité des bandes protéiques est moins importante dans la zone 1 de haut poids moléculaire (Figure 11). Dans cette zone la bande protéique 8 dont la mobilité est de 62 mm est présente chez 5 patients ayant une fréquence de 62.5 %, donc c'est la protéine salivaire dominante dans cette zone, suivie des bandes protéiques 5 et 6 de mobilité 37 mm et 48 mm, respectivement, retrouvée chez 4 échantillons avec une fréquence de 50%. Et enfin, les

bandes protéiques 2, 4, 7 et 9 de mobilité 2mm, 4mm, 7mm et 9mm respectivement sont les moins fréquentes (12.5%).

2.2.2.Étude des protéines salivaires de FPM

L'analyse électrophorétique des protéines salivaires de faible poids moléculaire des 8 échantillons nous a permis de distinguer 15 protéines salivaires de mobilités différentes (Tableau 10). Ainsi nous notons un grand polymorphisme de ces protéines salivaires localisées dans la zone 2.

Tableau 10: variabilité des protéines salivaires de FPM en condition non dénaturantes et non réductrices

Bandes	Mobilités (mm)	Echantillons	Fréquence(%)
10	65	E1 E2 E3 E5 E7	50
11	76	E7 E8	25
12	78	E1 E2	25
13	80	E5 E6 E7 E8	50
14	84.4	E2 E5 E6	37.5
15	87	E2 E4 E5	37.5
16	99	E1 E2 E4 E5 E6 E7 E8	87.5
17	111	E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7	87.5
18	120	E4 E5	25
19	125	E1 E4 E5	37.5
20	132	E1 E4	25
21	137	E1 E2 E3	37.5
22	141	E1 E2 E3 E4 E5 E8	75
23	145	E4	12.5

24	147	E4	12.5
25	149	E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8	100

On estime que la fréquence protéique la plus élevée est celle de la bande 16, de mobilité 149 mm retrouvée chez les 8 échantillons avec une fréquence de 100 %, suivie des bandes 17 et 08 dont les mobilités sont de 99 mm et 111 mm avec une fréquence de 87.5 %. Les 2 bandes 10 et 14 retrouvées chez 4 patients qui apparaissent avec des mobilités différentes 65 mm et 80 mm ont une fréquence de 50%. La plus faible fréquence observée dans cette condition est de 12.5% pour les bandes 24 et 25 retrouvée chez 1 seul patient dont la mobilité est de 145 mm 147 mm respectivement (Tableau 10).

3.1. Etude de la variabilité des protéines salivaires non dénaturante et non réductrice Cas d'Alzheimer

L'étude est faite selon le poids moléculaire des protéines séparées, on dénombre 38 bandes protéiques de mobilités différentes on divise notre gel à 2 zones : Zone 1 qui contient les protéines ayant un haut poids moléculaire et la Zone 2 qui contient les protéines ayant un faible poids moléculaire.

3.1.1. Étude des protéines salivaires de HPM

L'analyse électrophorétique des 08 échantillons a permis de distinguer 16 types de protéines salivaires de haut poids moléculaire (Tableau 11).

Tableau 11: variabilité des protéines salivaires de HPM conditions non dénaturantes non réductrices cas d'Alzheimer

Bandes	Mobilités (mm)	Echantillons	Fréquences %
1	5	E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8	100
2	8	E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8	100
3	23	E6 E7 E8	37.5
4	26	E1 E2 E3 E4 E5 E7 E8	87.5
5	29	E1 E2 E4 E5	50

6	31	E2 E3 E4 E5	50
7	37	E8	12.5
8	41	E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7	87.5
9	43	E7	12.5
10	45	E6 E7	25
11	48	E4 E8	25
12	52	E2	12.5
13	56	E8	12.5
14	60	E1 E3 E4 E8	50
15	64	E2 E3 E4 E8	50
16	70	E2 E4 E5 E8	50

La diversité des bandes protéiques est si importante dans la zone 1 de haut poids moléculaire (Figure 12). Dans cette zone les bandes protéiques 1 et 2 dont les mobilités est de 5 mm et 8 mm sont présentes chez les 8 échantillons ayant donc une fréquence de 100 %, donc ce sont les 2 « protéines salivaires dominantes » dans cette zone, suivie de la bande protéique 4 de mobilité 26 mm et la bande 8 de mobilité 41 retrouvées chez 7 échantillons avec une fréquence de 87.5%.

Les 5 bandes protéiques : 5, 6, 14, 15 et 16 ayant des mobilités classées respectivement 29, 31, 60, 64, 70 mm sont moins fréquentes avec 50%, Des bandes protéiques moins fréquentes sont observées, tel que les bandes 23, 10, 11, ayant une fréquence de 37.5% et les bandes 10 et 11 a une fréquence de 25%

Quant 'aux bandes 7, 9, 12 et 13 ne se retrouvent que dans un seul échantillon avec une fréquence de 12.5%

L'analyse électrophorétique des protéines salivaires de faible poids moléculaire des 08 échantillons nous a permis de distinguer 22 protéines salivaires de mobilités différentes (Tableau 11). Ainsi nous notons un grand polymorphisme de ces protéines salivaires localisées dans la zone 2.

3.1.2.Étude des protéines salivaires de FPM**Tableau 12:** Variabilité des Protéines salivaires de FPM conditions non dénaturantes non réductrice cas d'Alzheimer

Bandes	Mobilités (mm)	Echantillons	Fréquences %
17	72	E5 E6 E7	37.5
18	73	E1 E3 E5	37.5
19	75	E2 E4	25
20	80	E2 E8	25
21	85	E2 E4 E6 E8	50
22	89	E2 E5 E8	37.5
23	91	E2 E4 E5	37.5
24	92	E2 E4 E5	37.5
25	94	E2 E4	25
26	97	E7 E8	25
28	100	E1 E2 E3 E4 E5 E6	75
29	102	E7 E8	25
30	107	E2 E3 E6 E8	50
31	109	E7	12.5
32	112	E1 E2 E3 E4 E5	62.5
33	118	E E8	25
34	120	E3	12.5
35	122	E1 E2 E3 E4 E5 E6	75
36	124	E1 E3	25
37	129	E3	12.5

38	132	E3	12.5
39	136	E1	12.5

D'après le Tableau12, La plus haute fréquence protéique observée est celle des bandes 28et 35, de mobilité100mmet 122 mm retrouvée chez 7 échantillons avec une fréquence de 75 %, suivie de la bande 32 retrouvée dont la mobilité est de 112 mm avec une fréquence de 62.5 % et les bandes 21 retrouvée chez 4 échantillons avec une mobilité de 85 mm (50%), Puis les bandes protéiques 31, 34, 37, 39 qui apparaissent avec des mobilités 109, 120, 129, 136mm respectivement et avec la même fréquence de 12.5% qui est La plus faible fréquence observée dans cette condition.

3.2. En condition non dénaturante et non réductrices Cas de Parkinson

Comme déjà vue avec le cas d'Alzheimer, on dénombre 36 bandes protéiques de mobilités différentes on devise notre gel à 2 zones : Zone1 qui contient les protéines ayant un haut poids moléculaire et la Zone 2 qui contient les protéines ayant un faible poids moléculaire

3.2.1.Étude des protéines salivaires de HPM

Les différentes protéines salivaires de haut poids moléculaires observées dans la zone 1 sont au nombre de 19 avec des mobilités différentes (Tableau13)

Tableau 13 : Variabilité des Protéines salivaires de HPM conditions non dénaturantes non réductrices cas de Parkinson

Bandes	Mobilités (mm)	Echantillons	Fréquences %
1	4	E1 E2 E3 E4 E5 E7 E8	87.5
2	5	E1 E2 E3E4 E5 E6 E7 E8	100
3	8	E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8	100
4	18	E7	12.5
5	20	E4	12.5
6	23	E2 E3 E6 E8	50

7	25	E6 E7	25
8	27	E1 E2 E3 E4 E5	62.5
9	29	E1 E3 E4 E6 E7	62.5
10	31	E3 E4 E6 E7	50
11	36	E6	12.5
12	40	E7	12.5
13	43	E1 E2 E3 E4 E5 E6	75
14	45	E7	12.5
15	59	E2 E4 E7	37.5
16	63	E2 E4 E5 E6	50
17	66	E7	12.5
18	69	E2 E4	25
19	74	E1 E4 E5 E6 E7	62.5

Sur la base de la variabilité protéique observée au niveau de cette zone, les bandes protéiques les plus fréquentes d'après le Tableau13 sont les bandes : 2 et 3 de mobilités 5 mm et 8 mm respectivement avec des fréquences de 100% chacune, suivies de la bande 1 de mobilité 4 mm retrouvée chez 7 échantillons, présentant une fréquence de 87% puis les bandes 6 ,10 et 16 avec des mobilités respectives de 23mm 31 mm et 63 mm avec des fréquences de 50%. Enfin les bandes 15 de mobilité 59 mm sont retrouvées chez 3 échantillons avec une fréquence de 37.5%.

Une bande protéique de très faible fréquence est observée dans la zone de HPM qui est la bande : 2 avec une fréquence de 12.5% retrouvée chez un seul patient.

3.2.2.Étude des protéines salivaires de FPM

L'analyse électrophorétique des protéines salivaires de faible poids moléculaire a permis de dénombrier 12 bandes protéiques de mobilités différentes (Tableau 14)

Tableau 14: Variabilité des Protéines salivaires de FPM conditions non dénaturantes non réductrice Parkinson.

Bandes	Mobilités (mm)	Echantillons	Fréquences(%)
20	76	E2 E3	25
21	83	E1 E2 E4 E6 E7	62.5
22	86	E1 E2 E4 E8	50
23	90	E2 E4 E5	37.5
24	94	E5 E6 E7 E8	50
25	99	E3	12.5
26	101	E1 E2 E4 E5 E6 E8	75
27	103	E2 E4 E5 E6 E7	62.5
28	105	E2 E5 E6 E7	50
29	107	E2 E4 E5 E8	50
30	111	E8	12.5
31	112	E1 E2 E3 E4 E5 E6	75
32	116	E1 E8	25
33	120	E1 E2 E3 E4 E5	62.5
34	128	E4 E5 E7	37.5
35	133	E7	12.5
36	135	E1	12.5

L'observation du tableau14 nous permet de constater que les bands protéiques 26, 31 de mobilités respectives de 101 mm, 112 mm sont les plus fréquentes avec une fréquence de 75%, suivies des bandes 22,28et 29 de mobilité 86mm, 105mm et 107mm présentent dans 4 échantillons chacune avec une fréquence de 50 %, suivie par la bandes 23 dont les mobilités est 90mm, présente chez 3 échantillons avec une fréquence de 37.5%

Les bandes 23, 25, 26 et 35 ayant des mobilités respectives de 99mm 111mm 133mm et 135mm, présentent chez un seul patient chacune, représentent la fréquence la plus moindre de 12.5%.

3. Classification hiérarchique des protéines salivaires

Les relations entre les différents patients sont établies à partir de leurs ressemblances dans la composition protéique, pour cela, nous avons fait appel à classification hiérarchique. Les regroupements effectués à chaque pas de l'algorithme de classification hiérarchique rassemble des éléments qui sont plus ou moins proches entre eux plus on avance dans le regroupement plus on se rapproche du sommet de l'arbre.

3.1. Dendrogramme des protéines salivaires dénaturées et réduites pour le cas d'Alzheimer

Le dendrogramme obtenu à partir des distances d'agrégation par la méthode UPGMA nous montre de nombreux groupes permettant d'estimer la ressemblance dans la composition protéique des échantillons (figure 14).

Le dendrogramme est divisé en deux groupes à une distance d'agrégation de 3.23. Le patient 3 qui constitue un groupe à part est très différent des autres patients atteints de MA (premier groupe). L'ensemble des patients du deuxième groupe est partagé lui-même en deux sous-groupes à la distance 3.10. Le premier sous-groupe composé seulement de deux patients 2 et 5 formant un clade. Le deuxième sous-groupe est divisé à son tour en deux autres sous-groupes à la distance 2.75 dont le premier contient les deux échantillons 4 et 8 et le second se divise en deux autres sous-groupes à la distance 2,44. Le témoin forme un groupe unique et le deuxième sous-groupe contient les patients 7 et 6.

En rapportant l'historique des patients, certaines divergences ont été remarquées par rapport aux résultats de l'analyse en cluster. A titre d'exemple : À la distance d'agrégation 1.4 les patients 6 et 7 appartiennent au même groupe et forment un clade malgré la divergence qui existe entre eux. En effet, les deux patients sont des femmes, la première patiente à 85 ans dont la maladie remonte à 5ans avec un stade sévère alors que la deuxième âgée de 76 ans n'est qu'au début de sa maladie (6 mois) mais le signe commun entre ces deux patientes c'est qu'elles ont des antécédents familiaux. Un autre exemple, celui des patients 2 et 5 : le patient 5 n'est qu'au début de la maladie avec un stade léger et un âge de 70 ans contrairement au patient 2 qui est à 4 ans de la maladie et âgé de 79 ans.

Etant donné que l'âge de survenu de cette maladie est tardif (presque le même chez tous les malades) et d'après ces résultats, nous pouvons suggérer que le début de la maladie et les antécédents familiaux peuvent avoir des effets sur la composition protéique des patients.

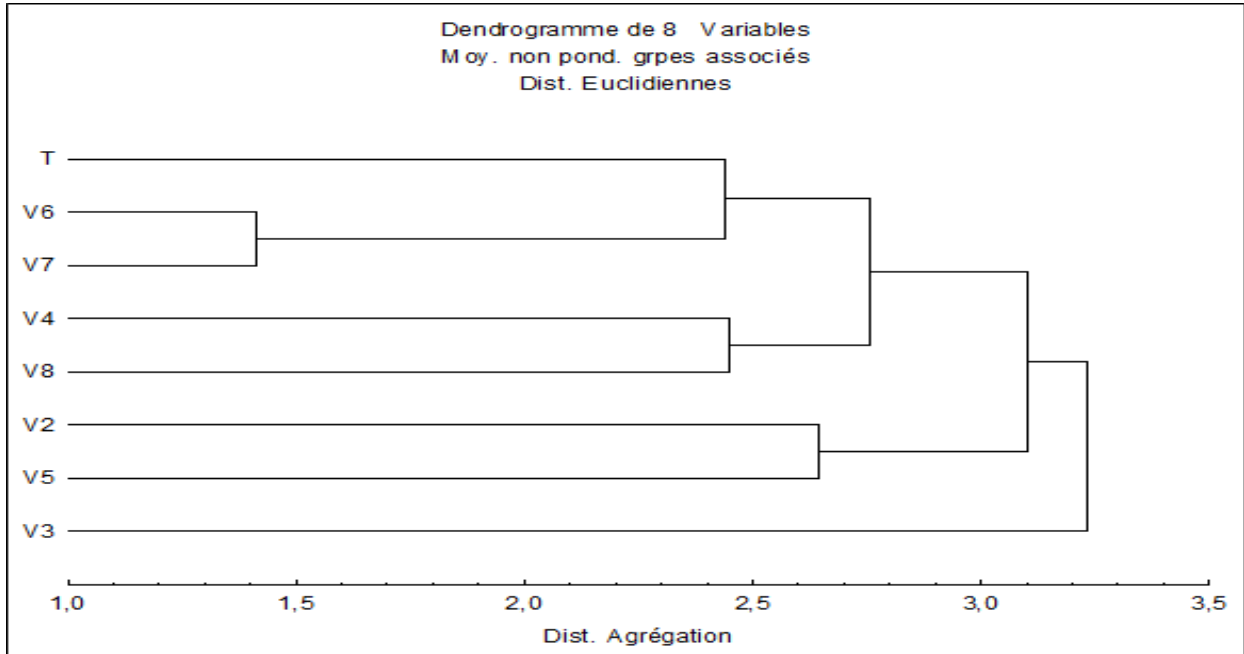


Figure14 : Dendrogramme de protéines salivaires dénaturées et réduites pour le cas d'Alzheimer

3.2. Dendrogramme des protéines salivaires dénaturées et réduites pour le cas de Parkinson

Le dendrogramme obtenu à partir des distances d'agrégations révèle de nombreux groupes.(figure15) A la distance d'agrégation 3.61, l'ensemble des échantillons est divisé en deux groupes. Le premier groupe contient uniquement le patient 4, tandis que le second groupe est divisé en deux sous-groupes à la distance 3.24 dont le premier contient les patients 7 et 6 formant un clade et le deuxième est scindé à son tour en deux autres sous-groupes à une distance d'agrégation de 2.99. Le premier sous-groupe comprend seulement le témoin alors que le second sous-groupe renferme le reste des échantillons. La valeur moyenne des distances d'agrégations est de 2.83, dans cet intervalle, le dendrogramme révèle un degré élevé de similitude de la composition en protéines salivaires de presque tous les échantillons.

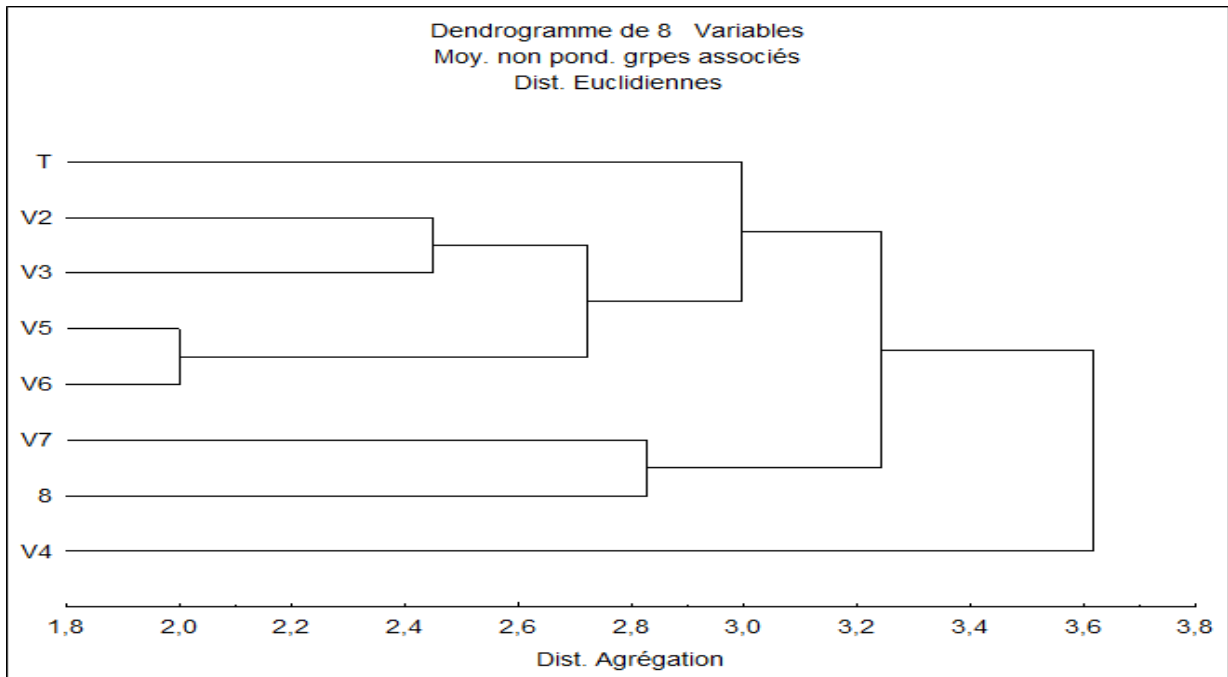


Figure15 : Dendrogramme des protéines salivaires dénaturées et réduites pour le cas de Parkinson.

3.3. Dendrogramme des protéines salivaires non dénaturées et non réduites pour le cas de d'Alzheimer

Le dendrogramme obtenu à partir des distances d'agrégation suivant la méthode UPGMA (figure16), nous montre deux groupes à la distance 4.43 dont le patient 8 constitue un groupe à part car très différent des autres patients (groupe 1).

L'ensemble des échantillons du deuxième groupe est partagé en deux sous-groupes à la distance 3.99. Le premier sous-groupe renferme deux patients (6 et 7) et le second sous-groupe est subdivisé en deux sous-groupes à la distance 3.6. Le premier contient deux patients (2 et 4) alors que le deuxième sous-groupe renferme le reste des échantillons. Les patients 2 et 4 appartiennent au même groupe et formant un clade malgré les différences qu'ils présentent dans leurs caractéristiques cliniques. Le patient 2 âgé de 70 ans est hypertendu avec un stade très avancé (depuis 6 ans) alors que la patiente 4 âgée de 68 ans est diabétique avec un stade initial de la maladie. Nous constatons que les pathologies associées peuvent avoir des répercussions sur la composition protéique salivaire des patients atteints d'Alzheimer.

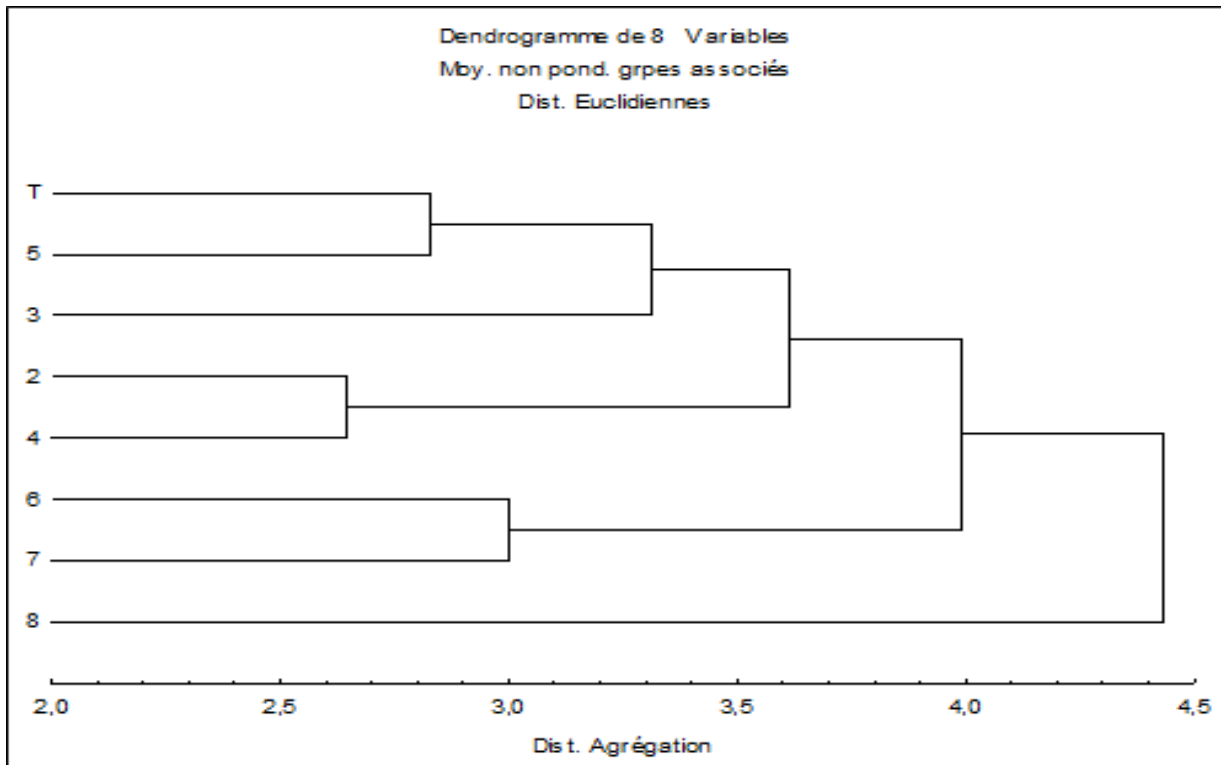


Figure16 : Dendrogramme des protéines salivaires non dénaturées et non réduites pour le cas de d'Alzheimer.

3.4. Dendrogramme des protéines salivaires non dénaturées et non réduites pour le cas de Parkinson

Le dendrogramme obtenu à partir des distances d'agrégation révèle de nombreux groupe (figure 17) permettant d'estimer la ressemblance dans la composition protéique des échantillons.

A une distance d'agrégation de 4.37, l'ensemble des échantillons est divisé en deux groupes. Le premier contient uniquement le patient 7, tandis que le second groupe est divisé à son tour en deux sous-groupes dont le premier est constitué du patient 8, et le deuxième est subdivisé lui-même en deux autres sous-groupes.

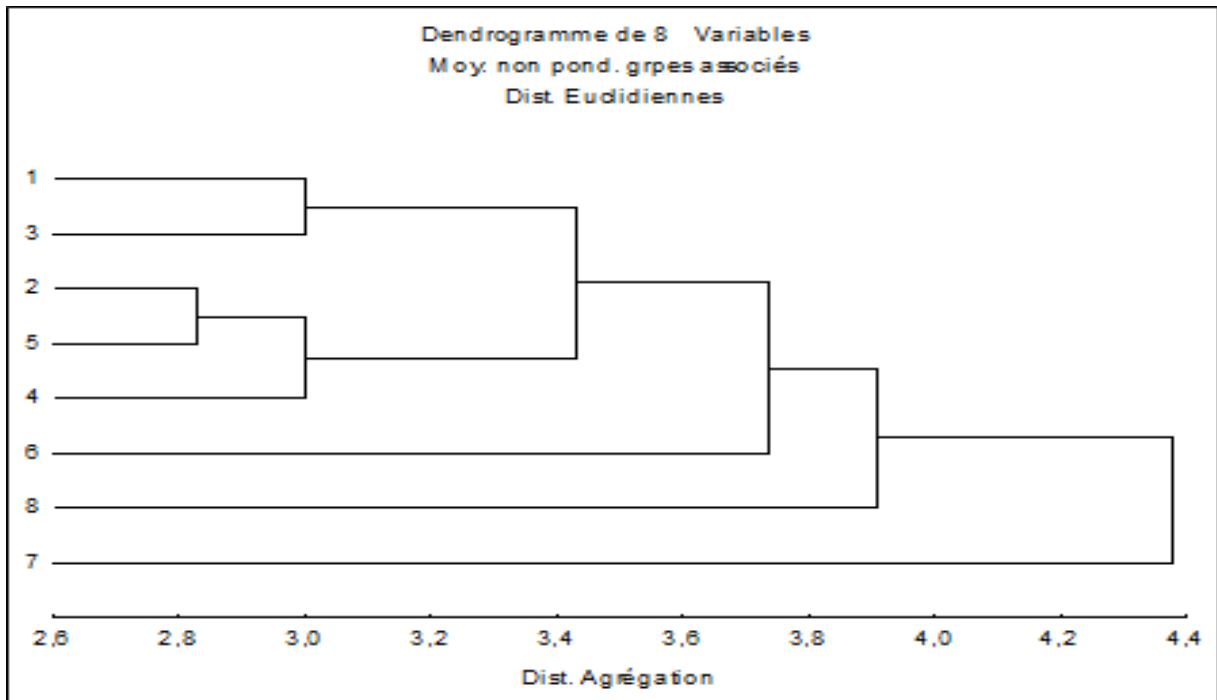


Figure17 : Dendrogramme des protéines salivaires non dénaturées et non réduites pour le cas de Parkinson.

4. Etablissement des diagrammes type

L'analyse des diagrammes électrophorétiques montre que ces derniers présentent de nettes différences en composition protéique à la fois qualitative et quantitatives pour les différents patients ayant l'Alzheimer ou les Parkinsoniens.

Un tel ensemble de résultats peut être alors exploité en estimant le degré de différence (ou d'analogie) entre les diagrammes des individus considérés deux à deux. Cette représentation nous permet donc de conserver une image réelle des gels pouvant servir comme base de données pour l'identification. Nous reportons dans les tableaux ci-dessous des diagrammes types pour toutes les conditions d'extractions des protéines salivaires des patients malades et de sujet sain. (A : Présence de la bande, 0 : Absence de la bande, M : Mobilités : échantillons).

4.1. Tableau15: Diagrammes types des protéines salivaires dans des conditions dénaturantes et réductrices pour le cas d'Alzheimer

Bandes	M E	1 (T)	2	3	4	5	6	7	8
1	47.4	0	1	0	1	1	0	0	1
2	61.4	1	1	0	1	1	1	1	1
3	65.4	1	1	0	1	1	1	1	1
4	71.4	0	1	0	0	1	0	0	0
5	75.4	0	1	0	0	1	0	0	0
6	79.4	0	1	0	0	1	1	1	0
7	83.4	0	1	0	0	1	1	0	1
8	91.4	0	1	1	1	1	1	1	1
9	98.4	1	1	1	1	1	1	1	1
10	104	0	0	0	1	0	0	0	0
11	108	0	0	1	0	1	1	1	0
12	114	1	1	0	1	0	0	0	0
13	117.4	1	0	0	0	1	0	0	0
14	119.4	0	1	1	0	1	0	0	0
15	123.4	0	1	0	1	1	0	0	1
16	131.4	0	0	1	0	0	0	0	1
17	134	0	0	1	0	1	0	0	0
18	140	0	1	0	1	0	0	0	0
19	143	0	0	1	0	1	0	0	0
20	146	0	0	1	1	1	1	0	1
21	149	1	1	1	0	1	1	1	1

4.2. Tableau16 : Diagrammes types des protéines salivaires dans les conditions dénaturantes et réductrices pour le cas de Parkinson

Bandes	M E	1 (T)	2	3	4	5	6	7	8
1	3	1	0	0	1	0	0	1	0
2	6	0	0	0	0	0	0	1	0
3	8	0	1	1	1	0	0	0	0
4	33	0	0	0	1	0	0	0	0
5	37	0	1	0	0	1	1	1	0
6	48	0	1	1	0	1	1	0	0
7	52	0	0	0	0	0	0	1	0
8	62	1	1	1	0	1	1	0	0
9	63.9	0	0	0	0	0	0	0	1
10	65	1	1	1	0	1	1	1	0
11	76	0	0	0	0	0	0	1	1
12	78	1	1	0	0	0	0	0	0
13	80	0	0	0	0	1	1	1	1
14	84.4	0	1	0	0	1	1	0	0
15	95	0	1	0	1	1	0	1	0
16	99	1	1	0	1	1	1	1	1
17	111	1	1	0	1	1	1	1	1
18	120	0	0	0	1	1	0	0	0
19	125	1	0	0	1	1	0	0	0
20	132	1	0	0	1	0	0	0	0
21	137	1	1	1	0	0	0	0	0
22	141	1	1	1	1	1	0	0	1

23	145	0	0	0	1	0	0	0	0
24	147	0	0	0	1	0	0	0	0
25	149	1	1	1	1	1	1	1	1

4.3. Tableau 17: Diagrammes types des protéines salivaires dans les conditions non dénaturantes et non réductrices pour le cas d'Alzheimer.

Bandes	M/E	1(T)	2	3	4	5	6	7	8
1	5	1	1	1	1	1	1	1	1
2	8	1	1	1	1	1	1	1	1
3	23	0	0	0	0	0	1	1	1
4	26	1	1	1	1	1	0	1	1
5	29	1	1	0	1	1	0	0	0
6	31	0	1	1	1	1	0	0	0
7	37	0	0	0	0	0	0	0	1
8	41	1	1	1	1	1	1	1	0
9	43	0	0	0	0	0	0	1	0
10	45	0	0	0	0	0	1	1	0
11	48	0	0	0	1	0	0	0	1
12	52	0	1	0	0	0	0	0	0
13	56	0	0	0	0	0	0	0	1
14	60	1	0	1	1	0	0	0	1
15	64	0	1	1	1	0	0	0	1
16	70	0	1	0	1	1	0	0	1
17	72	0	0	0	0	1	1	1	0
18	73	1	0	1	0	1	0	0	0

19	75	0	1	0	1	0	0	0	0
20	80	0	1	0	0	0	0	0	1
21	85	0	1	0	1	0	1	0	1
22	89	0	1	0	0	1	0	0	1
23	91	0	1	0	1	1	0	0	0
24	92	0	1	0	1	0	0	0	0
25	94	0	1	0	0	1	0	0	1
26	97	0	0	0	0	0	0	1	1
27	100	1	1	1	1	1	1	0	0
28	102	0	0	0	0	0	0	1	1
29	107	0	1	1	0	0	1	0	1
30	109	0	0	0	0	0	0	1	0
31	112	1	1	1	1	1	0	0	0
32	118	1	0	0	0	0	0	0	1
33	120	0	0	1	0	0	0	0	0
34	122	1	1	1	1	1	1	0	0
35	124	1	0	1	0	0	0	0	0
36	129	0	0	1	0	0	0	0	0
37	132	0	0	1	0	0	0	0	0
38	136	1	0	0	0	0	0	0	0

4.4. Tableau 18: Diagrammes types des protéines salivaires dans des conditions non dénaturantes et non réductrices pour le cas de Parkinson

Bandes	M/E	1 (T)	7	6	5	4	3	2	1
1	4	1	1	1	1	1	0	1	1
2	5	1	1	1	1	1	1	1	1
3	8	1	1	1	1	1	1	1	1
4	18	0	0	0	0	0	0	1	0
5	20	0	0	0	1	0	0	0	0
6	23	0	1	1	0	0	1	0	1
7	25	0	0	0	0	0	1	1	0
8	27	1	1	1	1	1	0	0	0
9	29	1	0	1	1	0	1	1	0
10	31	0	0	1	1	0	1	1	0
11	36	0	0	0	0	0	1	0	0
12	40	0	0	0	0	0	0	1	0
13	43	1	1	1	1	1	1	0	0
14	45	0	0	0	0	0	0	1	0
15	59	0	1	0	1	0	0	1	0
16	63	0	1	0	1	1	1	0	0
17	66	0	0	0	0	0	0	1	0
18	69	0	1	0	1	0	0	0	1
19	74	1	0	0	1	1	1	1	0
20	76	0	1	1	0	0	0	0	0
21	83	1	1	0	1	0	1	1	0
22	86	1	1	0	1	0	0	0	1
23	90	0	1	0	1	1	0	0	0

24	94	0	0	0	0	1	1	1	1
25	99	0	0	1	0	0	0	0	0
26	101	1	1	0	1	1	1	0	1
27	103	0	1	0	1	1	1	1	0
28	105	0	1	0	0	1	1	1	0
29	107	0	1	0	1	1	0	0	1
30	110	0	0	0	0	0	0	0	1
31	112	1	1	1	1	1	1	0	0
32	116	0	0	0	0	0	0	0	1
33	120	1	1	1	1	1	0	0	0
34	127	0	0	0	1	1	0	1	0
35	133	0	0	0	0	0	0	1	0
36	135	1	0	0	0	0	0	0	0

5. Indice de similarité des diagrammes protéiques

Pour quantifier l’analogie ou la dissemblance des diagrammes, on calcule un indice de similarité ou de dissimilarité inspiré de Dedio, et al., (1969). L’indice de similarité (IRS) est calculé en rapportant l’IAS (indice de similarité absolue) au nombre total (N) des composants présents dans l’un au moins des diagrammes des échantillons comparés. L’IAS présente l’ensemble des bandes qui ne sont pas significativement différentes entre les deux diagrammes. On considère qu’une bande n’est pas significativement différente d’une autre lorsqu’elles sont de même mobilité et/ou qu’elles ne se distinguent pas par au moins deux classes de concentration.

$$\text{IRS} = \text{IAS} / \text{N} \times 100$$

Les valeurs de l’IRS sont rassemblées dans les tableaux 15-18

Des valeurs faibles signifient que les diagrammes présentent de nombreuses dissemblances et inversement, lorsque les diagrammes apparaissent très voisins.

La plupart des échantillons restent différenciables car leurs diagrammes présentent au moins une différence significative.

5.1. Indice de similarité des protéines salivaires non dénaturées et non réduites cas d'Alzheimer :

Les indices de similarités ont été effectués pour les 8 échantillons (7 malades atteints d'Alzheimer et un sujet sain pour chaque). Ils sont représentés sous forme de matrice (tableau19). Il en ressort que l'indice de similarité se situe entre 50 et 92%.

La valeur d'IRS la plus élevée de cette condition est de 92%, cette dernière se présente entre les patients 8 et 1. Une valeur moyenne de 72% est observée entre les patients 2 et 7 et entre 3 et 6.

Des valeurs moins élevées sont observées entre les patients 6 et 7 avec un IRS de 50%

Tableau 19: Indice de similarité des protéines salivaires dénaturées et réduites cas d'Alzheimer

1	2	3	4	5	6	7	8	
100	63	87	69	80	73	63	92	1
	100	83	67	58	76	71	67	2
		100	84	69	72	75	74	3
			100	74	74	76	65	4
				100	65	70	67	5
					100	50	53	6
						100	71	7
							100	8

5.2. Indice de similarité des protéines salivaires dénaturées et réduites dans le cas de parkinson

Les indices de similarité réalisés pour les 8 échantillons (7 atteints de parkinson et 1 témoin) sont représentés dans le tableau 20. L'indice de similarité se situe entre 13% et 72%. Les valeurs des IRS entre Le patient 7 et le patient 3 (IRS=13%) et entre le patient 6 le patient 4 (IRS= 16%) sont considérées comme valeurs faibles, cela signifie que les diagrammes présentent de nombreuses dissemblances, donc ces sujets présentent une composition en protéines salivaires très dissemblables. Quant aux valeurs maximales, (72% dans le tableau) qui est une valeur

élevée, les diagrammes apparaissent voisins. La valeur moyenne d'indice de similarité révélée (IRS=42%) a été trouvée entre les patients 1 et 7.

Tableau20 : Indice de similarité des protéines salivaires dénaturées et réduites dans le cas de parkinson.

1	2	3	4	5	6	7	8	
100	67	72	71	71	33	58	29	1
	100	54	30	60	53	33	25	2
		100	18	33	33	13	17	3
			100	26	16	26	27	4
				100	69	35	33	5
					100	29	25	6
						100	42	7
							100	8

5.3.Indice de similarité des protéines salivaires non-dénaturées et non réduites cas d'Alzheimer :

Les indices de similarités ont été effectués pour les 8 échantillons (7 malades et un sujet sain pour chaque), l'indice de similarité se situe entre 11 et 68%.

D'après le tableau21:

La valeur la plus faible est retrouvée entre le patient 7 et le patient 2 (IRS=11%),ce qui signifie que les diagrammes présentent des dissemblances.

On remarque que Seulement des valeurs moyennes ont été détectées. La valeur d'IRS maximale est estimée à 68%, entre les deux patients 4 et 2 . La valeur moyenne d'indice de similarité révélée (IRS=33%) a été trouvée entre quelques patients comme la patiente 6 avec la patiente 5. Et les patients 6 ave 2

Tableau21 : Indice de similarité des protéines salivaires non-dénaturées et non réduites le cas d'Alzheimer.

1	2	3	4	5	6	7	8	
100	38	47	38	52	29	16	15	1
	100	35	68	55	33	11	36	2
		100	43	43	30	17	21	3
			100	48	29	17	30	4
				100	33	25	19	5
					100	40	17	6
						100	26	7
							100	8

5.4.Indice de similarité des protéines salivaires dénaturées et réduites dans le cas du parkinson

Les indices de similarités ont été effectués pour les 8 échantillons (7 atteints du parkinson et 1 témoin), ils sont représentés sous forme de matrice dans le tableau 22. L'indice de similarité se situe entre 12% et 67%. Le patient 7 avec le patient 3 (IRS=12%) représentent la valeur la plus faible la même chose entre le patient 7 et le patient 8 (IRS=16%).

La valeur d'IRS maximale qui est estimée à 67%, et se présente entre les deux patients 3 et 4. La valeur moyenne d'indice de similarité révélée (IRS=38%) a été trouvée entre les patients 1 et 6.

Tableau 22: Indice de similarité des protéines salivaires non dénaturées et non réduites dans le cas du parkinson

1	2	3	4	5	6	7	8	
100	45	47	55	45	38	24	26	1
	100	41	67	59	36	25	36	2
		100	38	33	33	12	21	3
			100	61	42	34	29	4
				100	48	35	29	5
					100	33	23	6
						100	16	7
							100	8

Il existe une relation entre l'hétérogénéité électrophorétique des protéines salivaires et l'état physiologique est pathologique des patients atteints d'Alzheimer et la même chose pour ceux atteints du Parkinson. Les patients dont les diagrammes sont très proches ont en effet généralement une composition protéique voisine et présentent naturellement à la fois des ressemblances protéiques d'où physiologique et/ou pathologique proche et des indices de similarités élevés. A l'inverse, celles dont les diagrammes sont très différentes, ont le plus souvent des origines physiologiques et/ou pathologiques éloignées et des IRS faibles. Quelques soit la condition utilisée.

Conclusion et perspectives

Ce travail a été effectué pour explorer le protéome salivaire des patients atteints des maladies d'Alzheimer et Parkinson et le comparer avec celui du sujet sain par application des techniques d'électrophorèse monodimensionnelles 'SDS-PAGE', pour la recherche de protéines spécifiques pouvant avoir la propriété de biomarqueur pour le diagnostic de la maladie.

La méthode de séparation des protéines utilisée est celle de Laemeli (1970) modifiée par Singh (1991). Le choix de cette méthode était dans le but d'avoir une meilleure expression des protéines salivaires. Pour cela, la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide a été réalisée dans deux conditions différentes : dénaturantes réductrices et non dénaturantes non réductrice.

L'utilisation de ces critères pour le fractionnement des protéines salivaires (en conditions dénaturées réduites et non dénaturées non réduites) nous a fourni des diagrammes satisfaisant et nous a permis de :

- Comparer les profils électrophorétiques des sujets malades avec ceux des témoins et de remarquer que chacun des échantillons possède un profil protéique qui est propre et qui peut rassembler ou pas à celui d'un autre échantillon ou celui du témoin par l'absence ou la présence d'une ou plusieurs protéines.
- Révéler les mobilités relatives de chacune des bandes protéiques de haut et de faible poids moléculaire.
- Dénombrer des bandes protéiques communes entre les différents échantillons.
- Distinguer les différences dans la composition protéiques des malades et des témoins.
- Identifier quelques protéines susceptibles d'être des biomarqueurs salivaires des deux maladies.

En outre, l'analyse statistique effectuée en calculant les fréquences, l'indice de similarité et la classification hiérarchique, a permis d'apprécier numériquement la diversité des protéines salivaires dans les deux conditions.

L'analyse de ces gels a permis de déceler 21 bandes protéiques de mobilités différentes pour les protéines dénaturantes et réduites dans le cas de l'Alzheimer (2 bandes protéiques de HPM et 19 bandes protéiques de FPM). Dans le cas de la maladie de Parkinson, 25 bandes de mobilités différentes sont dénombrées (9 HPM et 16 de FPM). Dans les conditions non dénaturantes et non réductrices, 38 bandes protéiques sont observées dans le cas d'Alzheimer, (17 bandes protéiques de HPM et 21 de FPM), tandis que pour le cas de Parkinson 36 bandes de mobilités différentes sont constatées (19 bandes protéiques de HPM et 17 bandes de FPM).

Une nette différence est observée entre le profil du sujet sain et des patients atteints des maladies d'Alzheimer ou Parkinson. Dans les conditions dénaturantes et réductrices, 5 bandes protéiques communes entre les différents échantillons (B2, B3, B9, B14 et B15) sont révélées dans le cas d'Alzheimer, alors que 3 bandes protéiques (B6, B8 et B16) sont identifiées dans le cas de Parkinson. Dans les conditions non dénaturantes et non réductrices, 4 bandes protéiques (B23, B27, B34 et B38) sont détectées pour le cas d'Alzheimer, et 6 bandes protéiques (B23, B26, B29, B28, B33 et B36) pour le cas de Parkinson. Ces bandes sont les plus variables qualitativement et quantitativement et sont soit absentes ou présentes d'intensité égale ou différentes par rapport à celles obtenues sur le profil du témoin.

La comparaison des profils électrophorétiques a montré des variations d'expression quantitatives et qualitatives avec des intensités égales ou différentes par rapport à celles du témoin, certaines sont surexprimées, d'autres sont à l'état de traces : B2, B3, B9, B15, B 27 et B 34 (cas d'Alzheimer) et B8, B16, B26 et B33 (cas de Parkinson). Certaines protéines ne s'expriment que chez les malades de MA et MP et sont absentes chez le témoin ; B14 et B23 (cas d'Alzheimer) et B6, B23, B28 et B 29 (cas de Parkinson).

L'application de la technique d'électrophorèse monodimensionnelle nous a fourni des résultats satisfaisants mais elle reste insuffisante pour diagnostiquer les maladies d'Alzheimer et Parkinson. Pour cela, nous envisageons l'emploi de l'électrophorèse bidimensionnelle pour une meilleure séparation des protéines d'intérêt. Ceci sera poursuivi par la caractérisation de ces protéines par spectrométrie de masse afin d'identifier les protéines susceptibles d'être considérées comme des biomarqueurs potentiels de ces pathologies neurodégénératives.

Références Bibliographiques

- [1]. Agid Y. **1991**. Parkinson's disease: pathophysiology. *Lancet*, 337: 1321-4. (02).
- [2]. Albin RL, Young AB, Penney JB. **1989**. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *neurosci*; 12: 366-75.
- [3]. Arellano M., Jiang J., Zhou X., Zhang L., et al. **2009**. Current advances in identification of cancer biomarkers in saliva. *Front Biosci*, b1: 296-303.
- [4]. Bayard S., Cohen V, Dauvilliers Y. **2011**. Le syndrome de dysrégulation dopaminergique dans la maladie de Parkinson et le syndrome des jambes sans repos. *psychol neuropsychiatr vieil*, 9(2): 227-35.
- [5]. Beach T., Adler C., Dugger B., et al. **2013**. Submandibular gland biopsy for the diagnosis of Parkinson disease. *Neuropathol Exp Neurol*, 72 : 130-6.
- [6]. Beard, R.L. **2004**. In their voices: Identity preservation and experience of Alzheimer's disease. *Journal of Aging Studie*, 18: 415-428.
- [7]. Berchtold N.C., Cotman C.W. **1998**. Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s. *Neurobiol Aging*, 19 (3) : 173–189.
- [8]. Bermejo-Pareja F., Antequera D., Vargas T., Molina J. A., Carro E. **2010**. Saliva levels of Aβ₁₋₄₂ as potential biomarker of Alzheimer's disease: a pilot study. *Bmc Neurology*, 10 : 10-108.
- [9]. Bonnet A.M., Hergueta T. **2007**. La maladie de Parkinson au jour le jour.(ed.). *John Libbey Eurotext*, pp.185.
- [10]. Buée, L., Delacourte, A. **2002**. La maladie d'Alzheimer : une tauopathie parmi d'autres. *Médecine/Sciences*, 18 : 727-736.
- [11]. Butterfield D.A., Lukiw W., Pappolla M., Pelaez R., Bazan N. **2004**. Alzheimer's disease , A Dysfunction in Cholesterol and Lipid Metabolism Cellular and Molecular *Neurobiology*, 25: 475-783.
- [12]. Carpenter M., Sutin J. **1988**. Human neuroanatomy. 8^e edition. *Williams and Wilkins*, pp.872. [15]
- [13]. Carrillo-Mora P., Luna R., Colín-Barenque L. **2014**. Amyloid Beta: Multiple Mechanisms of Toxicity and Only Some Protective Effects?. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014: 1-15.
- [14]. Chang C.Y, Silverman D.H. **2004**. Accuracy of early diagnosis and its impact on the management and course of Alzheimer's disease. *Expert Rev Mol Diagn*, 4(1): 63 – 9.

- [15]. Chevallier C. **2012**. Les médicaments dopaminergiques : De la maladie de Parkinson aux traitements des addictions. Thèse pour le diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. Grenoble.
- [16]. Del Tredici K., Hawkes C.H., Ghebremedhin E. et al. **2010**. Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and sporadic parkinson's disease. *Acta Neuropathol*, 119 :703-713.
- [17]. Denny P., Hagen F.K., Hardt M., Liao L.J., Yan W.H. **2008**. The proteomes of human parotid and submandibular/sublingual gland salivas collected as the ductal secretions. *Journal of Proteome Research*, 7: 1994-200.
- [18]. Dimitri B. **2010**. Création d'une spin-off pour la valorisation des recherches sur un dispositif d'évaluation de la maladie de Parkinson par accéléromètres et Gyroscope. *Assessment and Regulation Kit Parkinson*, 210: 55-122.
- [19]. Dujardin K, Defebvre L. **2007**. Neuropsychologie de la maladie de Parkinson. (ed.). Masson, Paris, pp.176.
- [20]. Duyckaerts C., Pasquier F. **2002**. Démences ouvrage collectif coordinateur.(ed.). Doin, Paris, pp.70.
- [21]. Duyckaerts C., Dickson D. **2003**. Neuropathology of alzheimer's disease. In : dickson D neurode-generation: the molecular pathology of dementia and movement disorders. (ed). *isn neuropath press*, Basel, pp. 47-65.
- [22]. EI-Agnaf O.M, Salem S.A, Paleologou K.E, et al. **2003**. Alphasynuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB J*, 17(13): 1945-7.
- [23]. Elbaz A., Moisan F. **2010**. Parkinson's disease: is there a strong environmental contribution?. *Rev.Neurol*, 166, Issue 10: 757-763.
- [24]. Engelborghs S., De Vreese K., Van de Castele T., Vanderstichele H., Van Everbroec B., CrasP., Martin J.J., Vanmechelen E., De Deyn P.P. **2008**. Diagnostic performance of a CSF- biomarker panel in Aotopsy-confirmed dementia. *Neurobiology of aging*, 29 : 1143-1159.
- [25]. Farris W., Mansourian S., Chang Y., Lindsley L., Eckman E.A., et al. **2003**. Insulin degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid 3-protein, and the 3-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 4162-4167.
- [26]. Fenoll-Palomares C., Munoz Montagud J., Sanchiz V., et al. **2004**. Unstimulated salivary flow rate, pH and buffer capacity of saliva in healthy volunteers. *Rev. Esp. Enferm. Dig*, 96 (11): 773-783.

- [27]. Ferri C. P., Prince, C., Brayne., et al., **2005**. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *The Lancet*, 366 (9503): 2112–2117.
- [28]. Fraser G.A, Meyer R.M. **2007**. Biomarkers and the design of clinical trials in cancer. *Biomark Med*, 1(3):387-97.
- [29]. Fratiglioni L., Launer L. J., Andersen K., Breteler M.M., Copeland J. R., Dartigues J.F., lobo A., Martinez-Lage J., Soininen H., Hofman, A. **2000**. Incidence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurology*, 54, S10-5.
- [30]. Gateff d. **2009**. Les thérapies cellulaire dans le cadre de la maladie de parkinson : vers une nouvelle ere thérapeutique ?. *Université Henri Poincaré – Nancy 1*, pp 75-152.
- [31]. Giovannoni G., O'Sullivan J.D., Turner K., Manson A.J., Lees A.J. **2000**. Hedonistic homeostatic dysrégulation in patients with Parkinson's disease on dopamine replacement therapies. *J.Neurol. Neurosurg. Psychiatr*, 68(4): 423-428.
- [32]. Goedert M., Spillantini M.G., Jakes R., Rutherford D., Crowther R.A. **1989**. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein Tau: Sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*, 3:519-526.
- [33]. Grundke-Iqbal I, Iqbal K., Tung Y.C., et al. **1986**. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci*, 83: 4913–4917.
- [34]. Haan M. N. **2005**. La prévention primaire de la démence en population .(ed.) .*Serdi* , Paris , pp.226.
- [35]. Hamosh M., Burns W.A. **1977**. Lipolytic activity of human lingual glands (Ebner). *Laboratory Investigation*, 37: 603-608.
- [36]. Hecaen H. **1977**. La dominance cérébrale. *La Recherche*, 76: 236-244.
- [37]. Henderson V.W. **1997**. The epidemiology of estrogen replacement therapy and Alzheimer's disease. *Neurology*, 48: 27-35.
- [38]. Hirtz C., Chevalier F., Cristophe E.J., Bringer J., et al. **2005**. Preliminary research for human salivary makers in type 1 diabetes. *Les cahiers de l'ADF N°18*, 19: 4-9.
- [39]. Humphrey S.P., Williamson R.T. **2001**. A review of saliva : normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent*, 85: 162-9.
- [40]. Huq N.L., Cross K.J., Ung M., Myroforidis H., Veith P.D., Chen D., et al. **2007**. A review of the salivary protéome and peptidome and saliva-derived peptide therapeutics. *Int J Pept Res Ther*, 13 : 547-64.

- [41]. James B.D., Schneider J. A. **2010**. Increasing incidence of dementia in the oldest old: evidence and implication. *Alzheimer's Research & Therapy*, 2 : 9-14.
- [42]. Katzenschlager R et al. **2004**. Mucuna pruriens in Parkinson's disease: a double blind clinical and pharmacological study, *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 75:1672-1677.
- [43]. Kefalides P.T. **1999**. Saliva research leads to new diagnostic tools and therapeutic options. *Ann Intern Med*, 131(12): 991-992.
- [44]. Launer L.J., Anderson K., Dewey M.E., et al. **1999**. Rates and Risk factor for dementia and Alzheimer's disease: Results from EURODEM pooled analyses. *Neurology*, 52 : 78-84.
- [45]. Le Bastard N., De Deyn P., Engelborghs S. **2009**. Cerebrospinal fluid Biomarkers for the differential diagnosis of Dementia. *Current Medical Literature – Neurology* , 25 :59-68. (
- [46]. Li Q.X., Campbell B.C., McLean C.A., et al. **2002**. P/atelet alpha- and gamma-synucleins in Parkinson's disease and normal control subjects. *J Alzheimers Dis* 4(4): 309-15.
- [47]. Lindenmeier G., Grillos C., Berghold S., Schneider N., Munster B. **2003**. Biochimie humaine (ed.). *Edition Flammarion*, Paris, pp.596.
- [48]. Longrois D., Agavrioloia M., Devaux Y., Mertes P.M. **2009**. Comments on methodological problems related to the use of biomarkers in clinical practice and research. *Ann Fr Anesth reanim*, 28 (5): 473-81.
- [49]. Macko K., Jarvis C., Kennedy C., Miyaoka M., Shinohara M., Sokoloff L., Mishkin, M. **1988**. Mapping the primate visual system with [214C] desoxyglucose. Faugeras, . Les machines de vision. *La Recherche*, 204: 1334-1346.
- [50]. Mark F.B., Barry W.C., Michael A.P. **1997**. Neurosciences à la découverte du cerveau. (ed.). *Éditions Pradel*, pp. 654.
- [51]. McLellan M.E., Kajdasz S.T., Hyman B.T., Bacskai B.J. **2003**. *In vivo* imaging of reactive oxygen species specifically associated with Thioflavine S-positive amyloid plaques by multiphoton microscopy. *J. Neurosci*, (23): 2212-2217.
- [52]. Mendel I.D. **1989**. The role of saliva in maintaining oral homeostasis. *J Am Dent Assoc*, 119 : 298-304.
- [53]. Mese H., Matsuo R. **2007**. Salivary secretion, taste and hyposalivation. *Journal of oral Rehabilitation*, 34 :711-723.
- [54]. Mishkin M., Ungerleider L., Macko K. **1983**. Object vision and spatial vision: two cortical pathways. *Trends in Neurosciences*, 6: 414-417.

- [55]. Neyraud E., Palicki O., Schwartz C., Nicklaus S., Feron G., **2012**. Variability of human saliva composition: Possible relationships with fat perception and liking. *Archives of Oral Biology*, 57: 556-566.
- [56]. Novak M, Kabat J, Wischik CM. **1993**. Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament. *EMBO J*, 12:365-370.
- [57]. Octave J., Macq A., Philippe B. **1995**. Le précurseur du peptide amyloïde de la maladie d'Alzheimer. *médecine/sciences*, 11: 1251-9.
- [58]. Olanow C.W. **2007**. The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease - 2007. *Mov Disord*, 22: S335-S342.
- [59]. Patry-Morel C. **2006**. *Maladie d'Alzheimer et troubles apparentés : rééducation, théorie et pratique*. Solal, Marseille, pp.91.
- [60]. Pedersen A.M., Bardow A., Jensen S.B., Nauntofte B. **2002**. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Diseases*. 8 : 117-129.
- [61]. PURVES D., AUGUSTINE G.J, FITZPATRICK D., HAL W.C., LAMANTINA A.S., MCNAMARA J.O. **2008**. Neuroscience, General Neuroscience, Medical, Neuroscience. *Sinauer Associates, Inc*, Sunderland, pp. 462-464.
- [62]. QEI-Agnaf O.M., Salem S.A., Paleologou K.E., et al. **2006**. Detection of oligomeric forms of *alpha-synuclein* protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J* , 20 (3): 419-25.
- [63]. Reitz C., Brayne C., Mayeux R. **2011**. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 7: 137–152.
- [64]. Ross C.A, Poirier M.A. **2004**. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 10Suppl: S10-7.
- [65]. Rudelli R.D., Ambler M.W., et al. **1984**. Morphology and distribution of Alzheimer neuritic plaque and amylois plaques in striatum and diencephalon. *Acta Neuropathol*, 64 : 273-281.
- [66]. Sadibelouiz M. **2013**. La maladie d'Alzheimer est incurable à l'heure actuelle. *Santé mag*. N°22 Septembre 2013 (disponible sur www.santemag-dz.com).
- [67]. Sally P.S and Georg D. **2000**. Cerveau gauche Cerveau droit, de. Traduction par Simone Benoit-Dubrocard et Jeanine Blanc-Garin. (ed.). *DeBoeck Université*, pp.416.

- [68]. Scaros O., Fisler R. **2005**. Biomarker technology Roundup : from discovery to clinical applications, a broad set of tools is required to translate from the labto the clinic. *Biotechniques*. Suppl : 30-32.
- [69]. Schenkels, L., Veerman, E., Amerongen A. **1995**. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 6: 161-175.
- [70]. Vanderheyden J.E., Bouilliez D.J. **2004**. Traiter le Parkinson. (ed.). *DeBoek*, pp.358.
- [71]. Wong D.T. **2006**. Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. *JAm Dent Assoc*, 137: 313-321.
- [72]. Yang T., Pauline S. **2013**. La maladie de Parkinson : Evaluation et pistes de prise en chargelogopédique.(ed.). *Haute ecole de la ville de liege categorie paramedicale*, pp. 8-41.
- [73]. Young J.A., Schneyer C.A. **1981**. Composition of saliva in mammalia. *Australian journal of Experimental Biology and Medical Science*. 59, 1-53.

Site web

- [74]. Health of the net foundation. **2012**. *Détecter la maladie d'Alzheimer plus tôt et plus facilement*. [En ligne].Disponible sur « <http://www.doctissimo.fr/> ». [Consulté le 25/05/16].
- [75]. Vivio sprl. **2014**. Parkinson: *détection précoce par la salive*. [En ligne].Disponible sur « <http://fr.medipedia.be/> » [Consulté le 27/05/16].
- [76]. Société du Figaro. **1996**. La maladie de Parkinson. [En ligne].Disponible sur « <http://sante.lefigaro.fr/> ». [Consulté le 02/05/16].

Annexes

Annexes

Annexe : Composition des gels d'électrophorèse

Gel de séparation : T : 12.52% C : 0.97%

- Acrylamide 40% 12.4ml
- Bis acrylamide 2% 2.4ml
- Eau permutée 8.6ml
- Tampon Tris-HCL pH 8.8 15.2ml
- SDS 10% 0.40ml
- APS 1% 1ml
- TEMED 0.020ml

Gel de concentration T : 2.88% C : 1.42%

- Acrylamide 40% 1ml 1ml
- Bisacrylamide 2% 0.3 ml
- Eau permutée 10.2 ml
- Tampon tris-HCL pH 6.8 1.7ml
- SDS 10% 0.14ml
- APS 1% 0.70ml
- TEMED 0.014

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie

Option : Biochimie moléculaire et santé

Thème : RECHERCHE PRÉLIMINAIRE DE BIOMARQUEURS DES MALADIES D'ALZHEIMER ET PARKINSON DANS LA SALIVE HUMAINE**Résumé**

Les maladies neurodégénératives constituent un groupe de pathologies progressives liées à une affection au sein du tissu nerveux, qui sont largement progressés dans le monde au cours de ces dernières années, Les plus célèbres et les plus fréquentes sont la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson, la première est une lésion progressive des neurones du cortex cérébral et l'hippocampe du cerveau traduit par une démence alors que la deuxième est une atteinte spécifique du système dopaminergique entraînant des anomalies du mouvement.

L'utilisation des biomarqueurs protéiques apparaît prometteuse comme outil biologique permettant de distinguer un état médical normal d'un état pathologique et notamment dans le diagnostic précoce. L'objectif de cette étude est d'investiguer et explorer le protéome salivaire des patients atteints de la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson par l'utilisation de la technique d'électrophorèse monodimensionnelle pour la recherche des biomarqueurs salivaires de ces deux pathologies. Pour cela 7 patients ayant la maladie d'Alzheimer et 7 parkinsoniens âgés de 50 ans jusqu'à 85 ans ont été recrutés pour un prélèvement salivaire. Nous avons comparé les profils électrophorétiques obtenus des protéines salivaires du sujet sain et les malades. Les protéines salivaires sont extraites dans deux conditions différentes (dénaturantes réductrices et non dénaturantes non réductrices). L'analyse des gels a permis de dénombrer 21 bandes protéiques de mobilités différentes dans les conditions dénaturantes et réductrices pour le cas d'Alzheimer et 25 bandes protéiques pour le cas de Parkinson, et puis 38 bandes protéiques de mobilités différentes dans les conditions non dénaturantes non réductrices pour le cas d'Alzheimer et 36 bandes protéiques pour le cas de Parkinson dans les mêmes conditions.

Afin d'apprécier numériquement la diversité de ces protéines salivaires, une étude statistique a été effectuée en calculant les fréquences, l'indice de similarité, également en établissant des diagrammes types et une classification hiérarchique des individus selon la composition des protéines salivaires.

Ces résultats préliminaires ont montré des protéines salivaires spécifiques et/ou variantes au cours des maladies d'Alzheimer et de Parkinson susceptibles d'être considérées comme des marqueurs de ces deux pathologies étudiées, ouvre des champs d'investigation nouveaux tant dans le domaine du diagnostic que dans le suivi de ces pathologies.

**Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologie Végétales, Département de Biochimie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie
Université des frères Mentouri Constantine**

Mots clés : Alzheimer, Parkinson, biomarqueurs, salive, électrophorèse, diagnostic

Jury d'évaluation :

Président du jury : *Mr.KHLIFI.D* (Prof- UFM Constantine),
Rapporteur : *Mme.BELLIL.I* (MC - UFM Constantine),
Examineur : *Mme.MOUAS.T.N* (MC - UFM Constantine).