



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Analyse Protéomique et Santé*



Intitulé :

Recherche préliminaire de biomarqueurs dans la salive des parkinsoniens par application des techniques d'électrophorèse

Présenté et soutenu par : **GHALEM Lamia**
ROBAI Hadjer

Le : 01/072015

Jury d'évaluation :

Président du jury : KHELIFI Douadi (Professeur- UFM Constantine).

Rapporteur : BELLIL Inès (Maitre de Conférences- UFM Constantine).

Examineur : BENHAMDI Asma (Maitre Assistante- UFM Constantine).

Année universitaire
2014 – 2015

Remerciements

Louanges à Dieu le tout puissant et le miséricordieux qui a guidé nos pas vers cette issue.

C'est avec sincérité que nous remercions notre professeur Mr. Khelifi douadi, Professeur à l'Université des frères Mentouri Constantine, vous nous avez ouvert les portes de votre laboratoire pour effectuer ce travail, vous nous faites également l'honneur de participer à ce jury et de le présider.

A notre encadreur M^{me} Bellil Inès Maître de Conférences à l'Université des frères Mentouri Constantine qui a accepté avec toute modestie de nous encadrer, pour sa disponibilité, ses conseils avisés, ses exigences, et son esprit critique.

Nous tenons à remercier M^{me} Benhamedi ASMA, Docteur à l'Université des frères Mentouri Constantine, qui a honoré le jury, et qui a accepté de juger ce travail.

Qu'ils trouvent tous ici l'expression de notre plus profond respect et notre profonde gratitude.

Merci à Monsieur Hamri Professeur et Chef du service de Neurologie du C.H.U de Constantine d'avoir facilité notre accès à son service.

Merci à Madame Teghan Docteur spécialiste au C.H.U Constantine pour ses précieuses idées et conseils donnés et à toute l'équipe de la polyclinique Sissaoui.

Nos vifs remerciements vont à M^{me} Meraihi et M^{me} Mechakra de nous avoir accepté dans cette spécialité, accordé leur confiance, et pour leurs précieux conseils, sans oublier tous les professeurs, les enseignants et toutes les personnes du Laboratoire de biologie moléculaire.

Nous remercions également toute l'équipe du laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales en particulier Medouri ASMA et Medoukali IMEN pour leur aide, leurs précieux conseils et leur disponibilité au laboratoire.

Nos remerciements touchent à leur fin, et c'est le moment de remercier tous les membres de nos familles, en commençant par nos parents qui nous ont toujours soutenus et dont la patience et l'encouragement nous ont été très précieux durant nos années d'études, nos sœurs, nos frères et nos cousins.

Qu'ils trouvent ici l'expression de notre profonde affection.

Dédicaces

*Je dédie ce modeste mémoire à **ALLAH** mon dieu éternel, le clément et le
miséricordieux, dans la grâce me permet de réaliser ce travail.*

*J'entame ce rapport de fin d'étude en faisant un dédicace spécialement pour un
personne qui mes très très cher on l'occurrence mon papa **AISSA** l'homme qui m'a
toujours aidée et ma toujours soutenu durant toutes mes réussite à compter de la première
année d'école jusqu'à ce jour.*

Je lui dire merci papa, je t'aime très fort de tout mon cœur.

***FALLA** mon adorable maman, ma très chère maman, elle ma bien aimé,
malgré tout l'amour que je lui donne et toute les reconnaissances que je lui dois m'arrive
jamais a lui rendre tout ce qu'elle m'a donnée, elle ma donnée toute sa vie.*

Je lui dire je t'aime très fort de tout mon cœur.

*Je dédie aussi ce travail a mes sœurs **AICHA, WASSIMA, SAMEH,***

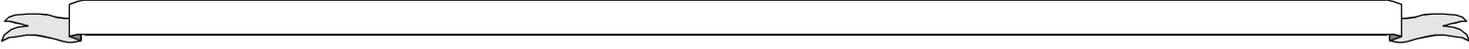
FADILA** et **AMEL

*À mes frères **FAÇAL** et **MOUNIR***

*À mon fiancé **OKBA** qui a toujours là pour moi, et qui m'a donné un
magnifique courage pour m'aider à finir ce modeste travail.*

Et tous ceux qui me sont cher

LAMIA



Dédicace

Pour la mémoire de mon père

Il est un être qui nous a quittés trop tôt et qui a marqué profondément ma vie. Je pourrais dire sans me tromper que c'est l'être le plus extraordinaire que j'ai reconnu.

Il m'a inculqué le vrai sens de l'honneur, de la conscience, de la justice. C'était un être vrai il a également été considéré comme l'un des hommes les plus décorés dans notre pays tant du côté religieux que civil ou humanitaire. C'est à mon père décédé honorable Monsieur Robai Yacine.

A ma très chère mère

Honorable, aimable: tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. La prière et la bénédiction m'ont été un grand secours pour mener bien mes études

Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants le bon chemin dans leurs vies et leurs études. Je te dédie ce travail à ma très chère mère Draoui Ilhem.

A mon seul et unique frère Yacine Taki Eddine. Merci pour ton soutien et encouragement durable que Dieu te protège

A toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de ce mémoire. A mes cousines: Nihad et Imene. A mes amis: Salah, Sara et Lamia

Et à tous ce qui me sont chères.....



Abréviations

APS	A mmonium P ersulfate
CNRS	Centre National de la Recherche scientifique
EGF	Epithelial Growth Factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
GPe	Pallidum externe
GPi	Pallidum interne
IgA	Immunoglobuline A
IGF	Insulin-like growth factors
IgG	Immunoglobuline G
IgM	Immunoglobuline M
IRM	Imageries par résonance magnétique
LRRK2	Leucine-rich repeat kinase 2
MAO	Monoamine-oxydase
MAO-B	Monoamine-oxydase de type B
MP	Maladie de Parkinson
MPF	Maladie de Parkinson Familiale
MPI	Maladie de Parkinson Idiopathique
MPtP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
NST	Noyau Sous-Thalamique
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SNC	Système Nerveux Central
SNC	Substance Noire compacta
SNCA	α -synucléine
SNr	Substance Noire reticulata
TCA	Trichloracétique Acide
TIQs	Tétrahydroisoquinoléines
TEMED	N,N,N',N'- T étraméthyléthylénediamine

Sommaire

Introduction générale.....	1
-----------------------------------	----------

CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I-La maladie de Parkison.....	3
1-Définition.....	3
2- Epidémiologie	3
3-Physiopathologie.....	4
3.1. Circuits neuronaux touchés.....	4
3.2. Physiopathologie tissulaire : les systèmes neuronaux touchés.....	6
3.3. Physiopathologie moléculaire	6
3.4. Rôle de vieillissement du système dopaminergique	8
4-Evolution des formes cliniques.....	8
4.1. La lune de miel.....	8
4.2. Etape des complications motrices liées au traitement.....	9
5-Étiologie (Facteurs de risques)	9
5.1. Facteur de risque non génétique	9
5.1.1. Facteurs environnementaux.....	9
5.1.2. Le tabac.....	10
5.1.3. Les autres facteurs de risque non génétique.....	10
5.2. Facteurs de risque génétiques.....	11
II. La salive.....	13
1. Définition.....	13
2. Composition biochimique de la salive.....	13
2.1. Constituants inorganique de la salive.....	13
2.2 .Constituants organiques de la salive.....	14
3- Caractéristiques physicochimiques de la salive.....	15
3.1 La viscosité.....	15
3.2 Le pH.....	15
3.3 Le pouvoir tampon.....	15
3.4 Le débit salivaire.....	15

Sommaire

4- Le rôle de la salive.....	15
4.1. Protection de l'épithélium.....	15
4.2. Fonction digestive.....	16
4.3. Fonction de protection.....	16
4.4. Fonction de cicatrisation.....	16
III. Les biomarqueurs.....	16
1-Définition.....	16
2-Biomarqueurs sanguins et urinaire de la maladie de Parkinson.....	17
2.1. α -synucléine.....	17
2.2. Autres marqueurs.....	17

Chapitre 2 : matériel et méthodes

1-Matériel.....	18
1.1. Recrutement des patients.....	18
1.2. Recueil de la salive.....	18
2-Méthodes.....	18
2.1. Exploration des protéines salivaires	18
2.1.1. Dans des conditions dénaturantes et réductrices.....	18
2.1.2. Dans des conditions dénaturantes et non réductrices.....	19
2.2. Electrophorèse monodimensionnelle en gel de polyacrylamide.....	19
2.3. Lecture des électrophoregrammes.....	19
2.4. Analyse statistique.....	19

Chapitre 3 : résultats et discussion

I. Fractionnement des protéines et recherche de biomarqueurs	20
1- Analyse des profils électrophorétiques.....	20
1.1. Analyse des protéines salivaires fractionnées par SDS-PAGE dans les conditions dénaturantes et réductrices.....	20

Sommaire

1.2. Analyse des protéines salivaires fractionnées par SDS-PAGE dans des conditions dénaturantes et non réductrices.....	24
2. Etude de la variation des protéines salivaires.....	27
2.1 Etude de la variabilité des protéines salivaires dénaturées et réduites.....	27
2.1.1 Etude des protéines salivaires de HPM	27
2.1.2 Etude des protéines salivaires de FPM	29
2.2 Etude de la variabilité des protéines salivaires dénaturées et non réduites.....	32
2.2.1 Etude des protéines salivaires de HPM.....	32
2.2.2 Etude des protéines salivaires de FPM.....	32
3. Classification hiérarchique des protéines salivaires.....	34
3.1. Dondrogramme des protéines salivaires dénaturées et réduites	34
3.2. Dondrogramme des protéines salivaires dénaturées non réduites	36
4. Indice de similarité des diagrammes protéiques des échantillons.....	37
4.1. Indice de similarité des protéines salivaires dénaturée et réduites.....	38
4.2. Indice de similarité des protéines salivaires dénaturée et non réduites.....	39
II. Conséquence de la maladie de Parkinson sur le protéome salivaire	40
<hr/>	
Conclusion générale et perspectives.....	42
<hr/>	
Références bibliographiques.....	48
<hr/>	
Annexe.....	52

TABLE DES FIGURES

CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure 1 : Nombre d'individus affectés par la maladie de Parkinson sur 100 000 habitants en 2004.....	4
Figure 2 : coupe frontale idéalisée du cerveau ainsi qu'une coupe transversale du mésencéphale	5
Figure 3 : types d'agrégats de l'alpha-synucléine	7
Figure 4 : devenir du MPTP dans la cellule.....	10

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

Figure 5 : profils électrophorétiques des protéines salivaires dans les conditions dénaturantes et réductrice révélées par SDS/PAGE.....	21
Figure 6 : profils électrophorétiques des protéines salivaires dans des conditions dénaturantes et réductrice révélées par SDS/PAGE.....	22
Figure 7 : profils électrophorétiques des protéines salivaires dans des conditions dénaturantes et non réductrices révélées par SDS/PAGE.....	23
Figure 8 : profils électrophorétiques des protéines salivaires dans des conditions dénaturantes et non réductrices révélées par SDS/PAGE.....	24
Figure 9 : dendrogramme des 49 échantillons révélés dans les conditions dénaturantes et réductrices fractionnés par SDS/PAGE.....	37
Figure 10 : dendrogramme des 49 échantillons révélés dans les conditions dénaturantes et non réductrices fractionnés par SDS/PAGE.....	36

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 1 : échelle de Hoehn et Yarh.....	8
Tableau 2 : Mutation de différentes protéines impliquées dans la maladie de Parkinson.....	12
Tableau 3 : concentration ionique de la salive en mEq/L	13

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau 4 : variation des bandes protéiques B15, B26, 37, B40.....	20
Tableau 5 : variation des bandes protéiques B10, B19, B34, B40.....	24
Tableau 6 : variabilité des protéines salivaires de HPM.....	28
Tableau 7 : variabilité des protéines salivaires de FPM.....	30
Tableau 8 : variabilité des protéines salivaires de HPM.....	31
Tableau 9 : variabilité des protéines salivaires de FPM.....	33
Tableau 10 : indices de similarité des protéines salivaires dénaturées et réduites révélées par SDS /PAGE.....	38
Tableau 11 : indices de similarité des protéines salivaires dénaturées et non réduites révélées par SDS-PAGE.....	39

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction générale

Plus de 600 troubles qui touchent le système nerveux sont regroupés sous le terme de maladies neurodégénératives. Ces dernières forment un groupe hétérogène, pouvant être d'origine génétique ou héréditaire ou parfois sporadique. Certaines conditions telles que les toxines environnementales et des produits chimiques peuvent entraîner ces maladies.

Ces troubles, souvent associés à une atrophie des structures du système nerveux central ou périphérique, perturbent la transmission des informations sensorielles et le contrôle des mouvements [36]. Le tableau clinique peut être une atteinte de dysfonctionnement du contrôle de la motricité comme dans la maladie de Parkinson (MP).

La maladie de Parkinson est une affection dégénérative due à la mort progressive des neurones situés dans une zone du cerveau appelée *Locus niger* (substance noire) et à la présence d'inclusions cytoplasmiques connues sous le nom de *corps de lewy* dans les neurones survivants [39]. Des études épidémiologiques, sont réalisées, néanmoins la MP touchait quatre millions de personnes dans le monde en 2013[11].

En général, le diagnostic de la MP est établi à partir d'un examen clinique de la personne. Il repose tout d'abord sur l'éviction des autres causes possibles de symptômes retrouvés (le tremblement de repos, akinésie, la rigidité), le scanner et l'IRM peuvent s'avérer utiles pour cela [15]. Certaines formes de la maladie, n'entraînent jamais ces symptômes (stade initial), et plusieurs autres conditions peuvent simuler à s'y méprendre des symptômes semblables comme le cas de syndrome parkinsonien secondaire.

Pour cela, le diagnostic de la MP est parfois difficile à établir [15]. À l'heure actuelle, il n'y a pas de test validé pour aider à diagnostiquer la maladie de Parkinson, ce qui fait qu'un nombre non négligeable de malades concernés sont mal diagnostiqués ou diagnostiqués en retard. C'est la raison pour laquelle les chercheurs s'intéressent de plus en plus à cette pathologie [40].

Des chercheurs américains ont mis au point un premier test, expérimental, permettant un diagnostic biologique, objectif, de la MP. Ils ont montré dans les autopsies de patients atteints de parkinson que les protéines anormales associées à la maladie de parkinson sont toujours retrouvées dans les glandes salivaires sous-maxillaires, situées sous la mâchoire inférieure. 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 marqueurs salivaires. Ces données devraient nous permettre une approche différente de la

Introduction générale

physiopathologie des maladies neurodégénératives, en particulier pour la maladie de Parkinson.

L'objectif principal de ce travail consiste à explorer de manière aléatoire les protéines salivaires de sujets sains et de patients atteints de la maladie de Parkinson puis de mener une caractérisation la plus exhaustive possible des différents biomarqueurs (protéines salivaires variantes) de cette pathologie. 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.

Les données bibliographiques sont présentées dans le premier chapitre de ce mémoire, avec une présentation générale de la maladie de Parkinson et sa physiopathologie, tout en mettant l'accent sur la salive ainsi que les biomarqueurs. Le deuxième chapitre décrit le matériel biologique et l'ensemble des méthodes utilisées dans notre étude. Les étapes suivies dans l'exploitation des résultats ainsi que leur discussion sont présentées dans le troisième chapitre. Une conclusion générale et des perspectives sont enfin données.

CHAPITRE 1

REVUE

BIBLIOGRAPHIQUE

1. Définition

La maladie de Parkinson (MP) est la seconde pathologie chronique neuro-dégénérative qui touche le système nerveux central après la maladie d'Alzheimer et se situe en quatrième position des maladies neurologiques [47]. Elle provoque des troubles essentiellement moteurs Elle est décrite par James parkinson en 1817 [15].

Par ailleurs, il existe deux types pour cette maladie : la forme sporadique, qui est idiopathique, et la forme familiale, héréditaire. La première est largement plus présente que la seconde [15]. Cette maladie est caractérisée par la dégénérescence d'une population des cellules nerveuses situées dans le « *locus niger* » ou « substance noire », il s'agit de système dopaminergique de la voie nigro-strié [10]. Ces neurones sont responsables de la production de dopamine, un neurotransmetteur qui intervient dans le contrôle des mouvements. Lorsque la maladie est diagnostiquée, 60 à 80% de ces neurones ont déjà disparu [15]. La disparition progressive de ces cellules entraîne une diminution de la sécrétion de dopamine, qui est responsable de l'apparition des signes cliniques typiques de la MP [52].

Les premiers symptômes se manifestent seulement lorsqu'environ deux tiers des neurones produisant la dopamine sont endommagés ou morts. Jusqu'aujourd'hui, on connaît les effets de la maladie, mais l'origine des causes est encore inconnue.

2. Epidémiologie

Cette maladie existe dans tous les pays et toutes les ethnies [10], mais avec des valeurs très différentes pour la prévalence qui augmente significativement avec l'âge [15]. Les plus basses valeurs de prévalence sont observées dans les pays orientaux et africains, et les plus hautes dans les pays occidentaux [44] (Figure 1).

La maladie touche légèrement plus les hommes que les femmes [3]. Ainsi, si l'incidence de la maladie de Parkinson sur la population entière est estimée entre 8 et 18 pour 100.000 personnes par an, elle est de 17,4 pour 100.000 personnes par an dans une population âgée de 50 à 59 ans, et de 93,1 pour 100.000 personnes par an dans une population âgée de 70 à 79 ans. Bien que certains cas précoces soient détectés, la majorité (plus de 90%) des patients parkinsoniens ont plus de 50 ans [15].

La maladie de parkinson idiopathique (MPI) en est la cause la plus fréquente et représente environs 3/4 des cas, tandis-que la maladie de parkinson familiale représente 1/4 des cas.

Chapitre 1 : Revue bibliographique

La mortalité due à la maladie de parkinson serait de 0.5 à 3.8 % habitants selon les pays. La durée moyenne de la maladie est de 9 à 10 ans avant la Lévodopa (L- dopa), médicament spécifique de la maladie [10].

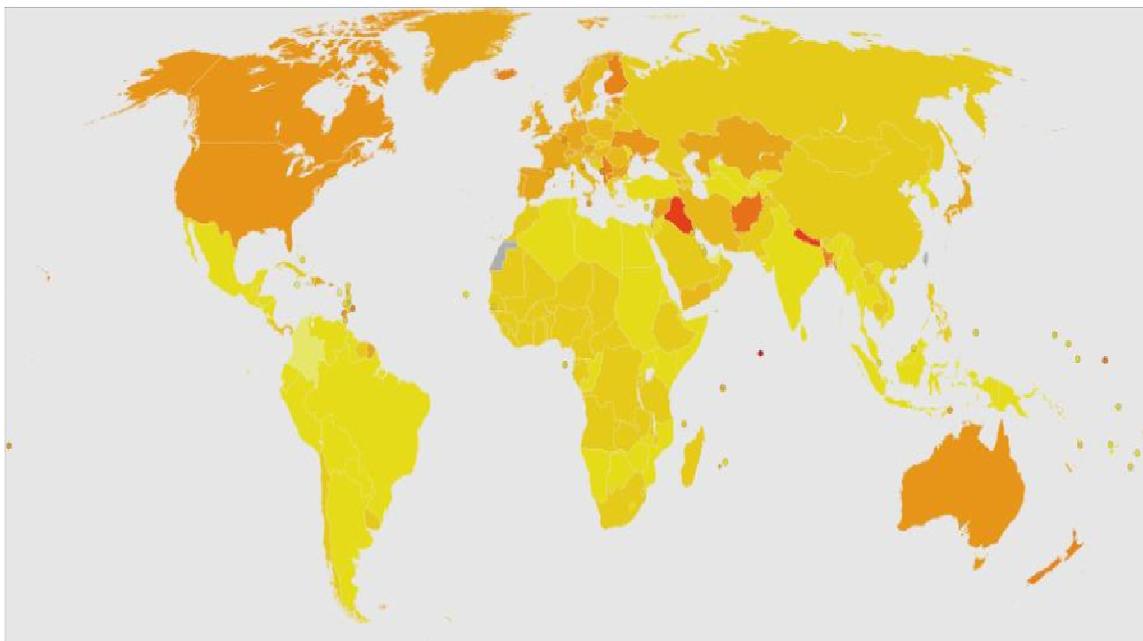


Figure 1 : nombre d'individus affectés par la maladie de Parkinson sur 100 000 habitants en 2004.



3. Physiopathologie

3.1. Circuits neuronaux touchés

La maladie de parkinson est caractérisée par la dégénérescence des neurones dopaminergiques situés, majoritairement, dans la pars compacta de la substance noire [47]. Ces cellules dopaminergiques sont responsables de la production d'un élément chimique appelée dopamine [15]. La dopamine est un neurotransmetteur [15], qui joue un rôle dans l'activation des neurones des noyaux gris centraux et de l'hypothalamus [8]. Les noyaux gris centraux regroupent la substance noire (subdivisée en deux parties : pars compacta [SNc] et pars reticulata [SNr]), le striatum (noyau caudé et putamen), le pallidum (interne [GPi] et externe [GPe]) et le noyau sous-thalamique [NST] ou corps de Lewy (Figure 2). Ces

Chapitre 1 : Revue bibliographique

structures sont reliées entre elles grâce à deux voies: la voie directe et la voie indirecte qui sont contrôlées par la dopamine. L'effet de cette dernière est excitateur sur la voie directe et inhibiteur sur la voie indirecte [16].

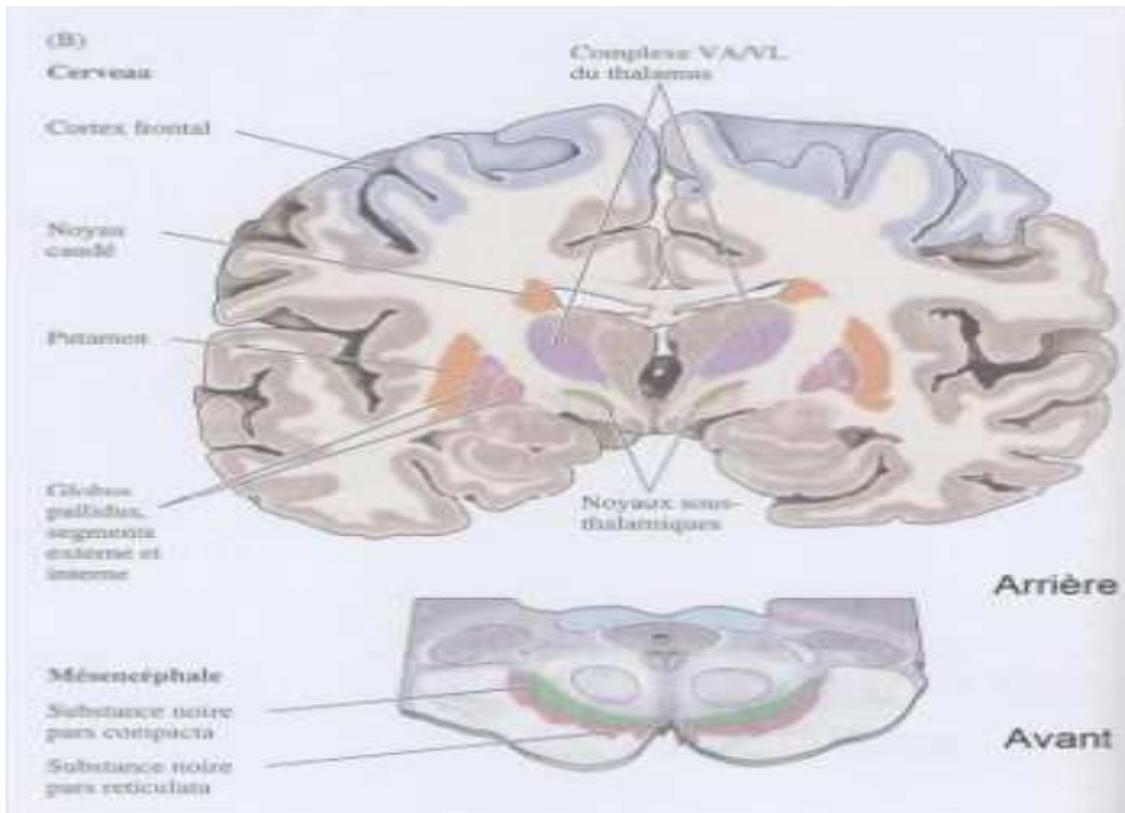


Figure 2 : coupe frontale idéalisée du cerveau ainsi qu'une coupe transversale du mésencéphale.

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 de la voie indirecte et inhibition de la voie directe. 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 c'est-à-dire à un effet hypo-kinétique inhibant le mouvement. Les perturbations de la voie directe, elles, facilitent le mouvement [19].

3.2. Physiopathologie tissulaire : les systèmes neuronaux touchés

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 que des systèmes noradrénergiques, des systèmes cholinergiques et des systèmes sérotoninergiques.

3.3. Physiopathologie moléculaire

A partir de nombreuses données de l'expérimentation préclinique, il est communément admis que plusieurs types de mécanismes pourraient contribuer à la dégénérescence des neurones dopaminergiques mais aucun de ces processus n'est réellement prouvé chez l'homme. Quatre pistes de recherche sont ainsi explorées par de nombreuses équipes conduisant à des hypothèses non exclusives mutuellement sur les processus en cause dans la mort neuronale :

- L'intervention putative des radicaux libres et du stress oxydant ;
- L'hypothèse d'un déficit énergétique cellulaire qui affecterait particulièrement les neurones dopaminergiques et qui impliquerait notamment les organites chargés de la production d'énergie cellulaire, les mitochondries ;
- L'hypothèse du développement d'un processus inflammatoire qui contribuerait à détruire les neurones dopaminergiques ;
- Enfin l'intervention d'un déficit de métabolisme cellulaire plus généralement, qui contribuerait à l'accumulation de protéines dans les neurones dopaminergiques, par exemple l'alpha-synucléine.

Cette dernière hypothèse tient une piste solide d'après un consortium de chercheurs, menés par une équipe du laboratoire d'enzymologie et biochimie structurales du CNRS [34]. La maladie du Parkinson, pour laquelle il n'existe pas de traitement curatif à ce jour, est causée par l'agrégation sous forme de dépôts fibrillaires d'une protéine naturellement abondante à la jonction des neurones, l'alpha-synucléine. Ces agrégats d'alpha-synucléine mal repliée se propagent d'un neurone à l'autre. Lorsqu'ils envahissent un nouveau neurone, ils sont capables de recruter l'alpha-synucléine normale pour l'ajouter au dépôt. C'est pourquoi, pour beaucoup de chercheurs, l'alpha-synucléine des agrégats doit être considérée comme une protéine infectieuse c'est-à-dire un prion. Très toxiques, les dépôts d'alpha-synucléine finissent par déclencher un processus d'apoptose, le suicide cellulaire. Les chercheurs viennent de montrer qu'il n'existe pas qu'un seul type d'agrégat (Figure 3). Ils sont parvenus à produire deux types

Chapitre 1 : Revue bibliographique

d'agrégats qui ne diffèrent que par la façon dont s'empile la protéine. La première forme d'agrégat ressemble, à l'échelle du milliardième de millimètre, à un spaghetti tandis que la deuxième est longue et aplatie, rappelant la forme d'une pâte plus large comme la linguine (Figure 3).

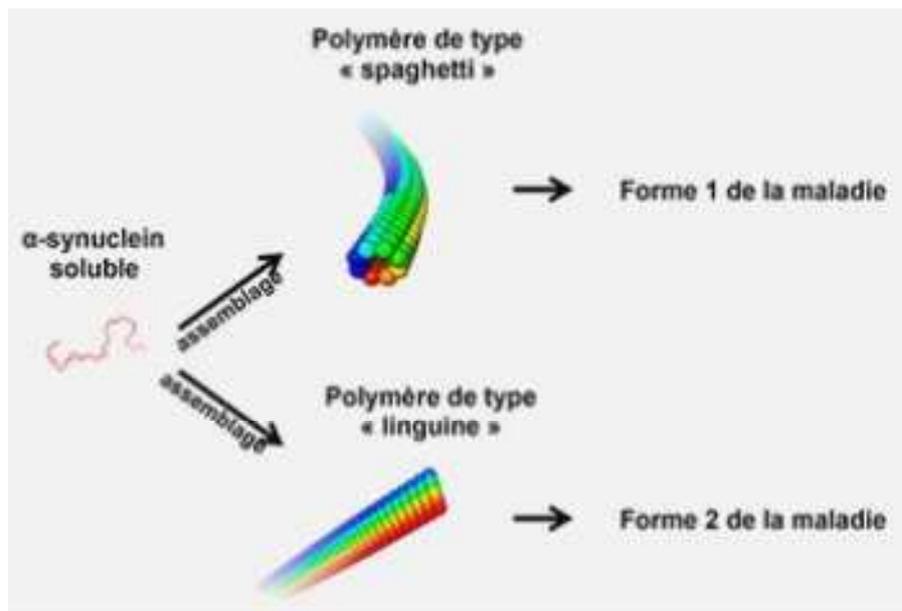


Figure 3 : types d'agrégats de L'alpha-synucléine [34].

Les scientifiques se sont ensuite demandé si ces différences de structure se traduisaient par des différences fonctionnelles. Pour cela, ils ont mis en contact ces deux types d'agrégat avec des cellules neuronales en culture. Ils ont remarqué que la capacité de la forme "spaghetti" à se lier aux cellules et à les pénétrer était notablement supérieure à celle de la forme "linguine". La forme "spaghetti" est aussi nettement plus toxique et tue rapidement les cellules infectées. Cette forme s'est révélée capable de résister aux mécanismes de la cellule chargés de l'éliminer, tandis que la forme "linguine" est, jusqu'à un certain degré, maîtrisée par la cellule [34]. L'existence d'au moins deux formes d'agrégats d'alpha-synucléine explique pourquoi les médecins sont confrontés à des maladies de Parkinson distinctes d'un patient à l'autre. Des travaux sur des souris sont en cours pour vérifier cette hypothèse. Par ailleurs, les scientifiques estiment que l'analyse du type d'agrégat pourrait devenir une méthode efficace de diagnostic, permettant notamment d'évaluer la virulence de la maladie pour chaque patient. Enfin, ils espèrent qu'en affinant la caractérisation de la structure des agrégats, on pourra mettre au point des stratégies thérapeutiques ciblées pour chaque variant afin de ralentir la propagation de l'alpha-synucléine anormale dans le cerveau [34].

Les travaux de toutes les hypothèses débouchent sur la compréhension des mécanismes de la mort neuronale dopaminergique, notamment au regard de l'identification de gènes

Chapitre 1 : Revue bibliographique

« mutés » codant pour certaines de ces protéines, chez les patients par les études génétiques. Ils permettent également d'envisager certaines stratégies thérapeutiques du futur, par exemple dans le domaine de la « neuroprotection », c'est-à-dire dans une démarche de ralentissement et, dans l'idéal de l'arrêt, du processus neurodégénératif. Tel pourrait être par exemple le cas des antioxydants dont l'administration viserait à s'opposer à l'action des radicaux libres.

3.4. Rôle de vieillissement du système dopaminergique

Le vieillissement est une réalité confirmée par la mise en évidence d'une réaction de la dopamine striatale en fonction de l'âge [41]. Elle est estimée à 5% de perte neuronale (par décennie [39]). Son rôle dans la maladie de Parkinson ne peut pas cependant être considéré que comme marginale, ainsi que le suggèrent des études anatomiques [18] montrant une topographie des lésions dopaminergiques (prédominance dans la partie dorsale de la substance noire) très différente de celle observée dans la maladie de Parkinson. Par ailleurs, une étude anatomique suggère que la perte neuronales peut rester très discrète, y compris chez des sujet normaux très âgés [27].

4. Evolution des formes cliniques

Après le diagnostic et l'instauration du traitement antiparkinsonien, on distingue classiquement deux phases : la phase de la « lune de miel » et celle des « complications motrices liées au traitement dopaminergique ».

4.1. La lune de miel

Durant cette période le patient n'est que très peu affecté par les symptômes de la maladie et peut donc mener une vie quasi normale (Stade 1 et 2 de l'échelle de Hoehn et Yahr (Tableau1). Malgré cette amélioration, l'évolution de la pathologie n'est pas figée et la maladie peut s'aggraver au détour de divers événements, tels une infection notamment.

Tableau 1: échelle de Hoehn et Yarh [19].

Stade 0	Pas de signes parkinsoniens.
Stade 1	Signes unilatéraux n entraînant pas de handicap dans la vie quotidienne.
Stade 1,5	Maladie unilatérale avec atteinte axiale.
Stade 2	Signes à prédominance unilatérale entraînant un certain handicap mais sans troubles de l'équilibre
Stade 2,5	Maladie bilatérale légère avec rétablissement lors du test de poussée.
Stade 3.	Atteinte bilatérale avec une certaine instabilité posturale, malade autonome
Stade 4	Handicap sévère mais possibilité de marche, perte partielle de l'autonomie.
Stade 5	Malade en chaise roulante ou alité, perte complète d'autonomie.

4.2. Etape des complications motrices liées au traitement

Elle est caractérisée par le développement des fluctuations de symptômes moteurs, des mouvements involontaires et des fluctuations non motrices. A ce stade, le handicap varie d'un patient à l'autre avec un retentissement variable sur la vie sociale, professionnelle et familiale du patient. Leur état varie brutalement et peuvent au cours d'une même journée, passer d'un stade 2 ou 3 de la classification de Hoehn et Yahr, à un stade 4 ou 5.

5. Étiologie (Facteurs de risques)

Les études étiologiques concernant la maladie de Parkinson révèlent deux facettes. D'une part, on retrouve des facteurs non génétiques, et d'autre part, il y a des facteurs génétiques à la base de cette maladie. Il est probable que ce soit l'interaction de ces deux facteurs qui mènent au développement de la MP. Toutefois, les recherches dans ce sens n'ont pas encore apporté de preuve permettant d'affirmer cette hypothèse.

5.1. Facteur de risque non génétique

5.1.1. Facteurs environnementaux

La découverte, en 1983, de personnes présentant des signes de la maladie de Parkinson après avoir reçu des injections de médicaments contaminés par la 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) [15]. Ce dernier n'est pas directement l'agent responsable des dégâts neuronaux. C'est son métabolite, l'ion 1-méthyl-4-phenylpyrimidium (MPP^+), issu de la biotoxification du MPTP par la MAO-B (monoamine oxydase B), qui est responsable d'un blocage du complexe I de la chaîne respiratoire des mitochondries (Figure 4). A la suite de ces observations, des publications faisant état de syndromes parkinsoniens après expositions plus ou moins prolongées à des dérivés du MPTP ou d'insecticides organophosphorés [19].

D'autres produits toxiques sont aussi suspectés de jouer un rôle dans la genèse de la maladie de Parkinson, comme les isoquinoléines et leurs dérivés. C'est un groupe de neurotoxines homologues de la MPTP qui sont elles aussi substrats de la MAO. La famille comporte de nombreux dérivés, mais les tétrahydroisoquinoléines (TIQs) et dihydroisoquinoléines inhibent plus le complexe I de la chaîne respiratoire que le MPP^+ . Deux études montrent le rôle probable des isoquinoléines dans les formes touchant les plus de 50 ans, avec l'implication d'une toxicité dose/effet dépendant ou de l'interaction de facteurs génétique. Les dosages de TIQs montrent qu'ils sont largement présents dans le SNC [19].

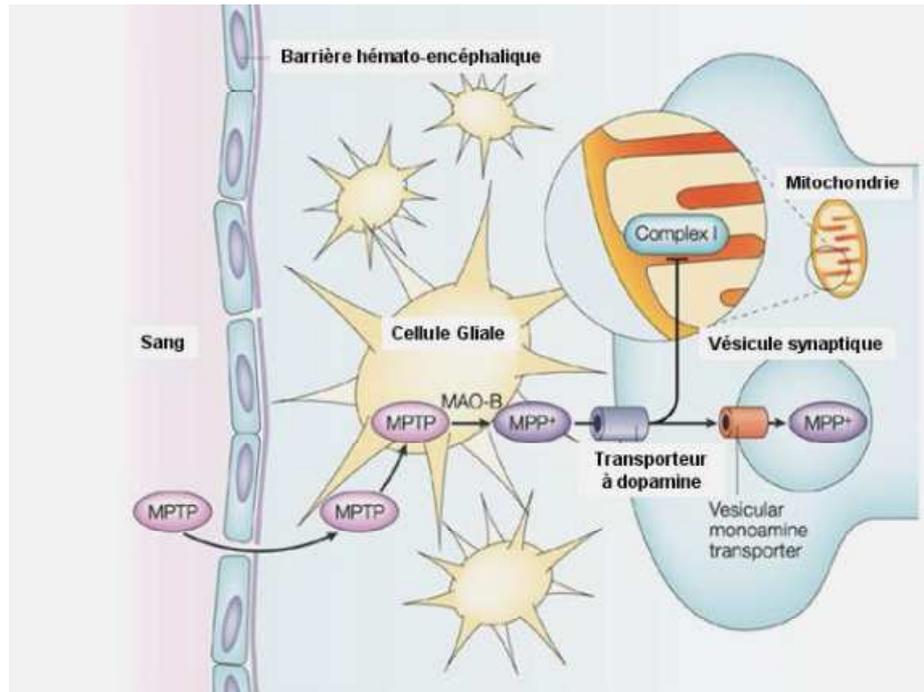


Figure 4: devenir du MPTP dans la cellule [15].

5.1.2. Le tabac

Beaucoup d'études épidémiologiques ont montré une réduction des proportions de parkinsoniens au sein des fumeurs de cigarettes. Ces études ont calculé un risque relatif de développer la maladie de Parkinson de 0,59 pour les personnes ayant arrêté de fumer, et de 0,39 pour les fumeurs [15], [25].

Plusieurs mécanismes ont été imaginés pour expliquer l'effet neuroprotectif possible de la cigarette. Les explications les plus plausibles suggèrent que la nicotine agisse comme stimulateur pour la libération de la dopamine [15], responsable de la diminution de production de radicaux libres [19] et qu'elle ait un pouvoir antioxydant du monoxyde de carbone dans le système nerveux [15].

5.1.3. Les autres facteurs de risque non génétique

L'utilisation d'anti-inflammatoires stéroïdaux pourrait avoir un effet sur la maladie de Parkinson en diminuant les risques selon quelques études. Ce serait dû à un rôle neuroprotectif de ces médicaments. Par ailleurs, l'influence de l'inflammation, elle-même, est encore inconnue. Mais des indices d'une réponse immunitaire sont retrouvés dans les cerveaux de patients parkinsoniens. Ils ignorent si cette inflammation est une cause ou une conséquence de la maladie de Parkinson.

Chapitre 1 : Revue bibliographique

Le rôle joué par les œstrogènes est encore sujet à de grands débats. Ils ont constaté une prévalence et une incidence moins élevée chez les femmes dans certaines études. Ils ont hypothétisé que les hormones féminines pourraient protéger contre la mort des cellules neuronales. Des tests animaux ont apporté la preuve d'un effet bénéfique des œstrogènes par rapport à la maladie de Parkinson, probablement via leurs propriétés antioxydantes [15].

5.2. Facteurs de risque génétiques

Les facteurs génétiques qui provoquent la maladie de Parkinson ne sont pas les principaux acteurs de cette pathologie. Ainsi, la forme familiale de la maladie représente 10% des cas selon les estimations. En outre, ce que l'on constate c'est que cette forme familiale a des caractéristiques qui divergent quelque peu de la forme sporadique. Ainsi, on observe un effet significatif des facteurs génétiques dans les cas précoces de la maladie de Parkinson (apparition avant 50 ans).

L'identification des gènes qui seraient associés à la pathologie porte sur la détermination de ceux qui sont impliqués dans le métabolisme de la dopamine, dans le mécanisme mitochondrial, dans la détoxification, dans d'autres maladies neurodégénératives, ou dans la forme familiale de la maladie de Parkinson. Certains gènes ont été caractérisés ; lesquels, lorsqu'ils sont mutés, produisent des protéines qui augmentent le risque de la maladie de Parkinson (Tableau 2) [44].

- *α synucléine (SNCA)*

La triplification [43], puis la duplication [9] de la région chromosomique contenant le gène SNCA ont été identifiées dans des formes familiales. Certains polymorphismes modulant l'expression de ce gène sont associés à une augmentation du risque de développer la MP [35]. L' α – synucléine est le composant majeur des corps de Lewy [44], elle est présente sous forme d'agrégats intra-cytoplasmiques dans les régions qui sont les premières touchées (bulbe olfactif, locus coeruleus) ainsi que dans les zones corticales touchées aux stades les plus tardifs. Son accumulation lors du vieillissement est parallèle à la perte des neurones dopaminergiques.

Les fonctions de la protéine non mutée sont imparfaitement connues. Mais, de localisation pré-synaptique et nucléaire, elle joue un rôle dans la production de dopamine. L'expression de l' α - synucléine mutée est sélectivement toxique pour les neurones dopaminergiques.

La mutation E46K entraînant la modification structurelle et fonctionnelle la plus importante est responsable des symptômes cliniques les plus sévères [30], la surexpression de l' α - synucléine normale interviendrait de la même façon. L'effet toxique de cette surexpression

Chapitre 1 : Revue bibliographique

dans les neurones dopaminergique ferait intervenir la libération excessive de dopamine dont l'oxydation produirait massivement des radicaux libres, il y aurait des activations du stress oxydant et des voies cellulaires menant à l'apoptose [9]. Inflammation et α -synucléine interviendraient en synergie dans les mécanismes de la mort neuronale [31]. L'accumulation de l' α -synucléine en bloquant le transport des vésicules du réticulum endoplasmique vers l'appareil de golgi provoquerait une accumulation des protéines dans le réticulum endoplasmique responsable d'un stress [34].

Tableau 2 : Mutation de différentes protéines impliquées dans la maladie de parkinson [45].

	Mutation	Âge de début
<i>SNCA</i>	Missense: Ala30Pro, Glu46Lys, His50Gln, Gly51Asp, Ala53Thr	60 ans 30 à 80
<i>SNCA</i>	Locus duplication (and triplication)	31–71 years (24– 8)
<i>LRRK2</i>	Missense: Asn1437His, Arg1441Cys/Gly/His, Tyr1699Cys, Gly2019Ser, Ile2020Thr Common polymorphisms: Ala419Val, Arg1628Pro, Gly2385Arg (Asia) Protective haplotype: Asn551Lys– Arg1398His– Lys1423Lys	60 years (32–79)
<i>VPS35</i>	Missense: Asp620Asn	53 years (40– 68)
<i>PARK2</i>	Numerous missense, exon deletion and duplication mutations	<45 years (12–58)
<i>PINK1</i>	Missense: Gln129X, <i>SNCA</i> Gln129fsX157, Pro196Leu, Gly309Asp Trp437X, Gly440Glu, Gln456X Rare: locus and exon deletion	Typically <45 years (18–56)
<i>DJ-1</i>	Missense: Glu163Lys, Leu166Pro Exon 1–5 deletion, g.168–185dup	<40 years (24 39)
<i>ATP13A2</i>)Missense: Phe182Leu, Gly504Arg, Gly877Arg, 1019GfsX1021 Exon 13 1306+5G>A Exon 16 22-bp deletion	<20 years (10–33)

La plupart des études concernant l'exposition à des facteurs environnementaux ou la possible intervention de facteurs endogènes ou exogènes suggèrent fortement une interaction génétique-environnement. L'hypothèse de base d'une telle interaction repose sur la notion de polymorphisme des gènes de certains enzymes intervenant dans le métabolisme de substances

Chapitre 1 : Revue bibliographique

environnementales potentiellement toxique. [8], [13]. Pour conclure, l'étiologie de la MP, s'avère complexe et fait encore actuellement, l'objet de nombreuses recherches.

II. La Salive

1. Définition

La salive est la première sécrétion digestive. Elle résulte de l'ensemble des sécrétions séreuses et muqueuses émises par les glandes salivaires [51] Cette sécrétion présente un aspect liquidien, incolore, insipide et filant [55], il existe plusieurs types de salives comme la salive parotidienne, salive sous maxillaire, salive sublinguale et bucco-labiale, mais encore une salive mixte constituée d'un mélange des premières dans la cavité buccale [20]

2. Composition biochimique de la salive :

La salive est un mélange complexe de sécrétions produites par les glandes salivaires, de résidus alimentaires, de fluide gingival, de cellules épithéliales et de nombreux électrolytes d'origine plasmatique. Elle est constituée à 99,5% d'eau et contient 0,5% de substances dissoutes réparties en constituants organiques et inorganiques [33]

2.1. Constituants inorganique de la salive :

La salive contient des constituants ioniques (Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^-) dont la composition varie pendant la sécrétion (Tableau 3). Certains de ces ions permettent de réguler le pH du milieu buccal et qui ont une action bactériostatique.

Tableau 3: concentration ionique de la salive en mEq/L.

	Plasma	Salive primaire	Salive finale (repos)	Salive finale (débit élevé)
Na^+	145	160	1,5	50
Cl^-	120	120	22	40
K^+	4	15	25	20
HCO_3^-	24		1	40

2.2. Constituants organiques de la salive

Des constituants tels que glucose, urée, acide urique et cholestérol sont également présents dans la salive. La plupart des hormones périphériques sont également présentes à des teneurs équivalentes aux taux circulants (cortisol, hormones sexuelles, phéromones).

Il y a environ 2.5 g/l de protéines dans la salive émise à faible débit. La concentration en protéines croît en général avec le débit salivaire. Ces protéines sont classées, en fonction de leur origine, en protéines extrinsèques (provenant du sérum) et protéines intrinsèques synthétisées par les glandes elle-même. [49]

- **Protéines extrinsèques**

Leur concentration, environ 20% des protéines totales, décroît lorsque le débit salivaire augmente. Elles sont représentées par des glycoprotéines acides, de l'albumine sérique, des immunoglobulines de type IgA, IgG et IgM, des bêta lipoprotéines, des alpha et bêta-globulines et de la lactoferrine.

L'IgA est la principale immunoglobuline de la salive ; son taux est de 5 à 12 fois plus élevé que le taux d'IgA sérique. Pour certains auteurs, le taux salivaire d'IgA diminue chez les sujets ayant un indice de caries élevé [26] mettent en évidence une nette augmentation des IgA dans les formes inflammatoires des parodontites. Les IgG et IgM apparaissent dans la salive dans des conditions pathologiques comme le syndrome de Gougerot-Sjörger. Leur haute concentration est retrouvée chez les personnes ayant un déficit en IgA et vient certainement du fluide gingival.

- **protéines intrinsèques**

Ce sont les protéines synthétisées par les glandes salivaires et déversées dans la salive. Le protéome salivaire comprend plus de 700 protéines. Elles sont classées en plusieurs familles. Leur dénomination ne répond pas à des critères bien définis mais repose selon leurs caractéristiques fonctionnelles (ex : enzymes), leur composition en acides aminés (proline, cystatine) ou autre [48, 32, 12].

Les principales protéines intrinsèques sont l' α -amylase salivaire, le lysozyme, les mucines, la rénine et la lipase linguale. Il existe autres protéines assurant différentes fonctions parmi lesquelles on peut citer : la kallikréine, protéine riches en proline, cystatine, statherine, gustine, histatine et phosphatases...etc

3. Caractéristiques physicochimiques de la salive

3.1. La viscosité

C'est la résistance d'un fluide à l'écoulement. Elle est fonction de la teneur en mucopolysaccharides dont la synthèse varie selon le type de glande. Ces viscosités sont de: 1,5 poise pour les glandes parotides ; 3,4 poises pour les glandes submandibulaires et 13,4 poises pour les glandes sublinguales [32]. La viscosité (de même que la densité) varie de manière inverse au débit.

3.2. Le pH

Il exprime l'acidité ou l'alcalinité de la salive et varie en fonction de l'âge, du lieu de prélèvement buccal et de l'alimentation. Le pH physiologique d'un individu varie dans une gamme normale comprise entre 5.6 et 7 avec une valeur moyenne d'environ 6.7 [6].

3.3. Le pouvoir tampon

L'efficacité du pouvoir tampon varie en fonction [53] du débit salivaire, moins il y a de salive, moins le pouvoir tampon est performant ; de la fréquence des attaques acides ; de l'épaisseur de la plaque bactérienne, car une mauvaise hygiène dentaire entraîne une prolifération bactérienne qui ne permet pas la diffusion de la salive à travers l'épaisseur de la plaque.

3.4. Le débit salivaire

Le rythme et le débit de la sécrétion salivaire varient tout au long de la journée [53]. Il montre des variations nyctémérales (minimum à 3h00, maximum entre 12h00 et 22h00) [50]. Pendant la période de sommeil le débit salivaire est très diminué [53] et très abondant au cours des repas [52]. Au moment de la prise de nourriture, la salive présente en moyenne 2 litres par jour [29].

4. Le rôle de la salive

La salive est le principal système de défense contre les facteurs de virulence des bactéries cariogènes. Toutes les fonctions salivaires sont impliquées dans le maintien de la santé orale et dentaire.

4.1. Protection de l'épithélium

Chapitre 1 : Revue bibliographique

La salive est un fluide ; qui protège donc les muqueuses contre la déshydratation, grâce aux mucines en particulier. En raison de leur forte teneur en glucides (> 80%), leurs grandes dimensions (> 1 micron), ainsi que leur forme, la sécrétion classique de mucines à de faibles concentrations forme des gels viscoélastiques hydrophiles qui lubrifient l'épithélium. Ces gels assurent la protection de l'épithélium sous-jacent contre les dommages mécaniques, et permet un nettoyage mécanique des surfaces dentaires et espaces interdentaires en chassant les particules alimentaires. L'EGF salivaire quant à lui, renforce le potentiel de cicatrisation des tissus muqueux. Le système IGF joue un rôle important dans la croissance et le développement de la langue [48,4, 2, 32].

4.2. Fonction digestive

Les enzymes salivaires participent au premier stade de la digestion. L'action de l'amylase est optimale à pH 7. Elle débute la digestion des polysides de l'alimentation. La salive a également une fonction mécanique qui nous permet de goûter, de mastiquer et déglutir les aliments solides. Elle agit comme un solvant et un lubrifiant dont les qualités physiques sont améliorées par la présence de mucine [1].

4.3. Fonction de protection

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. Le flux salivaire est un facteur important à évaluer, car de lui dépendent tous les autres facteurs salivaires qui participent à la protection des tissus buccaux. Il existe d'ailleurs une corrélation entre le nombre de caries dentaires et le flux salivaire.

4.4. Fonction de cicatrisation

La salive contient des facteurs de croissance qui interviennent dans la cicatrisation des tissus. On trouve notamment EGF.

III. Les biomarqueurs

1. Définition

Le biomarqueur est une caractéristique biologique mesurée de façon objective et évaluée comme un indicateur soit de processus biologiques normaux ou pathologiques, soit de réponses pharmacologiques résultant d'une intervention thérapeutique [26]. Ils représentent aujourd'hui un domaine vaste puisqu'ils se présentent sous différentes formes physiques et

Chapitre 1 : Revue bibliographique

biologiques et couvrent différents domaines d'application aussi bien au cours du développement pharmaceutique que dans la médecine clinique.

2. Biomarqueurs sanguine et urinaire de la maladie de parkinson

2.1. α -synucléine

Le dosage de l' α -synucléine sérique ou sanguine dans la MP est justifié par le fait qu'une faible quantité d' α -synucléine est physiologiquement présente dans le plasma et les plaquettes. S'il n'existe aucune différence quantitative, une étude récente montre que la présence d'oligomères solubles de l' α -synucléine discrimine faiblement les parkinsoniens des témoins, 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 les neurones [31], [45].

2.2. Autres marqueurs

Parallèlement aux études sur le sérum et le sang total, des marqueurs de stress oxydatif ont été évalués dans la MP. Toutes les études vont dans le sens d'une majoration du stress oxydatif, avec une augmentation majeure (triple) de la 8-OHdG, des lipoprotéines oxydées une diminution de l' α -tocophérol antioxydant, et augmentation du ratio coenzyme Q-10 oxydé /total. Comme dans le sang, des variations de la protéine mitochondriale antioxydante DJ1 semblent corrélées à la progression de la maladie. Cependant, la spécialité de ces marqueurs de stress pour la MP est remise en cause par leur élévation conjointe dans d'autres maladies dégénératives [31], [45].

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET
MÉTHODES

1. **Matériel**

1.1 **Recrutement des patients**

Notre étude a porté sur une population composée de 47 patients provenant du service de neurologie du CHU de Constantine atteints de la maladie du Parkinson certaine, déterminée par les symptômes cliniques et les tests de dépistage. Parmi les 47 malades, 19 femmes, âgées de 43 à 74 ans et 28 hommes, âgés de 42 à 74 ans ont été recensés et dont la pathologie est aux stades différents (1,1.5, 2, 2.5, 3 et 4). Les patients ne présentant pas une bonne hygiène buccale ont été exclus de l'étude. Cette population a été comparée à deux sujets sains sans pathologie connue et possédant une bonne hygiène buccale.

1.2. **Recueil de la salive**

Pour le recueil de la salive nous avons adopté la méthode décrite par [24]. 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 Falcon 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).

2. **Méthodes**

2.1 **Extraction des protéines salivaires**

L'extraction des protéines a été réalisée à partir de la salive des patients parkinsoniens et des sujets sains, obtenue après centrifugation de la salive totale.

2.1.1 **Dans des conditions dénaturantes et réductrices**

100µl de salive des patients malades et des sujets sains sont mélangés avec 100 µl de solution d'extraction contenant 35 % (v/v) de glycérol, 22 % (v/v) de Tris/HCl 1M pH 6.8, 43 % (v/v) d'eau distillée, 7 % (p/v) de SDS et quelques grains de bleu de bromophénol. 2.5% (v/v) de β-mercaptoethanol sont rajoutés au mélange pour réduire les protéines salivaires. Après agitation pendant 1 heure à température ambiante, les mélanges sont incubés à 65°C pendant 30 minutes puis centrifugés à 10000 t/min pendant 1 minute. Les surnageants contenant les protéines salivaires dissociées et réduites sont récupérés.

2.1.2 Dans des conditions dénaturantes et non réductrices

100µl de la salive des patients malades et des sujets sains sont repris dans 100 µl de la solution d'extraction précédemment décrite sans ajout du réducteur, le β-mercaptoethanol. Après agitation pendant 1 heure à température ambiante, les mélanges sont centrifugés à 10000 t/min pendant 1 minute. Les surnageants contenant les protéines salivaires dissociées mais non réduites sont récupérés.

2.2 Electrophorèse monodimensionnelle en gel de polyacrylamide

Aux différentes étapes d'extraction, la composition protéique des différentes conditions est caractérisée par migration électrophorétique en gel de polyacrylamide de 1.5 mm d'épaisseur en conditions dénaturantes (présence de SDS), avec un système vertical. L'électrophorèse est réalisée suivant la méthode de Laemmli U.K. 1970 [28] modifiée par Sing N.K *et al.* 1991 [42]. Le gel de séparation contient 12.56% de polyacrylamide et le gel d'alignement 2.88%. Les marqueurs de masse moléculaire utilisés couvrent une gamme variant de 10 KDa à 250 KDa. Les échantillons sont déposés à raison de 50 µl 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 de l'eau de robinet.

2.3. Lecture des électrophoregrammes

La lecture des diagrammes consiste à relever la mobilité de chacune des bandes présentes en mesurant la distance parcourue par chaque bande dans le gel de séparation. Afin de déterminer le poids moléculaire de chaque protéine, un marqueur de taille a été utilisé.

2.4. Analyse statistique

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

CHAPITRE 3

RÉSULTATS ET
DISCUSSION

I. Fractionnement des protéines et recherche de biomarqueurs

1. Analyse des profils électrophorétiques

La technique utilisée pour le fractionnement des protéines salivaires est l'électrophorèse monodimensionnelle. C'est une technique qui permet d'obtenir l'ensemble des protéines. La lecture des diagrammes nous permet de révéler la mobilité de chacune de ces bandes protéiques réparties dans les deux zones des protéines de haut et de faible poids moléculaire (HPM et FPM), en mesurant la distance parcourue par chaque protéine dans le gel de séparation.

1.1. Analyse des protéines salivaires fractionnées par SDS-PAGE dans les conditions dénaturantes et réductrices

L'analyse des profils électrophorétiques des protéines salivaires, révèle une variabilité dans la composition protéique des témoins et des patients [54] et même entre les patients eux-mêmes.

Cette analyse permet de distinguer 40 bandes protéiques avec des mobilités variantes entre 10 et 135 mm, ces protéines sont caractérisées par des gammes de masse moléculaire approximatives de 250 à 50 KDa pour les protéines de HPM et de 50 à 10 KDa pour les protéines de FPM.

En effet les différences résident dans les deux zones des protéines salivaires contenant les bandes B8, B13, B14, B15, B18, B20, B21, B22, B25, B26, B27, B28, B37, B40 qui sont les plus variables qualitativement et quantitativement. La variation de quelques-unes de ces dernières est représentée dans le tableau 4.

Tableau 4 : variation des bandes protéiques B15, B26, 37, B40

	B15/intensité	B26/intensité	B37/intensité	B40/intensité
Témoin	P (++)	P (Trace)	A (0)	P (+)
E 3	P (++++)	P (++)	P (+)	P (++)
E 31	A(0)	P (Trace)	P (Trace)	P (+)
E 36	P (+++)	A (0)	A (0)	P (Trace)
E 38	P (+)	A (0)	A (0)	P (+)
E 43	P (++)	A (0)	A (0)	P (++)

D'abord, la comparaison entre les échantillons des sujets sains et des malades montre que les bandes B8, B13 sont présentes chez les deux témoins ainsi que chez les patients 6, 7, 18, 23, 33 pour la bande B8 (Figure 5) et 27, 30 pour la bande B13 (Figure 5).

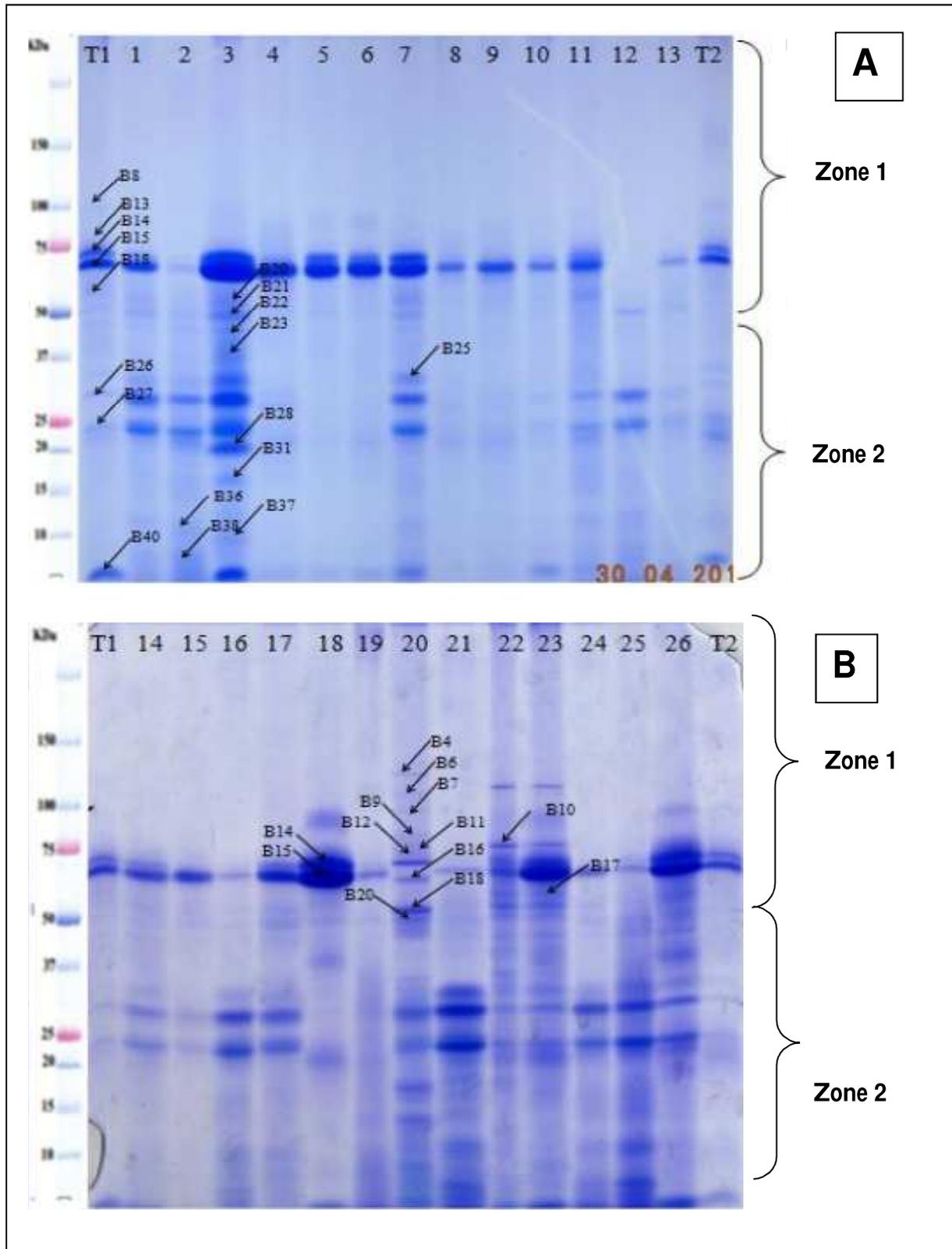


Figure 5 : profils électrophorétiques des protéines salivaires dans les conditions dénaturantes et réductrice révélées par SDS/PAGE. A : T1, T2 : témoins. 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 : patients malades. B : T1, T2: témoins. 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 : patients malades.

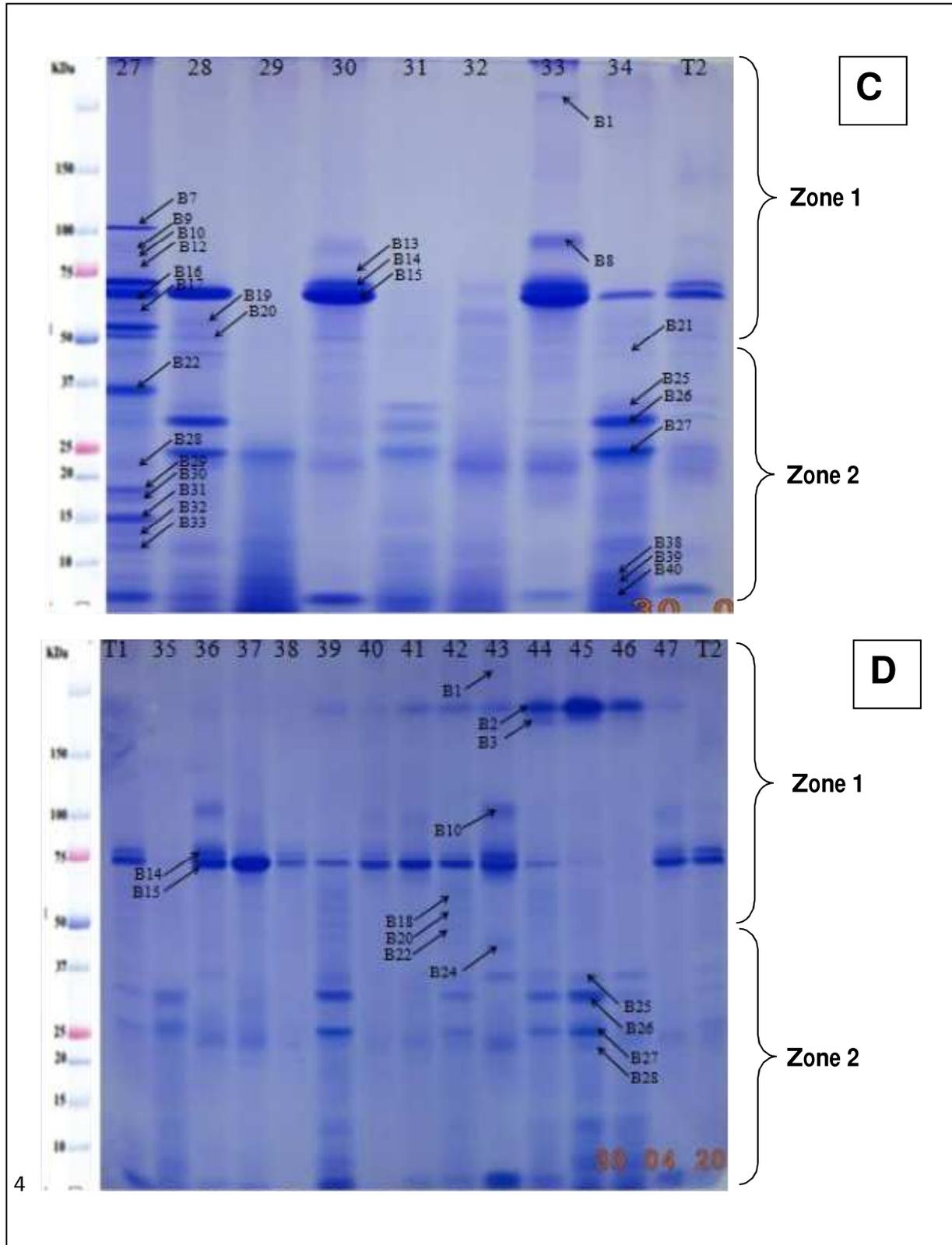


Figure 6 : profils électrophorétiques des protéines salivaires dans des conditions dénaturantes et réductrice révélées par SDS/PAGE. C : T2 : témoin. 27, 28 ; 29, 30, 31, 32, 33, 34 : patients malades. D : T1, T2 : témoins. 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 : patients malades.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Pour les bandes B18, B20, B21, B22, B25 sous forme de traces chez les sujets sains et chez quelques patients sont présentes avec des intensités plus élevées ou elles sont absentes chez les autres patients. Par exemples : la bande B18 se trouve chez les deux témoins ainsi que chez les échantillons 17, 39, 42, 44 sous forme de trace, avec une intensité élevée chez les patients 22, 23, 20 et 26 et elle est introuvable chez les autres malades (Figure 5).

Donc les bandes B8, B13, B14, B15, B18, B20, B21, B22, B25, B26, B27, B28, B37, B40 varient qualitativement et quantitativement ce qui leur confèrent la propriété de biomarqueurs qualitatifs et quantitatifs.

En revanche, les bandes B14, B15, B26, B27, B40 existent chez quelques patients mais avec des concentrations différentes. A titre d'exemple : l'intensité de la bande B15 est forte chez les patients 3, 18, 23, 26, 27, 33, 28, 30 et 37 tandis que chez 4, 5, 6, 7, 17 et 36 est moins concentrée, cependant son intensité est faible chez les patient 8, 9 et 22 et elle est à l'état de trace chez les patients 2, 10, 13, 16, 19, 21, 25, 32, 35, 38, 39 et 44. En outre cette bande existe bien chez les patients 1, 11, 14, 15, 17, 34, 40, 41, 42, 43 et 47 avec une intensité moyenne. Le même cas pour les autres bandes mentionnées ci-dessus (Figures 5, 6).

Donc les bandes B14, B15, B26, B27 et B 40 varient quantitativement ce qui leur confère (Figures 5, 6). la propriété d'un biomarqueur quantitatif.

Ensuite, la comparaison entre les profils électrophorétiques des patients démontre des changements au niveau des bandes B1, B2, B3, B10, B17, B23, B18, B30, B31, B33, B36, B37, B38, B39 qui sont rarement présentes chez les patients avec une intensité variable. À titre d'exemple : la bande B1 est présente uniquement chez les deux patients 33 et 44 avec une intensité faible

La bande B2 est présente avec une intensité forte chez les patients 44, 45 et 46, chez les malades 41, 42 et 43 avec intensité moins importante alors qu'elle existe sous forme de trace chez les patients 39, 40 et 47. Elle est absente chez les témoins de même que chez les autres patients. La bande B3 est présente juste chez les malades 44, 45 et 46 avec une intensité moyenne. (Figure 6). La présence de la bande B37 implique 18 échantillons parmi les 49, caractérisée par des concentrations moyennes chez les patients 21, 25 et faibles chez 3, 7, 17, 22, 24, 26, 35, 27, 29, 31 et 39 (Figures 5, 6).

Donc les bandes B2, B3, B10, B17, B23, B18, B30, B31, B33, B36, B37, B38 et B39 varient qualitativement ce qui leur confère la propriété de biomarqueurs qualitatifs.

Ainsi, ces différences observées entre les profils électrophorétiques 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.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

En outre, nous devons signaler des cas particuliers, ceux des patients 20 et 27 qui présentent des profils électrophorétiques complètement différents (Figures 5, 6). En effet ces profils sont marqués par la présence des bandes protéiques B4, B6 et B11 pour l'échantillon 20 et les bandes B9, B12, B16 pour les deux échantillons et qu'on ne retrouve pas chez les autres patients. Sur le plan clinique ces deux hommes avec une moyenne d'âge de 60 présentent une maladie de parkinson idiopathique (MPI), stade 2, remontant à 3ans auparavant et n'ont pas d'antécédents pathologiques, mais ces deux patients sont de deux régions différentes, ce qui peut justifier la différence de leur profil électrophorétique.

1.2. Analyse des protéines salivaires fractionnées par SDS-PAGE dans des conditions dénaturantes et non réductrices

L'analyse de la composition protéique de la salive des témoins et celles des sujets malades, démontre une variabilité au niveau des deux zones. Cette analyse permet de montrer 41 bandes protéiques de haut et de faible poids moléculaire caractérisées par des gammes de masse moléculaire approximative de 250 à 50 KDa pour les protéines de haut poids moléculaire et de 50 à 10 KDa pour les protéines de faible poids moléculaire.

Les bandes « B7, B8, B9, B11, B13, B16, B20, B21, B31, B32, B33, B35, B38, B39, B41 » sont les plus variables quantitativement et qualitativement. La variation de quelques-unes de ces dernières est représentée dans le tableau 5.

Tableau 5 : variation des bandes protéiques B10, B19, B34, B40.

	B10/intensité	B19/intensité	B34/intensité	B40/intensité
Témoin	P (++)	P (+)	P (++)	P (trace)
E 6	P (++)	P (+)	A (0)	A (0)
E 30	A(0)	A(0)	P (trace)	P (trace)
E 34	A (0)	P (+)	P (trace)	A (0)
E 40	A (0)	P (+)	A (0)	A (0)
E 23	A (0)	A (0)	P (+)	P (trace)

Premièrement la comparaison entre les échantillons des témoins et des patients montre que les bandes B20 et B41 sont présentes chez les deux témoins et chez tous les patients avec des intensités variables. Pour la bande B20, elle est de faible intensité chez les patients : 3, 9, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 22, 26 et 29 et sous forme de trace chez les patients 18, 5, 6, 8, 11, 30,

Chapitre 3 : Résultats et discussion

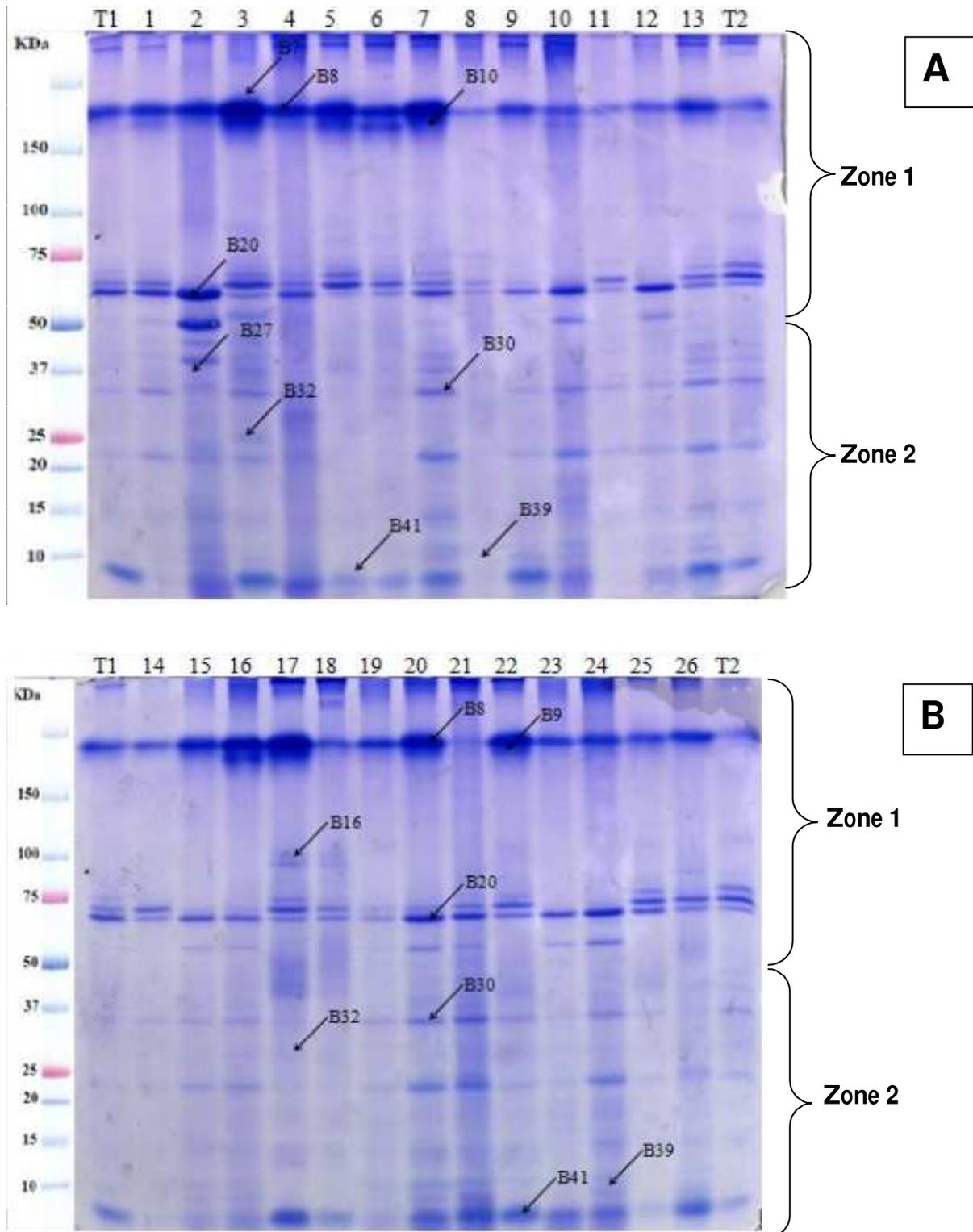


Figure 7 : profils électrophorétiques des protéines salivaires dans des conditions dénaturantes et non réductrice révélées par SDS/PAGE. A : T1, T2 : témoins. 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 : patients malades. B : T1, T2: témoins. 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 : patients malades.

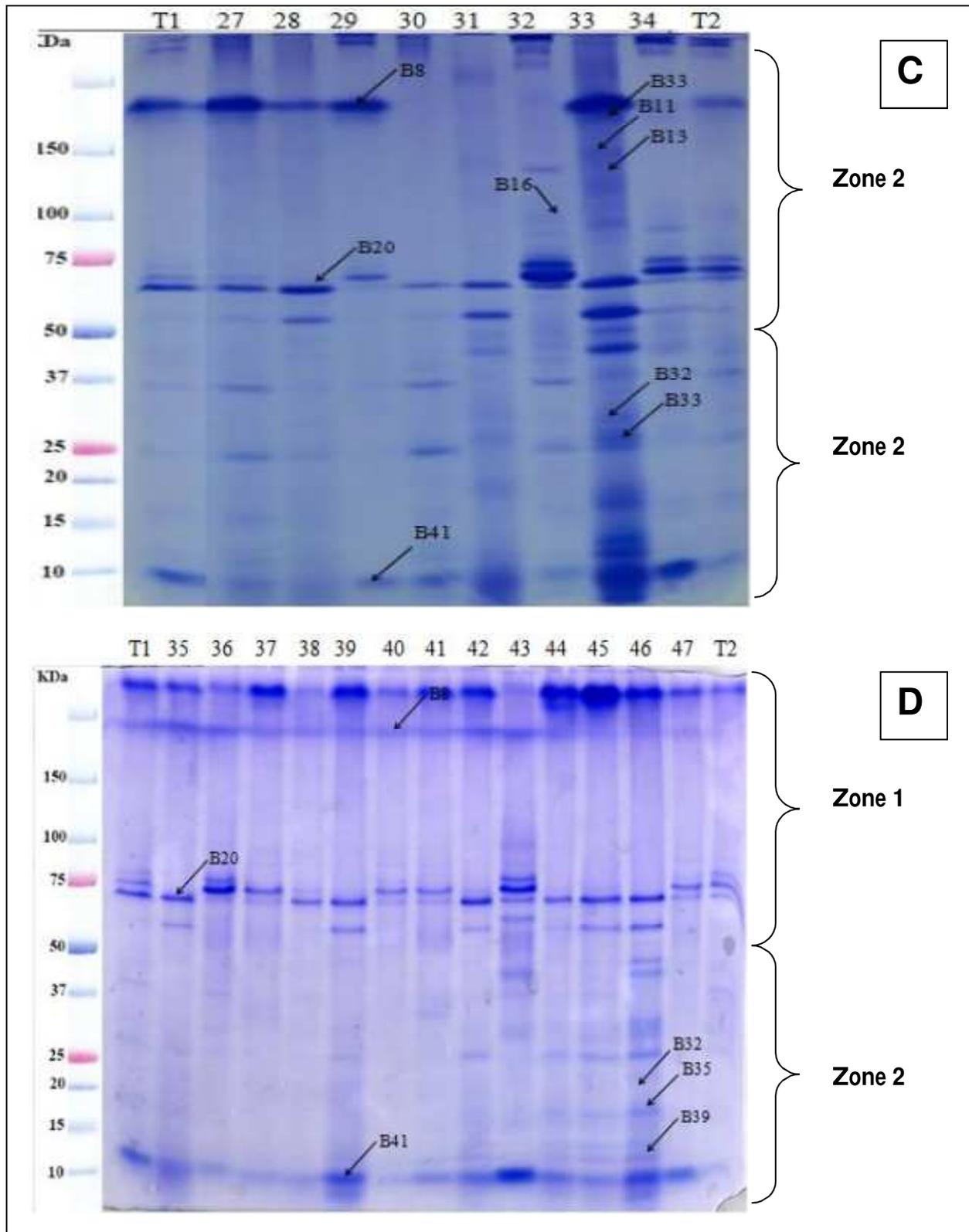


Figure 8 : profils électrophorétiques des protéines salivaires dans des conditions dénaturantes et non réductrice révélées par SDS/PAGE. A : T1, T2 : témoins. 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34: patients malades. B : T1, T2: témoins. 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 : patients malades.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

31, 28, 33 (Figures 7, 8). Pour la bande B41, elle est présente avec une intensité moyenne chez les échantillons 29, 30, 31, 4, 5, 6, 7 et sous forme de trace chez les patients 8, 11, 12, 27, 28, 32 et T2 (Figures 7, 8).

Par la suite, les bandes B7, B16, B21, B31, B32, B33, B35, B38, B39 existent que chez quelques patients et avec de concentrations différentes (Figures 7, 8). Exemple :

La bande B39 est présente avec une intensité moyenne chez les patients, 2, 21, 24, 45, 46, 39, et à l'état de trace chez les échantillons 7, 8, 15, 16, 19, 20, 44, 42, 35.

La bande B32 présente chez les patients 3, 45, 46 avec une intensité moyenne et à l'état de trace chez les patients 17, 18, 21, 22, 23, 24, 43 (Figure 7).

Donc les bandes B7, B11, B13, B16, B21, B32, B35, B38, B39 varient quantitativement et qualitativement ce qui leur confèrent la propriété d'un biomarqueur qualitatif et quantitatif.

Ensuite la comparaison entre les profils électrophorétiques des patients démontre le changement au niveau des bandes B9, B14, B24, B27, B12, B13, B11, B10 qui sont rarement présentes chez les patients avec des intensités différentes.

La bande B27 est présente uniquement chez le patient 2 avec une intensité moyenne (Figure 7). Les bandes B11, B13 sont présentes uniquement chez le patient 33 avec une intensité moyenne (Figure 8).

La bande B10 est présente chez les échantillons 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 13, 38 avec une intensité forte chez les patients 3, 5, 6, 7, moyenne chez 1, 4 et à l'état de trace chez les patients 10, 13 (Figures 7, 8).

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

2. Etude de la variation des protéines salivaires

2.1. Etude de la variabilité des protéines salivaires dénaturées et réduites

2.1.1. Etude des protéines salivaires de HPM

L'estimation de la variation des protéines salivaires prouve la présence de 19 protéines salivaires de haut poids moléculaire et de mobilités différentes localisées dans la zone 1 de haut poids moléculaires (Tableau 6).

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Tableau 6 : variabilité des protéines salivaires de HPM

Bandes	Mobilité (mm)	Echantillons (E)	Fréquence (%)
1	10	E 34, E44	4
2	21	E40, E41, E42, E43, E44,E45, E46, E47, E48	18
3	24	E45,E46,E47	6
4	33	E21	2
5	37	E23, E24	4
6	39	E21	2
7	43	E21, E27, E29,E49	8
8	45	E1, E7, E8, E49, E19, E24, E34,	14
9	47	E21, E28, E30,	6
10	48	E21, E23, E24, E28, E37, E44, E48, E49	16
11	50	E21,	2
12	51	E21, E28,	4
13	55	E49, E28, E31,	6
14	57	E1, E2, E4, E6, E7, E8, E11, E12, E15, E16, E49, E19, E20, E21, E22, E23, E24, E25, E28, E31, E34, E37, E39, E41, E42, E43, E44, E45, E48	59
15	60	E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E12, E14,E15, E16, E49, E17, E18, E20, E22, E23, E24, E25, E26, E27, E28, E29, E31, E34, E35, E37, E38, E39, E40, E41, E42, E43, E44, E45, E48	81
16	62	E21, E28,	4
17	65	E23, E24, E27, E28,	8
18	66	E1, E15, E49, E18, E21, E23, E24, E25, E26, E27, E40, E43 , E45	26
19	67	E49, E34, E35	6

Chapitre 3 : Résultats et discussion

L'observation du tableau 6, démontre des fluctuations des protéines salivaires de HPM qui résident au niveau de la bande protéique 15 avec une mobilité de 60 mm et de fréquence 81%, ce qui montre sa dominance dans la zone 1. Suivi de la bande 14 dont la mobilité est de 57 mm qui est moins fréquente que la précédente avec un taux de 59%.

Avec des fréquences variant de 26, 18, 16 et 14%, on a les bandes 18, 2, 10, 8 avec des mobilités de 66, 21, 48, 45 mm successivement. Les bandes 3, 9, 13, 19 ont la même fréquence de 6% avec des mobilités différentes (47, 55 et 67mm). Le même cas pour les bandes 1, 5, 12 qui ont des mobilités de 10, 37, 51mm et une fréquence de 4%. Enfin le taux de fréquence le plus faible est de 2% , pour les bandes 4, 6, 11 de mobilités 33, 39 et 50mm.

2.1.2. Etude des protéines salivaires de FPM

La variabilité des protéines salivaires de faible poids moléculaires dans les 49 échantillons indique la présence de 21 protéines salivaires qui sont réparties dans la zone 2 (Tableau 7).

L'observation de ces protéines FPM dans l'ordre décroissant montre que la bande 21 (mobilité 135mm) est la plus fréquente (84%) dans cette zone, suivie des bandes 7 et 8 avec les fréquences 73% et 69% de mobilité 91 et 97 mm, respectivement. Ensuite viennent les bandes 6, 1, 2, 9, 18, 15, 19, 3 avec des fréquences moyennes (51, 47, 45, 39, 37, 31, 26, 24%) et des mobilités différentes entre 70 et 130mm.

Les bandes protéiques 12 et 17 de mobilité 114 et 117mm, ont une fréquence similaire (16%). De même pour les bandes 14, 10, 5 avec un pourcentage de 10% et dont les mobilités sont de 120, 107et 83mm, respectivement. Aussi la fréquence de 8% concerne les trois bandes 20, 13,11 avec des mobilités de 133, 117, 109 mm, respectivement.

Le taux de fréquence le plus faible des protéines de FPM est de 4% et concerne la bande 16 dont la mobilité est de 123mm.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Tableau 7 : la variabilité des protéines salivaires de FPM

Bandes	Mobilité (mm)	Echantillons (E)	Fréquence (%)
20	70	E1, E2, E4, E8, E15, E16, E49, E18, E21, E23, E24, E25, E26, E27, E28, E29, E31, E33, E34, E35, E40, E43, E45	47
21	74	E1, E2, E3, E4, E8, E13, E15, E16, E49, E17, E18, E21, E23, E24, E25, E26, E27, E28, E29, E31, E34, E35	45
22	77	E1, E2, E3, E4, E8, E13, E21, E23, E24, E28, E40, E43	24
23	80	E4, E19, E27, E31, E33, E34	12
24	83	E21, E23, E24, E28, E44	10
25	87	E1, E2, E3, E4, E5, E8, E15, E49, E17, E18, E22, E23, E24, E25, E26, E27, E29, E32, E35, E37, E40, E44, E45, E46, E47	51
26	91	E1, E2, E3, E4, E5, E8, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E49, E17, E18, E19, E21, E22, E23, E24, E25, E26, E27, E28, E29, E32, E34, E35, E36, E40, E43, E45, E46, E47	73
27	97	E1, E2, E3, E4, E8, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E49, E17, E18, E19, E21, E22, E23, E24, E25, E26, E27, E29, E30, E32, E35, E36, E40, E43, E45, E46, E47	69
28	100	E4, E5, E7, E49, E19, E22, E23, E24, E27, E28, E31, E33, E34, E36, E40, E43, E45, E46, E47	39
29	107	E28, E37, E38, E44, E48	10
30	109	E18, E21, E28, E35	8
31	114	E4, E22, E23, E26, E27, E28, E40, E46	16
32	117	E21, E22, E26, E28	8
33	120	E28, E29, E30, E32, E33	10
34	122	E2, E14, E49, E17, E18, E21, E22, E26, E27, E29, E32, E33, E35, E46, E47	31
35	123	E18, E22	4
36	126	E2, E3, E8, E13, E24, E25, E27, E32	16
37	128	E4, E8, E17, E18, E22, E23, E25, E26, E27, E28, E30, E31, E32, E36, E40, E45, E46, E47	37
38	130	E2, E3, E4, E8, E13, E17, E22, E23, E25, E26, E29, E30, E35	26
39	133	E17, E22, E23, E26	8
40	135	E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E11, E12, E15, E16, E49, E17, E19, E20, E21, E22, E23, E24, E25, E26, E27, E28, E29, E30, E31, E32, E33, E34, E35, E36, E37, E38, E39, E41, E44, E45, E46, E47, E48	84

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Tableau 8 : variabilité des protéines salivaires de HPM

Bandes	Mobilité (mm)	Echantillons (E)	Fréquence (%)
1	1	E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E17, E18, E19, E20, E21, E22, E23, E24, E25, E26, E27, E28, E30, E31, E33, E35, E36, E37, E38, E39, E40, E41, E42, E43, E44, E45, E46, E47, E48, E49	90
2	2	E35, E49	4
3	4	E1, E2, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E13, E14, E16, E17, E18, E19, E20, E22, E23, E24, E25, E26, E27, E28, E30, E31, E34, E35, E49	57
4	6	E1, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E11, E14, E33, E35, E49	24
5	7	E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E11, E14, E19, E33, E49	29
6	10	E4, E9, E32, E39, E46, E47, E39, E46, E47	18
7	14	E4, E9	4
8	18	E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E17, E18, E19, E20, E21, E22, E23, E24, E25, E26, E27, E28, E29, E30, E34, E35, E36, E37, E38, E39, E40, E41, E42, E43, E44, E45, E46, E47, E48, E49	94
9	21	E1, E16, E17, E18, E21, E23, E25, E26, E27, E28, E29, E30, E34	27
10	24	E2, E4, E5, E6, E7, E8, E11, E14	16
11	30	E34	2
12	33	E33, E49	4
13	37	E34	2
14	45	E1, E37, E44, E48	8
15	48	E1, E18, E19, E33, E35, E37, E38, E39, E41, E42, E48, E49	24
16	53	E6, E18, E19, E26, E33, E37, E38, E39, E41, E42, E44, E48	24
17	57	E1, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E14, E18, E19, E22, E23, E33, E37, E42, E44, E48, E49	37
18	59	E1, E3, E7, E8, E10, E14, E18, E19, E21, E22, E23, E26, E30, E33, E35, E36, E41, E43, E47, E48, E49	43
19	61	E1, E2, E5, E7, E8, E9, E10, E11, E12, E14, E15, E16, E17, E18, E19, E20, E21, E22, E25, E26, E27, E28, E30, E33, E35, E37, E38, E39, E41, E42, E43, E44, E45, E46, E48, E49	73
20	63	E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E17, E18, E19, E20, E21, E22, E23, E24, E25, E26, E27, E28, E29, E30, E31, E32, E33, E34, E35, E36, E37, E38, E39, E40, E41, E42, E43, E44, E45, E46, E47, E48, E49	100
21	67	E27, E33, E44	6

2.2. Etude de la variabilité des protéines salivaires dénaturées et non réduites

2.2.1. Etude des protéines salivaires de HPM

L'étude de la variabilité des protéines salivaires des 49 échantillons révèle la présence de 21 protéines salivaires de haut poids moléculaire avec des mobilités différentes (Tableau 8).

On distingue, un grand polymorphisme de protéines salivaires de haut poids moléculaire qui se situe au niveau des bandes B1, B8 et B20 avec des mobilités de 1 mm, 18 mm et 63 mm respectivement qui sont les plus fréquentes avec un pourcentage maximum de 90%, 94% et 100%, respectivement.

Suivies des bandes B3 et B19 de mobilités respectives de 4 mm et 61 mm, qui sont moins fréquentes que les précédentes avec un pourcentage moyen de 57% et 73%, respectivement.

Puis on a les bandes B4, B5, B9, B15, B16, B17, B18 dont les mobilités sont de 6 mm, 7 mm, 21 mm, 48 mm, 53 mm, 57 mm et 59 mm, respectivement avec des pourcentages respectifs de 24%, 29%, 27%, 24% 24% 37% 43%.

Enfin on retrouve les bandes protéiques B2, B7, B10, B11, B12, B13, B14 et B21 de mobilités respectives de 2 mm, 10 mm, 14 mm, 24 mm, 30 mm, 33 mm, 37 mm, 45 mm et 67 mm qui sont faiblement fréquentes avec un pourcentage se situant entre 18% et 2%.

2.2.2. Etude des protéines salivaires de FPM

Les différentes protéines salivaires de faible poids moléculaire et de mobilités différentes sont observées dans la zone 2 (Tableau 9).

D'après le tableau ci-dessus, on remarque une variabilité des protéines salivaires de faible poids moléculaire. La bande B41 dont la mobilité est de 138 mm est la plus fréquente avec un pourcentage maximum de 100% ce qui montre sa dominance dans la zone 2, suivie des bandes protéiques B30, B34, B40 dont la mobilité est de 90 mm, 108 mm et 132mm respectivement avec un pourcentage moyen respectif de 63%, 76% et 61% qui se retrouvent moins fréquentes que la précédente, puis on retrouve les bandes B22, B23, B25, B26, B28, B29, B32, B36, B37, B38 et B39 dont les mobilités sont respectivement 71, 74, 79, 82, 85, 89, 101, 117, 120, 125 et 130 mm avec des fréquences entre 22% et 47% qui sont beaucoup moins fréquentes. Enfin on note les bandes B24, B27, B31, B33 et B35 dont les mobilités sont de 76 mm, 84 mm, 97 mm, 107 mm, 113mm qui restent très faiblement fréquentes avec un pourcentage minime de 14% à 4%.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Tableau 9 : variabilité des protéines salivaires de FPM

Bandes	Mobilité (mm)	Echantillon (E)	Fréquence (%)
22	71	E1, E4, E16, E17, E21, E22, E24, E25, E28, E30, E31, E33, E34, E35, E36, E40, E43, E45, E46, E47, E49	43
23	74	E1, E2, E3, E8, E10, E11, E13, E17, E18, E19, E21, E22, E27, E32, E34, E44, E47, E49	37
24	76	E29, E32, E34, E49	8
25	79	E1, E3, E15, E17, E18, E21, E22, E23, E25, E26, E28, E33, E36, E47, E49	31
26	82	E1, E2, E4, E8, E14, E15, E16, E17, E18, E19, E21, E22, E23, E25, E26, E27, E28, E32, E34, E37, E44, E47, E49	47
27	84	E3, E49	4
28	85	E1, E2, E4, E6, E8, E14, E28, E33, E34, E37, E47, E49	24
29	89	E1, E2, E3, E8, E14, E15, E17, E21, E22, E23, E34, E37, E44, E45, E46, E47, E49	35
30	90	E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E17, E18, E19, E20, E21, E22, E23, E24, E25, E26, E27, E32, E34, E43, E49	63
31	97	E5, E34, E40, E44, E47	10
32	101	E4, E18, E19, E22, E23, E24, E25, E28, E29, E31, E33, E34, E44, E46, E47	31
33	107	E16, E32, E34	6
34	108	E1, E2, E3, E4, E5, E8, E10, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E17, E18, E19, E20, E21, E22, E23, E24, E25, E26, E27, E28, E31, E33, E34, E35, E36, E37, E40, E43, E45, E46, E47, E49	76
35	113	E11, E17, E18, E22, E25, E36, E47	14
36	117	E1, E11, E28, E31, E33, E34, E36, E40, E45, E47, E49	22
37	120	E1, E2, E3, E8, E11, E14, E21, E22, E23, E25, E26, E28, E31, E34, E36, E40, E43, E45, E46, E47, E49	43
38	125	E9, E14, E16, E17, E18, E21, E22, E23, E25, E36, E40, E43, E45, E46, E47	31
39	130	E3, E8, E9, E11, E14, E16, E17, E20, E21, E22, E25, E36, E40, E43, E45, E46, E47	35
40	132	E1, E2, E3, E4, E5, E8, E10, E11, E14, E16, E17, E20, E21, E22, E24, E25, E27, E28, E29, E31, E32, E33, E34, E36, E40, E43, E45, E46, E47, E49	61
41	138	E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E17, E18, E19, E20, E21, E22, E23, E24, E25, E26, E27, E28, E29, E30, E31, E32, E33, E34, E35, E36, E37, E38, E39, E40, E41, E42, E43, E44, E45, E46, E47, E48, E49	100

3. Classification hiérarchique des protéines salivaires

Pour la comparaison entre les protéines salivaires réduites et non réduites fractionnées par SDS-PAGE, nous avons fait une représentation sous forme d'arbre hiérarchique ou dendrogramme. Le regroupement effectué à chaque pas de l'algorithme de classification hiérarchique rassemble des éléments qui sont plus au moins proche entre eux. Plus nous avançons dans le regroupement plus nous nous rapprochons du cime de l'arbre, plus le nombre des points déjà associés est important et plus la distance minimale entre les classes est importante.

Cette représentation matérialise bien le fait que les classes formées au cours du processus de classification constituent une hiérarchie indiquée de classe partiellement emboîtées les unes dans les autres.

3.1 Dendrogramme des protéines salivaires dénaturées et réduites

Le dendrogramme obtenu à partir des distances d'agrégation, montre de nombreux groupes permettant d'estimer la ressemblance dans la composition protéique des échantillons (Figure 9)

L'ensemble des échantillons est partagé en deux groupes à la distance 4.5, le premier contient les deux échantillons 20 et 27 et le second se divise en deux autres groupes à la distance 3.5 dont le premier est divisé à son tour en deux autres sous-groupes : T1, T2 pour le premier et 22, 23 pour le deuxième à la distance 3.25. Le deuxième sous-groupe est subdivisé en deux autres groupes, à la distances 3, l'échantillon 26 forme un groupe unique et le deuxième sous-groupe est polymorphe et renferme le reste des échantillons.

Le dendrogramme montre une grande similarité de la composition des protéines salivaires des échantillons à une distance d'agrégation moyenne 2.25 (figure 9) .

L'état physiologique et pathologique des patients et les résultats des analyses en cluster de la composition en en protéines salivaires ne sont pas corréllés malgré les différences qui existe entre les témoins et les patients et même entre les patients eux même. A titre d'exemple : les patients 1 et 2, 11 et 15, 18 et 35.

Les patients 1 et 2 constituent un groupe à une distance de 2.5 malgré la divergence entre les deux : la patientes 1 de 52 ans a une MPI stade 2.5 et l'échantillons 2 est un homme de 60 ans présentant une MPF stade 2.

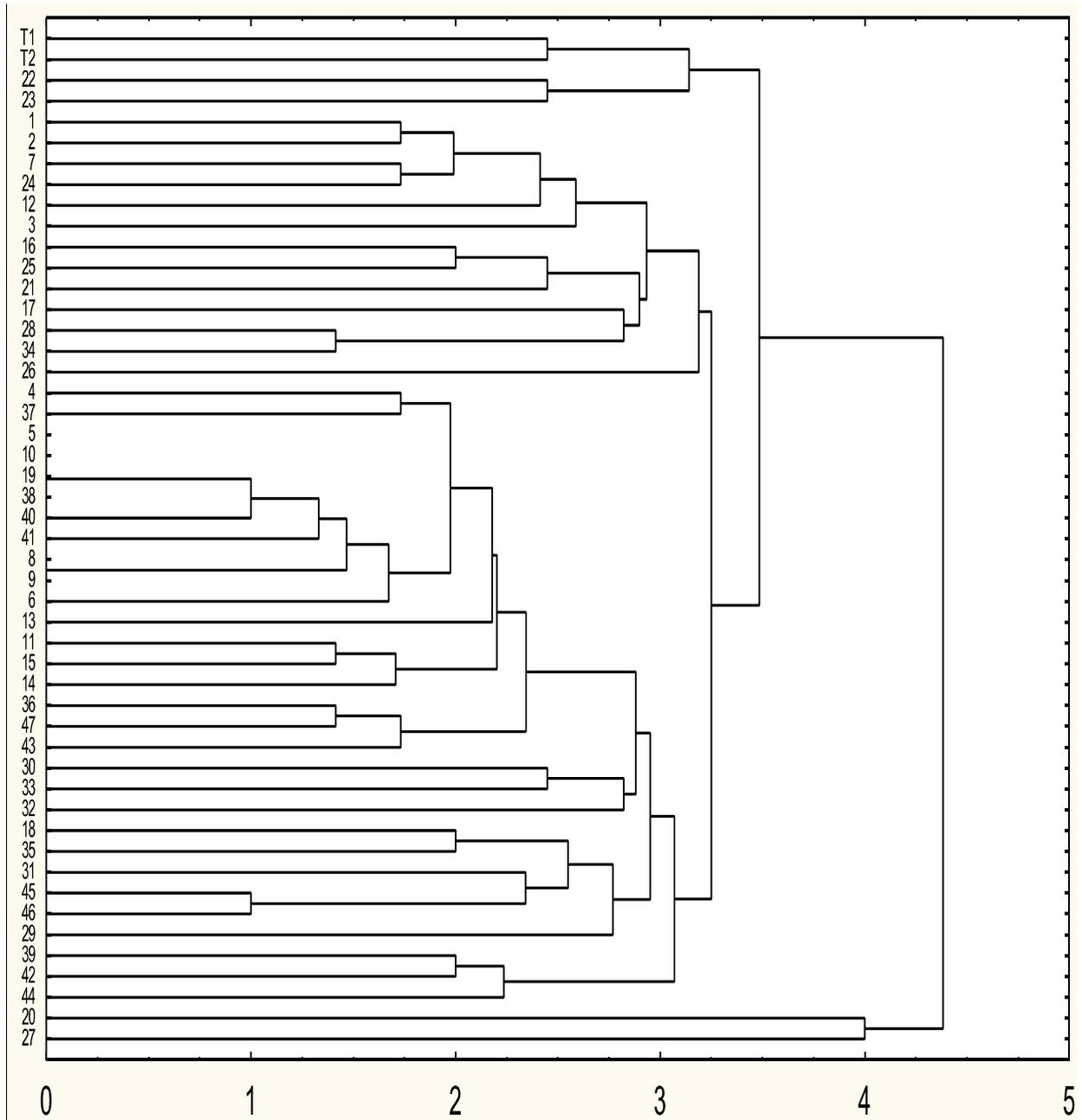


Figure 9 : dendrogramme des 49 échantillons révélés dans les conditions dénaturantes et réductrices fractionnés par SDS/PAGE.

A la distance 1.5, le patient 11 de 42 ans atteint d'une MPF stade 1 depuis 6 ans et le patient 15 de 63 ans a une MPI stade 2 depuis 2 ans, appartiennent au même groupe et forment un clade malgré la différence qui existe entre eux.

A la distance 2, les deux patient 18, 35 forment un clade malgré que ces deux femmes ont de différents âge (61 ans pour l'échantillon 18 et 46 ans pour l'échantillon 35) et ont une MPF de différents stades (3, 2.5 respectivement).

Chapitre 3 : Résultats et discussion

En revanche, il y a des patients qui forment des groupes uniques tels que : 44, 29, 3, 13, 17, 32, 41, 6, 26, 21, 14, 43, 31 et 12 sachant que ces patients présentent des similarités avec d'autres patients.

En outre quelques patients présentant des signes communs appartiennent au même groupe tel que : les patients 20 et 27 qui ont une MPI, stade 2 et qui forment un groupe à la distance 4. A la distance 2, on a les deux patients 16 et 25 qui ont une moyenne d'âge de 60 ans et une MPI stade 2 depuis 3 ans.

3.2. Dendrogramme des protéines salivaires dénaturées non réduites

Le dendrogramme obtenu à partir des distances d'agrégation, révèle de nombreux groupes permettant d'estimer la ressemblance dans la composition protéique des échantillons (Figure 10).

L'ensemble des échantillons est partagé en deux groupes à la distance 4.2, le premier contient uniquement le patient 33 tandis que le second groupe est divisé en deux sous-groupes à la distance 4 dont le premier renferme à son tour deux autres groupes où les T1 et T2 forment un clade et le patient 32 forme un groupe à part à la distance 3.6, et le deuxième sous-groupe est subdivisé en deux autres groupes, l'échantillon 8 forme un groupe unique et le deuxième sous-groupe renferme le reste des échantillons.

Le dendrogramme montre une grande similarité de la composition des protéines salivaires des échantillons à une distance d'agrégation moyenne de 3.

L'état physiologique et pathologique des patients et les résultats des analyses en cluster de la composition en protéines salivaires ne sont pas corréllés malgré les différences qui existe entre les témoins et les patients et même entre les patients eux même. A titre d'exemple : les patients 7 et 13, 16 et 20, 29 et 34, 22 et 25.

Les patients 7 et 13 constituent un groupe à la distance 1.4. Les deux patients sont des femmes, la première patiente a 71 ans et la deuxième 74 ans, elles ont une MPI et appartiennent au même stade 2.

À la distance 1.7, le patient 16 de 63 ans atteint d'une MPI stade 2 depuis 4 ans et le patient 20 de 54 ans a une MPI stade 2 depuis 3 ans, appartiennent au même groupe et forment un clade, il n'y a pas une grande différence entre les deux cas.

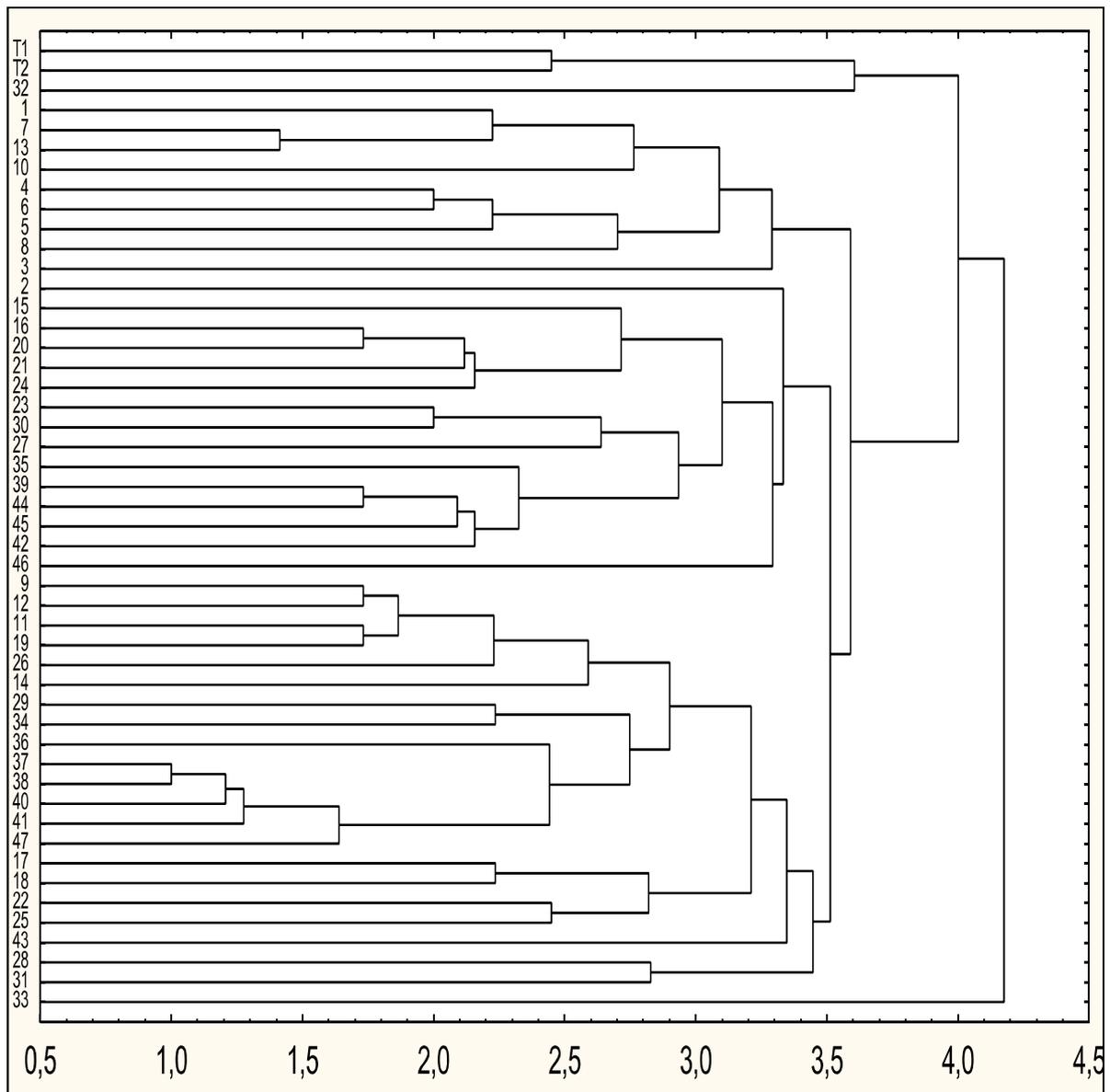


Figure 10 : dendrogramme des 49 échantillons révélés dans les conditions dénaturantes et non réductrices fractionnés par SDS/PAGE.

À la distance 2,2 , les deux patients 29,34 forment un clade malgré que ces deux hommes ont un âge différent (89 ans pour l'échantillon 29 et 74 ans pour l'échantillon 34) et ont une MPI de différents stades (2 et 4 respectivement).

Les deux patients 22 et 25 constituent un groupe à la distance 2.4, le patient 22 est un homme de 63 ans présentant une MPI de stade 2 et la patiente 25 est une femme de 58 ans présentant une MPI de stade 2, malgré la différence de sexe mais ces deux patients appartiennent au même groupe et forment un clade.

4. Indice de similarité des diagrammes protéiques des échantillons

Chapitre 3 : Résultats et discussion

L'indice de similarité ou indice de ressemblance (IRS) a été calculé en rapportant l'indice de similarité absolu (IAS) au nombre total (N) des bandes présentes dans un, au moins, des diagrammes des échantillons comparés. L'IAS présente l'ensemble des bandes qui ne sont pas significativement différentes c'est-à-dire qu'elles ont la même mobilité.

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

Les valeurs des IRS sont rassemblées dans les tableaux 9, 10 .

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.

4.1. Indice de similarité des protéines salivaires dénaturée et réduites

Les indices de similarités ont été calculés pour les 49 échantillons dont deux témoins et 47 patients atteints de la maladie de parkinson, ils sont représentés sous forme d'une matrice dans le tableau 10. Cette matrice englobe les valeurs d'IRS trouvées entre les diagrammes protéiques comparés deux à deux. Ces résultats montrent que les indices de similarités se situent entre 0 et 100%.

L'analyse du tableau permet de constater des valeurs maximales d'IRS égales à 100%, qui sont observées entre les patients 20 et 6, 10 et 9, 21 et 11, 39 et 6 et entre 39 et 20, ce qui indique une similitude entre ces patients.

Certains diagrammes apparaissent voisins tels que 47 et 46 présentant un indice de similarité de 90%. Ensuite, on distingue des valeurs d'IRS importantes qui fluctuent entre 85% et 52%. à titre d'exemple :

- IRS à 85% entre les patients 35 et 29.
- IRS à 79% entre les patients 8 et 2.
- IRS à 75% entre les patients 3 et 2, 41 et 6, 15 et 1.
- IRS à 60% entre les patients 2 et 1, 25 et 1, 48 et 20

Ces différents patients présentent des diagrammes proches avec autant de ressemblances que de dissemblances se qui fait penser que la composition protéique est presque proche.

L'IRS de 50% a été observé dans le tableau 9 entre plusieurs patients comme 3 et 1, 18 et 7, 35 et 25, 48 et 42,...

Des valeurs faibles de l'IRS varient entre 48 et 6%. A titre d'exemple :

- L'IRS à 48% entre les patients 23 et 1, 23 et 2, 24 et 4.
- L'IRS à 27% entre les patients 26 et 4, 47 et 11,

Chapitre 3 : Résultats et discussion

- L'IRS à 14 % entre les patients 36 et 20, 33 et 23, 11 et 46,
- L'IRS à 6% entre les patients 48 et 18.

De se fait les diagramme des différents patients présentent une petite ressemblance , ce qui implique une grande différence dans la composition protéique.

On outre, des valeurs minimal d'IRS égaux 0% sont observées entre les patients 13 et 6, 37 et 20, 33 et 9, 33 et 10, 33 et 13, 37 et 13, 39 et 13, 41 et 13, 42 et 13, 44 et 13, 48 et 13, 42 et 30, 42 et 32, 42 et 33, 42 et 36.

4.2. Indice de similarité des protéines salivaires dénaturée et non réduites

Les indices de similarités ont été calculés pour les 49 échantillons, ils sont représentés sous forme d'une matrice dans le tableau 11. Cette matrice fournit les valeurs d'IRS trouvées entre les diagrammes protéiques comparés deux à deux. Ces résultats montrent que les indices de similarités se situent entre 11% et 90%.

D'après le tableau on constate d'abord des valeurs d'IRS importantes qui varient entre les patients dans l'intervale de 90% et 54 % . A titre d'exemple :

- IRS à 90% entre les patients 14 et 8.
- IRS à 79% entre les patients 49 et 1 , 45 et 40 .
- IRS à 68% entre les patients 23 et 22, 25 et 16, 11 et 8.
- IRS à 67% entre les patients 13 et 12, 22 et 14 , 22 et 18 .

De ce fait, les diagrammes de ces différents patients présentent une légère dissemblance, ce qui implique une forte similarité dans la composition protéique.

Ensuite l'IRS de 50% a été observé dans le tableau 10 entre plusieurs patients : 3 et 1 , 25 et 1 , 24 et 5 , 34 et 1 , 36 et 28....etc

Enfin, on distingue des faibles valeurs d'IRS qui fluctuent entre 48% et 11%. A titre d'exemple :

- L'IRS à 48% entre les patients 25 et 2, 24 et 22, 49 et 11, 26 et 8,.....
- L'IRS à 35% entre les patients 7 et 3, 45 et 5, 37 et 5, 47 et 44,.....
- L'IRS à 25% entre les patients 17 et 6, 48 et 3, 41 et 11, 42 et 29,.....
- L'IRS à 11% entre les patients 35 et 32, 48 et 34.

Les diagrammes sont différents avec de forte dissemblance, ce qui implique une hétérogénéité dans la composition protéique.

II. Conséquence de la maladie de parkinson sur le protéome salivaire

Chapitre 3 : Résultats et discussion

L'analyse comparative des profils électrophorétiques des protéines salivaires extraites dans deux conditions différentes : dénaturante réductrice et dénaturante non réductrice montre qu'environ 12 bandes protéiques communes entre les différents échantillons (B8, B13, B18, B20, B21, B22, B25, B14, B15, B26, B27, B40) révélées dans la première condition (Figure 5) et 24 bandes protéiques communes entre les différents échantillons (B3, B4, B5, B8, B9, B14, B15, B17, B18, B19, B20, B22, B23, B25, B26, B28, B29, B30, B34, B35, B36, B37, B40, B41) fractionnées dans la deuxième condition (Figure 7), présentent une variation d'expression qualitative et quantitative et sont soit absentes ou présentes d'intensité égale ou différente par rapport à celles obtenues sur le profil des témoins et/ou des malades.

Quelques exemples de protéines exprimées chez les parkinsoniens et aussi absentes totalement chez les témoins (sujet sain) concernent les B1, B2, B3, B10, B18, B30, B31, B33 révélées dans les conditions dénaturantes réductrices de masses moléculaires approximatives de 200 KDa, 190KDa, 180KDa, 78KDa, 60KDa, 15KDa, 12KDa, respectivement et les bandes B7, B10, B21, B27, B32, B33, B39 révélées dans les conditions dénaturantes non réductrices de masses moléculaires approximatives de 180KDa, 140KDa, 70KDa, 37KDa, 29KDa, 28KDa, 10KDa respectivement.

D'après la littérature, ces groupes de protéines correspondent à l'alpha 2-macroglobuline (200KDa), des immunoglobulines G (190KDa, 180KDa et 140KDa), des transferrines (78KDa), des albumines (70 KDa), des hémoglobines (60KDa), des beta lactoglobulines (37KD), des lipases linguales (29KDa et 28 KDa), des lysozymes (15KDa), la beta 2-microglobuline (12KDa) et à des ribonucléases (10KDa). Donc probablement, l'expression de ces protéines dans le milieu salivaire chez les patients malades est une des conséquences du Parkinson sur le protéome salivaire.

Un autre exemple, des protéines exprimées chez les témoins (sujet sain) et les patients malades, les bandes B8, B13 révélées dans la première condition dénaturante réductrice de masses moléculaires approximatives aux environs de 90KDa et 75KDa respectivement, et les bandes B8, B20 révélées dans la deuxième condition dénaturante non réductrice de masses moléculaires approximatives de 170 KDa et 60 KDa respectivement. Ces protéines montrent des variations d'expression quantitative avec des intensités égales ou différentes par rapport à celles des témoins. Certaines protéines sont surexprimées, d'autres sont à l'état de trace.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

D'après la littérature, les groupes de protéines situés aux environs de 82 KDa (90 et 75 KDa) peuvent correspondre à des transferrines. Quant aux protéines situées aux environs 115 KDa, elles peuvent correspondre à des immunoglobulines. Probablement les fluctuations quantitatives de certaines protéines exprimées sont donc une des conséquences du Parkinson sur le protéome salivaire.

Ces différences d'expression sont autant des facteurs d'intérêt (biomarqueurs) pour l'analyse de l'influence de la maladie du Parkinson sur la composition en protéines salivaires, celles-ci étant susceptibles d'être spécifiquement exprimées ou inhibées au cours de cette pathologie. Ces protéines salivaires variantes peuvent être secondairement fractionnées par électrophorèse bidimensionnelle et caractérisées par spectrométries de masse afin de préciser si elles sont susceptibles d'être considérées comme marqueur de cette pathologie.

26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	
44	40	31	41	13	40	25	13	47	41	21	29	23	25	44	23	17	50	24	50	22	24	20	53	1
53	47	26	60	20	31	43	20	38	60	21	29	23	25	35	23	16	43	24	41	29	31	20	47	2
44	39	19	50	25	20	42	7	27	50	27	25	30	20	33	18	9	29	20	31	27	29	15	32	3
56	58	38	44	25	53	24	25	47	44	36	25	20	21	56	20	13	25	21	53	41	35	18	45	4
27	31	17	31	10	27	30	22	36	31	43	38	50	33	33	29	14	27	27	42	36	40	22	31	5
13	12	14	15	13	33	10	13	27	15	14	50	40	100	8	75	50	20	33	25	8	9	50	19	6
12	17	17	13	10	40	8	22	50	13	25	38	29	60	14	50	33	27	27	31	15	17	38	25	7
50	45	30	47	27	38	40	12	41	47	29	27	21	23	41	21	14	38	22	47	28	29	19	45	8
21	19	9	25	13	9	22	0	18	25	33	13	20	20	27	17	20	33	9	25	18	20	13	19	9
21	19	9	25	13	9	22	0	18	25	33	13	20	20	27	17	20	33	9	25	18	20	13	19	10
27	24	17	31	22	27	30	10	33	31	43	38	50	60	23	50	33	40	27	42	25	27	38	31	11
27	24	17	31	22	27	30	10	33	31	43	38	50	60	23	50	33	40	27	42	25	27	38	31	12
25	22	12	29	20	7	27	0	13	29	22	0	11	0	21	0	0	25	0	13	14	15	0	16	13
29	25	8	33	11	8	33	11	15	33	29	11	33	17	25	14	17	30	12	23	18	30	11	25	14
53	47	24	50	15	38	31	15	43	50	27	36	30	33	43	30	20	50	29	62	27	29	25	56	15
40	35	26	46	18	45	25	18	50	46	33	30	38	43	29	38	25	45	23	38	21	23	30	44	16
71	44	19	57	33	27	50	14	24	57	36	23	27	18	33	17	8	19	19	38	43	46	17	37	17
56	50	22	44	13	25	35	13	24	53	23	13	15	8	50	8	8	33	11	44	31	33	6	42	18
18	28	16	19	18	33	25	30	50	19	50	18	22	25	20	22	11	33	14	36	31	33	18	35	19
13	12	14	15	13	33	10	13	27	15	14	50	40	100	8	75	50	20	33	25	8	9	60	19	20
31	29	44	28	13	16	17	13	19	29	14	13	9	10	19	9	5	26	13	23	15	12	13	38	21
65	43	29	37	25	28	38	18	25	32	36	25	20	21	39	20	13	28	21	44	50	44	18	36	22
57	52	46	35	19	33	23	14	30	35	21	25	15	16	50	15	10	40	27	48	32	27	19	46	23
35	50	39	32	10	30	25	15	40	33	22	28	17	18	40	17	11	44	30	45	23	24	21	57	24
63	56	26	50	29	40	43	13	35	50	31	29	23	25	44	23	15	40	24	60	29	31	20	47	25

26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	
52	48	60	19	38	36	22	54	50	44	41	48	24	23	33	28	28	42	36	42	36	50	36	79	1
50	61	52	32	32	37	32	30	48	33	30	45	28	26	33	26	26	45	36	45	43	42	24	56	2
45	40	35	22	26	32	26	31	33	29	53	27	22	21	42	28	21	56	26	47	45	50	25	52	3
29	36	43	26	24	35	30	44	36	32	29	36	20	25	57	19	25	36	29	30	41	41	23	43	4
40	50	36	24	35	33	21	38	30	44	27	35	31	29	37	29	38	42	33	35	33	25	33	43	5
37	32	27	19	31	22	17	35	22	33	18	39	36	33	20	33	43	26	30	19	18	18	38	36	6
44	39	27	19	50	22	17	35	18	50	24	32	36	33	20	43	43	39	30	25	24	15	47	41	7
48	50	40	17	32	30	26	39	41	40	36	43	23	22	33	27	23	50	36	39	46	46	30	64	8
33	35	25	17	35	20	21	27	17	37	27	29	31	38	30	29	38	42	27	35	40	25	33	33	9
56	71	42	29	54	40	33	30	33	47	39	33	38	36	35	46	36	60	32	41	39	33	40	42	10
41	50	43	20	30	42	24	33	36	38	48	25	26	25	45	25	50	50	24	50	41	41	23	48	11
50	54	35	27	45	31	23	24	22	46	31	43	56	50	36	50	50	54	31	43	40	23	42	27	12
47	62	33	25	42	38	31	17	32	43	29	31	36	33	33	33	33	40	29	31	29	26	29	31	13
48	43	44	17	32	30	21	39	37	39	42	43	23	22	39	27	27	57	31	50	48	43	30	59	14
53	47	39	23	29	19	29	22	30	31	28	47	33	31	24	31	31	38	35	38	35	30	27	35	15
47	59	50	31	44	33	35	22	46	37	40	29	24	22	44	22	22	59	17	50	50	35	20	27	16
52	63	55	25	42	33	29	28	44	36	52	35	25	24	43	24	24	55	33	55	52	56	22	47	17
65	52	46	24	40	26	22	37	35	41	38	45	37	30	20	42	42	39	43	24	32	43	45	45	18
58	53	39	21	39	30	25	44	32	47	21	53	44	41	22	50	50	38	50	26	30	32	53	46	19
50	64	44	31	46	43	27	26	29	47	41	35	42	38	47	38	38	64	26	53	50	29	33	33	20
65	60	55	24	47	38	29	31	48	41	57	33	25	23	48	29	23	68	32	60	57	60	26	55	21
52	48	71	22	36	43	25	38	45	38	59	36	22	21	39	26	26	62	40	55	59	68	29	53	22
61	45	52	28	39	37	19	30	42	29	43	38	21	20	33	26	26	45	36	38	43	50	30	45	23
41	53	13	45	46	67	27	32	49	47	41	28	31	29	47	29	29	53	26	44	50	35	25	33	24
60	50	70	32	37	42	23	32	45	36	60	29	25	24	50	24	24	63	28	55	60	56	22	42	25

CONCLUSION GÉNÉRALE

Conclusion

L'objectif de cette étude est d'une part d'explorer de manière aléatoire le protéome salivaire des patients atteints de la maladie de Parkinson, et d'autre part de rechercher des biomarqueurs de la maladie dans la salive par application de la technique d'électrophorèse monodimensionnelle.

Notre première préoccupation est d'obtenir la meilleure expression possible des protéines de la salive. Ceci nous a conduit à réaliser deux extractions dans des conditions différentes : dénaturante réductrice et dénaturante non réductrice. Pour une séparation optimale des protéines extraites, ces dernières sont séparées par la méthode SDS/PAGE décrite par [28], modifiée [42]. Par conséquent, cette méthode nous a permis l'obtention des profils protéiques nettement séparés et reproductibles.

L'analyse des gels a permis de :

- Déceler 40 bandes protéiques de mobilités différentes, pour les protéines dénaturées et réduites, 19 bandes protéiques de HPM et 21 bandes protéiques de FPM. Pour les protéines dénaturées non réduites, 21 bandes protéiques de HPM et 20 bandes protéiques de FPM ont été dénombrés.
- Comparer les profils électrophorétiques des sujets malades avec ceux des témoins et de remarquer que chacun des échantillons possède un profil protéique qui lui est propre et qui peut ressembler 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 de chacune des bandes protéiques de haut et de faible poids moléculaire.
- Distinguer les différences dans la composition protéiques des patients malades et des témoins.
- Identifier quelques protéines susceptibles d'être des biomarqueurs salivaires potentiels de la maladie.

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

L'application des techniques d'électrophorèse monodimensionnelle nous a fourni des résultats satisfaisants mais cette méthode ne nous permet pas de confirmer le diagnostic de la maladie

Conclusion

de parkinson. Pour cela, nous avons jugé à court terme, que l'emploi de l'électrophorèse bidimensionnelle devrait accroître encore nos possibilités de trouver un ou plusieurs biomarqueurs de la maladie dans la salive, de les identifier et de les caractériser par la suite.

La poursuite ce travail sur ces protéines implique au préalable l'utilisation de techniques et méthodes capable de fournir une très bonne séparation. Nous comptons donc reprendre la même approche en utilisant une technologie permettant une séparation bidimensionnelle de haute résolution. Cela consiste a la séparation des protéines sur des strips préfabriqués lors d'une première dimension en fonction du poids moléculaire, dans le but d'obtenir un grand nombre de spots bien résolus. Ce travail sera poursuivie par la caractérisation de ces spots par spectrométrie de masse afin d'identifier les protéines susceptibles d'être considérées comme des marqueurs potentiels de cette pathologie.

Références bibliographiques

- [1].Acuna G, Franco-Garrocho L, Alonso S, Uribe L. 2011. Parotid gland giantpleomorphicadenoma : report of caseandliteraturerevision. *Revista oral*; 12 (36) : 679-682.
- [2]. Amerongen AV, Veerman EC. 2002. Saliva the defender of the oral cavity. *Oral Dis*; pp 12-22.
- [3].Antoine E, ChristopheG, Arthur H.2009. La maladie de Parkinson. *Univercité de Genève* ; pp 13-20.
- [4]. Azerad J. 1992. Physiologie de la manducation. Edition Masson: Paris.
- [5]. Azulay J P, Witjas T, Defebvre L. 2011. Signes non moteurs. In L. Defebvre & M. Vérin (Eds.), *La maladie de Parkinson* ; pp 65-80.
- [6]. Ben-Haroush A, Yogev Y, Hod M. 2004. Epidemiology of gestationaldiabetesmellitus and its association with Type 2 diabetes. *Diabet Med* ; 21 : 103-113.
- [7]. Bonnet AM. Hergueta T. 2007. La maladie de Parkinson au jour le jour. *Paris: John Libbey Eurotext*.
- [8]. Brin F, Courrier C, Lederlé E, Masy V. 2004. Dictionnaire d'Orthophonie. *Isbergues : Ortho Edition*.
- [9]. Chartier MC, Kachergus J, Roumier C, *et all*. 2004. Alpha- synucléin locus duplication as a cause of familial parkinson's disease; pp 1167-1169.
- [10]. Cécile C. 2012. Les médicaments dopaminergiques : de la maladie de Parkinson aux traitements des addictions. pp 34-50.
- [11].Creapharma. (2013). Statistiques Parkinson. <http://www.creapharma.fr/N9505/parkinson/statistiques-parkinson.html>, consulté le 06/04/2013
- [12]. Dadoune JP, Hadjiisky P, Siffroi JP. 2000. Histologie. *Paris: Médecine -science Flammarion*; pp 191-193.
- [13]. Defebvre L. 2005. La maladie de Parkinson. In C. Ozsancak & P. Auzou (Eds). *Les troubles de la parole et de la déglutition dans la maladie de Parkinson* ; pp 9-27.

- [14]. Defebvre L. 2011. Signes moteurs. In L. Defebvre & M. Vérin (Eds.), *La maladie de Parkinson*; pp 47- 64.
- [15]. 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 gyroscopes. *Assessment and Regulation Kit Parkinson*. pp 55-152.
- [16]. Dujardin K, Defebvre L. 2002. Neuropsychologie de la maladie de Parkinson et des syndromes apparentés. Issy- les- moulineaux : Masson.
- [17]. Ewencyk C, Vidailhet M. 2011. Critères diagnostiques. In L. Defebvre & M. Vérin (Eds.), *La maladie de Parkinson* ; pp 111-117.
- [18]. Fearnley JM, Lees A. 1991. Aging and parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity; pp 301-2283.
- [19]. Gateff D. 2009 Les therapis cellulaires dans le cadre de la maladie de parkinson : vers une nouvelle ere therapeutique ?. *Univercité Henri Poincaré - Nancy 1* ; pp 75- 152.
- [20]. Ganong W. 2005. Les glandes salivaires et la salive. *Physiologie médicale* ;De Boech ; pp 464-465.
- [21]. Guenard H. 2001. Physiologie humaine. Contrôle de la sécrétion salivaire. Wolters Kluwer ; p 409.
- [22]. Haute Autorité de Santé ; 2014. Service DIPHGuide du parcours de soins, Maladie de Parkinson. www.has-Sante.fr.
- [23]. Hersch EC, Hunot S, Damier P. 1999. Glial cell participation in the degeneration of dopaminergic neurons in parkinson's disease; pp 9-18.
- [24]. Hirtz C, Chevalier F, Raingeard I, Egea J.C, Bringer J, Rossignol M, Deville De Périère. 2005. Recherche préliminaire de marqueurs Salivaires du diabète de type 1 chez l'homme. *Les cahiers de l'ADF*; N°18-19-1 er trimestre.
- [25] Jimenez- Jimenez FJ, Mateo D, Gimenez-Roldan S. 1992. *Premorbid* smoking, alcohol consumption and coffee drinking habits in parkinson's disease. case-control study; pp 339-44.
- [26]. Julien R. 2011. Intérêts des biomarqueursbiologique dans les essais cliniques. *Université Henri Poincare- Nancy1 Faculté de pharmacie* ; pp 10-35.
- [27]. Kubis N, Faucheux B, Ransmayr G, Damier P, Duyckaerts C, Henin D, *et all*. 2000. Preservation of midbrain catecholaminergic neurons in very old human subjects; pp 366-73.
- [28]. Laemmli U.K. 1970. Clivage of structural protéins during the assembly of bacteriophage. *Aspects fondamentaux, Paris*.

- [29]. Laudenbach P. 1987. Glandes salivaires: notions fondamentales et exploration des glandes salivaires. *Encycl Méd Chir (Paris), Odontologie*.
- [30]. Lautier C, Goldwurm S, Durr A, *et all.* 2008. Mutation in the GIGYF2 (TNRC15) gene at the PARK 11 locus in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet*; pp 822-833
- [31]. Lebouvier T, Chaumette P, Damier M, Neunlist P. 2008. Apport des biomarqueurs au diagnostic de la maladie de Parkinson. *Clinique neurologique* ; pp 34-37.
- [32]. Lindenmeier G, Grillhos C, Mocl, Berghold S, Schneider N, Munster B. (2003). *Biochimie humaine*. édition Flammarion-Paris ; pp 460-461.
- [33]. Loty S, Loty C, Hue O. 1998. Les substituts salivaires. *Cah Prothès* ; 101:19-26.
- [34]. Luc B, Laura P, Gemma R A, Julia G, Poul H J, Birgit H, Karine M, Vincent O, Anja B, Beat H M, Ronald M. 2013. *Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains*. *Nature Communications*. 10 octobre 2013. DOI: 10.1038/ncomms3575.
- [35]. Maraganore DM, De Andrade M, Elbarz, *et all.* 2006. Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease. *JAMA* 296; pp 661-670.
- [36]. National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS). www.ninds.nih.gov. Consulté en 2011.
- [37]. Parret J, Bobillon G, Lissac M. 1982. Milieu Buccal. *Encycl Méd Chir (Paris), Stomatologie*.
- [38]. Parron, Tesifon, Mar R, Antonio F, *et all.* 2011. Association between Environmental Exposure to Pesticide and Neurodegenerative Diseases, *Toxicology and Applied Pharmacology*; pp 379-385.
- [39]. Rascol A. 1998. La maladie de Parkinson; p 246.
- [40]. Santé de Canada. 2003. La maladie de Parkinson: ses répercussions sociales et économiques, Ottawa ; p 6.
- [41]. Scherman D, Desnos C, Darchen F, Javoy-Agid Y. 1989. Striatal dopamine deficiency in Parkinson's disease: role of aging; pp 551-7.
- [42]. Sing N.K, Shepherd K.W, Cornish G. B. 1991. A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. *Journal of Cereal Science*; pp 203-208.
- [43]. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, *et all.* 2003. Alpha synuclein locus triplication causes Parkinson's disease; p 841.
- [44]. Tanner CM. 1992. Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol Clin*; 10:317-329.
- [45]. Trinh, J. & Farrer, M. 2013. Advances in the genetics of Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurol.*

[46].Vidailhet B, Robin O, Polo A. 2000.Salivation. *EncyclIMédChir (Paris),Stomatologie et odontologie*.

[47]. Yang T, Pauline S. 2013. La maladie de PARKINSON : Evaluation et pistes de prise en charge logopédique. *Haute ecole de la ville de liege categorie paramedicale* ; pp 8-41.

Site web

[48] <http://didel.script.univ-paris-diderot.fr>

[49] <http://fr.wikipedia.org/wiki/>

[50] <http://histoblog.joueb.com>

[51] <http://sante.lefigaro.fr/sante/seniors/maladie-parkinson/quels-examens-faire>

[52] <http://www.cc-parthenay.fr/parthenay/creparth/chbd/page777.html>

[53] <http://www.chups.jussieu.fr/polys/>

[54]<http://www.planetesante.ch/Mag-sante/Actu/Maladie-de-Parkinson-la-depister-a-partir-des-glandes-salivaires>

[55] <http://www.vulgaris-medical.com/>

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
- Bis acrylamide 2% 0,3ml
- Eau permutée 10,2ml
- Tampon Tris-HCL pH 6, 8 1,7ml
- SDS 10% 0,14ml
- APS 1% 0,70ml
- TEMED 0,014ml

Résumé

Au cours de ces dernières années, les maladies neuro-dégénératives ont augmenté d'une manière considérable, y compris la maladie de Parkinson qui est caractérisée par la perte des neurones de la substance noire ainsi que par la diminution de la production de dopamine. Plusieurs protéines salivaires montrent des changements importants dans de nombreuses maladies, et pour montrer ces changements dans la maladie de Parkinson, 47 parkinsoniens (19 femmes et 28 hommes) âgés de 42 ans jusqu'à 80 ans ont été recrutés pour un prélèvement salivaire. Nous avons comparés les profils obtenus par électrophorèse monodimensionnelle des protéines salivaires de sujet sains (2 témoins) et des malades. Les protéines salivaires sont extraites dans deux conditions différentes et séparées par SDS/PAGE.

L'analyse des gels a permis de dénombrer 40 bandes protéiques de mobilités différentes dans les conditions dénaturantes réductrices et 41 bandes protéiques de mobilités différentes dans les conditions dénaturantes non réductrices.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence 22 bandes protéiques d'intérêt communes entre les différents échantillons, B1, B2, B3, B8, B10, B13, B15, B18, B21, B22, B34, B37 (condition dénaturante réductrice) et B7, B8, B16, B20, B21, B23, B29, B32, B34, B39, B41 (condition dénaturante non réductrice), présentant des variations qualitatives et quantitatives d'expression dans le milieu salivaire.

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

Ces résultats préliminaires de mise en évidence de protéines salivaires spécifiques et/ou variantes au cours de la maladie de Parkinson capable d'être considérées comme des marqueurs potentiels de la pathologie étudiée, ouvre de nouveaux champs d'investigation, dans le domaine du diagnostic que dans le suivi de ces pathologies.

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

في السنوات الأخيرة أظهرت الأمراض العصبية تزايدا ملحوظا من بينها مرض الرعاش الذي يتميز بفقدان أعصاب المنطقة الرمادية و أيضا بتراجع إنتاج الدوبامين. الكثير من البروتينات اللعابية تظهر تغير واضح في أمراض مختلفة و من اجل البحث عن هذه التغيرات في مرض الرعاش 47 مريض (19 امرأة و 28 رجل) تتراوح أعمارهم ما بين 42 سنة إلى 80 سنة تم تعيينهم لتحليل اللعاب.

قمنا بمقارنة الأوضاع المتحصل عليها بواسطة الهجرة الكهربائية ذات البعد الواحد من البروتينات اللعابية لأشخاص أصحاء و أشخاص مرضى يعانون من هذا المرض. تم استخراج البروتينات اللعابية في شرطين مختلفين و تم فصلها بواسطة SDS/PAGE. تحليل المواد الهلامية سمح بحساب 40 شريط بروتيني ذوي هجرات مختلفة في شروط طبيعية و مرجعة و 41 شريط بروتيني مع هجرات مختلفة في شروط طبيعية غير مرجعة.

سمحت لنا هذه الدراسة بتحديد 22 شريط بروتيني ذو أهمية مشتركة بين عينات مختلفة B1, B2, B3, B7, B8, B10, B13, B15, B18, B21, B22, B34, B3 في شروط لا طبيعية مرجعية و B16, B20, B21, B23, B29, B32, B34, B39, في شروط لا طبيعية و غير مرجعية. مع وجود اختلافات نوعية و كمية في الوسط اللعابي. لتقييم تنوع هذه البروتينات اللعابية عدديا تم إجراء دراسة إحصائية عن طريق حساب الترددات مؤشر التشابه و أيضا في إنشاء المخططات القياسية و التصنيف الهرمي للأفراد عن طريق تكوين بروتينات اللعاب.

هذه النتائج الأولية تسلط الضوء على البروتينات اللعابية المحددة أو المتغيرة في مرض الرعاش و التي تعتبر كمؤشرات حيوية للمرض المدروس و تفتح نطاقات جديدة للبحث في مجال التشخيص و في تتبع هذه الأمراض.

الكلمات المفتاحية : الرعاش، ، اللعاب، مؤشرات حيوية، تشخيص، الهجرة الكهربائية

Summary

In recent years, neuro-degenerative diseases have increased to a considerable degree, including the Parkinson's disease which is characterized by the loss of neurons in the substantia nigra as well as by the decrease in dopamine production. Several salivary proteins showed significant changes in many diseases, and to show these changes in Parkinson's disease, 47 PD (19 women and 28 men) aged 42 years until age 80 were recruited for a saliva sample. We compared the profiles obtained by one-dimensional electrophoresis of salivary proteins of healthy subject (2 LEDs) and patients. Salivary proteins are extracted in two different conditions and separated by SDS/PAGE.

The analysis of the gels was allowed to count 40 protein bands of different mobility in denaturing reductive conditions and 41 protein bands of different mobilities in the denaturing non-reductive conditions.

This study allowed us to identify 22 common bands protein of interest between the different samples, B1, B2, B3, B8, B10, B13, B15, B18, B21, B22, B34, B37 (reducing denaturing conditions) and B7, B8, B16, B20, B21, B23, B29, B32, B34, B39, B41 (non-reducing denaturing conditions), with qualitative and quantitative changes of expression in the salivary medium.

In order to assess numerically the diversity of these salivary proteins, a statistical study was performed by calculating the frequencies, the index of similarity, also by establishing a hierarchical classification of individuals according to the composition of salivary proteins.

These preliminary results of highlighted of salivary proteins and specific or variant in the course of Parkinson's disease to be regarded as markers of pathology studied, opens fields of investigation new both in the field of diagnosis that in the follow-up of these pathology.

Key words: Parkinson's disease, , saliva, biomarkers, diagnostics, electrophoresis.

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie

Option: Analyse Protéomique et Santé

Thème : Recherche préliminaire de biomarqueurs dans la salive des parkinsoniens par application des techniques d'électrophorèse

Résumé:

Au cours de ces dernières années, les maladies neuro-dégénératives ont augmenté d'une manière considérable, y compris la maladie de Parkinson qui est caractérisée par la perte des neurones de la substance noire ainsi que par la diminution de la production de dopamine. Plusieurs protéines salivaires montrent des changements importants dans de nombreuses maladies, et pour montrer ces changements dans la maladie de Parkinson, 47 parkinsoniens (19 femmes et 28 hommes) âgés de 42 ans jusqu'à 80 ans ont été recrutés pour un prélèvement salivaire. Nous avons comparés les profils obtenus par électrophorèse monodimensionnelle des protéines salivaires de sujet sains (2 témoins) et des malades. Les protéines salivaires sont extraites dans deux conditions différentes et séparées par SDS/PAGE.

L'analyse des gels a permis de dénombrer 40 bandes protéiques de mobilités différentes dans les conditions dénaturantes réductrices et 41 bandes protéiques de mobilités différentes dans les conditions dénaturantes non réductrices.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence 22 bandes protéiques d'intérêt communes entre les différents échantillons, B1, B2, B3, B8,B10, B13, B15, B18, B21, B22, B34, B37 (condition dénaturante réductrice) et B7,B8, B16, B20, B21, B23,B29, B32, B34, B39, B41 (condition dénaturante non réductrice), présentant des variations qualitatives et quantitatives d'expression dans le milieu salivaire.

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

Ces résultats préliminaires de mise en évidence de protéines salivaires spécifiques et/ou variantes au cours de la maladie de Parkinson capable d'être considérées comme des marqueurs potentiels de la pathologie étudiée, ouvre de nouveaux champs d'investigation, dans le domaine du diagnostic que dans le suivi de ces pathologies.

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

Devant le jury :

Président du jury : KHELIFI Douadi (Professeur- UFM Constantine).

Rapporteur : BELLIL Inès (Maitre de Conférences- UFM Constantine).

Examineur : BENHAMDI Asma (Maitre Assistante- UFM Constantine).

