



HAL
open science

Etudes in vitro et in vivo de l'effet neuroprotecteur d'un peptide dérivé de la sélénoprotéine T, le PSELT, dans un modèle de la maladie de Parkinson.

Ifat Alsharif

► To cite this version:

Ifat Alsharif. Etudes in vitro et in vivo de l'effet neuroprotecteur d'un peptide dérivé de la sélénoprotéine T, le PSELT, dans un modèle de la maladie de Parkinson.. Neurobiologie. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMR010 . tel-02113168v1

HAL Id: tel-02113168

<https://theses.hal.science/tel-02113168v1>

Submitted on 28 Apr 2019 (v1), last revised 30 Apr 2019 (v2)

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Préparée au sein de l'Université de Rouen

Etude *in vitro* et *in vivo* de l'effet neuroprotecteur d'un peptide dérivé de la sélénoprotéine T, le PSELT, dans un modèle de la maladie de Parkinson

**Présentée et soutenue par
Ifat ALSHARIF**

**Thèse soutenue publiquement le 27 avril 2018
devant le jury composé de**

Marie-Hélène METZ-BOUTIGUE	Directrice de Recherche, Inserm U1121, Strasbourg	Rapporteur
Mohamed NAJIMI	Professeur, Université de Beni Mellal	Rapporteur
Fatiha CHIGR	Professeur, Université de Beni Mellal	Examineur
David MALTETE	PUPH, CHU Rouen	Examineur
Nicolas CHARTREL	Directeur de Recherche, Inserm U1239, Rouen	Examineur
Youssef ANOUAR	Directeur de Recherche, Inserm U1239, Rouen	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Youssef ANOUAR, Inserm U1239, Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine



SOMMAIRE

Avant-Propos.....	5
PRODUCTION SCIENTIFIQUE	9
RESUME	11
RESUME LONG.....	12
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX.....	15
LIST DES ABREVIATION.....	17
INTRODUCTION.....	19
I. La maladie de Parkinson.....	20
I.1 Définition et historique de la maladie de Parkinson.....	20
I.2. Physiopathologie de la maladie de Parkinson	22
I.3. Etiologie de la maladie de Parkinson.....	24
I.4. Les symptômes cliniques de la maladie de Parkinson	30
I.5. Les traitements de la maladie de Parkinson	32
II. Stress oxydatif et sélénoprotéines.....	45
II.1. Définition du stress oxydatif.....	45
II.2. Les radicaux libres	45
II.3. Les radicaux libres et les pathologies neurodégénératives.....	48
II.4. Les antioxydants cellulaires.....	50
II.5. Les sélénoprotéines dans la défense antioxydante.....	52
II.6. Le sélénoprotéome.....	57
II.7. Implications des sélénoprotéines dans les mécanismes de survie cellulaire: rôles dans la protection et la réparation des dommages relatifs au stress oxydatif.....	60
II.8. Rôles des sélénoprotéines dans le SNC.....	62
III. Identification et caractérisation d'une nouvelle sélénoprotéine essentielle: la sélénoprotéine T (SelT)	65
III.1. Découverte et structure.....	65
III.2. Expression de la SelT.....	67
III.3. Fonction de la SelT	68
Objectif de la thèse.....	73
MATERIELS & METHODES	75
1. Synthèse peptidique.....	76
2. Études in vitro	76
2.1. Traitement des cellules et mesure de la viabilité cellulaire.....	76
2.2. Mesure des niveaux de radicaux libres	78
3. Études in vivo	78
3.1 Animaux.....	78
3.2. Administration du PSELT.....	79
3.3 Traitements par le MPTP	79
3.3.1. Protocole expérimental n° = 1	80
3.3.2 Protocole expérimental n° = 2	81

3.3 Tests de comportement.....	81
3.3.1 Évaluation de l'activité motrice globale : Actimétrie «Open field».....	81
3.3.2. Évaluation de la coordination motrice par Le rotarod.....	82
4. Immunohistochimie.....	83
5. Western blot.....	84
5.1. Préparation et dosage des protéines.....	84
5.2. Migration et séparation.....	84
5.3. Transfert des protéines.....	84
5.4. Immunodétection des protéines d'intérêt.....	84
6. Dosage de la dopamine.....	85
7. Analyse statistique.....	85
RESULTATS.....	87
1. Effet protecteur du PSELT sur les cellules de neuroblastome SH-SY5Y contre la dégénérescence cellulaire induite par le MPP ⁺ <i>in vitro</i>	88
2. Le peptide PSELT diminue le taux des radicaux libres dans les cellules de neuroblastome traitées par le MPP ⁺	89
3. Effet inhibiteur du peptide PSELT sur l'activité caspase-3/7 dans les cellules de neuroblastome SH-SY5Y traitées par le MPP ⁺	90
4. Étude de la capacité du peptide PSELT à atteindre le système nigro-strié <i>in vivo</i> après administration par voie intranasale.....	90
5. Étude de l'effet du peptide PSELT sur la dégénérescence dopaminergique induite par le MPTP.....	91
6. Effet du PSELT sur le taux de la TH dans le striatum de souris traitées par le MPTP.....	92
7. Effet du peptide PSELT sur les niveaux de caspase 3 dans le modèle de la maladie de Parkinson chez la souris.....	93
8. Effet du PSELT sur les niveaux de dopamine dans le striatum.....	95
9. Évaluation de l'effet du PSELT <i>in vivo</i> par actimétrie: Protocole expérimental n° = 1.....	95
a. Activité horizontale.....	96
b. Activité verticale.....	97
c. Distance totale.....	99
d. Temps d'immobilité.....	101
10. Évaluation de l'effet du PSELT par actimétrie dans le modèle de la MP chez la souris: protocole expérimental n° = 2.....	103
a. Activité horizontale.....	103
b. Activité verticale.....	105
c. Distance totale.....	107
d. Temps d'immobilité.....	109
11. Évaluation de l'effet de PSELT sur la coordination motrice.....	111
DISCUSSION.....	113
CONCLUSION & PERSPECTIVE.....	123
REFERENCES.....	125
ANNEXES.....	159

A mes parents,

A mon Mari chéri,

A mes enfants,

Avant-Propos

Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein du laboratoire de «Différenciation et de Communication Neuronale et Neuroendocrine», DC2N-INSERM Unité 1239, dirigé par le Docteur Youssef ANOUAR, dans l'équipe 1 «Génomique fonctionnelle et physiopathologie neuronale et neuroendocrine ».

Je tiens tout particulièrement à remercier le Docteur ***Youssef ANOUAR***, mon directeur de thèse de m'avoir donné la chance de travailler avec lui. Vous m'avez dirigé avec patience, précision et pédagogie, Je vous en suis infiniment reconnaissant.

Je tiens à lui témoigner ici toute ma gratitude pour la confiance qu'il m'a accordée, ses encouragements et ses conseils qui m'ont poussé à continuer dans la voie de la recherche et de l'excellence scientifique. Alors merci infiniment de ta confiance, de ton encadrement, et du partage de ta patience pour la recherche.

Malgré un emploi du temps souvent très chargé, je te remercie chaleureusement du temps que tu as passé à me former et à faire de moi le chercheur que je suis aujourd'hui. Enfin, je te remercie d'avoir été présent de mon premier jour de thèse jusqu'à ce jour.

Je souhaite également dire toute ma reconnaissance à ***Loubna BOUKHZAR***, Ingénieur d'Etude à l'Université de Rouen.

Tu as été comme ma sœur. Tu m'as donné des conseils précieux pour la thèse et pour les expériences. Tu as toujours été disponible pour répondre à mes questions et m'éclairer quand j'en avais besoin. Tu as toujours été près de moi.

Je tiens à te remercier chaleureusement, pour le soutien, les conseils et l'amitié que tu m'as accordés, et encore remercier pour les nombreuses heures passées ensemble.

Ces moments de travail, de joie, de rire, resteront longtemps dans ma mémoire.

Je suis très fière de travailler avec toi. Je ne pourrai jamais te remercier autant que tu le mérites.

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse. Le Docteur **Marie-Hélène METZ-BOUTIGUE**, Directeur de Recherche, Inserm U1121, Strasbourg, de me faire l'honneur d'accepter de juger mon travail de thèse en tant que rapporteur. Je vous suis reconnaissante de l'intérêt que vous portez à nos thématiques de recherche.

Je suis également très reconnaissante envers Le Professeur **Mohamed NAJIMI**, Professeur des universités à l'Université de Beni Mellal, d'avoir également accepté d'être rapporteur de ma thèse. Je l'en remercie très sincèrement.

Je tiens également à témoigner toute ma gratitude envers le Professeur **Fatiha CHIGR**, Professeur des universités à l'Université de Beni Mellal, d'avoir gentiment accepté de siéger dans mon jury de thèse. J'apprécie pleinement la chance que j'ai de vous avoir en face de moi aujourd'hui.

Le Professeur **David MALTETE**, Chef du service de neurologie au CHU de Rouen, a bien voulu examiner ces travaux. Je lui signifie toute ma reconnaissance pour cet honneur.

Le Docteur **Nicolas CHARTREL**, Directeur de Recherche, Inserm U1239 à l'Université de Rouen, me fait également l'honneur d'être examinateur de ce travail. Je tiens à le remercier également.

Je remercie tous les personnels du laboratoire DC2N unité INSERM U1239.

Un remerciement spécial à tous les membres de l'équipe 1 « Génomique fonctionnelle et physiopathologie neuronale et neuroendocrine »

*Je tiens tout particulièrement à remercier le Docteur **Jean-Claude do Rego**
et **Jean-Luc do Rego***

Service Commun d'Analyse Comportementale (SCAC) de l'Université de Rouen pour leurs conseils et tout ce qu'il m'ont apporté pour la réalisation des tests de comportements

Et à tous ceux qui ne liront que les remerciements

Un grand merci à mes parents, sans lesquels je ne serai pas arrivée jusque-là aujourd'hui

Je remercie chaleureusement mon Mari chéri pour la grande patience, l'encouragement et la confiance et pour son soutien moral ininterrompu

*Merci à mes enfants (ma vie) qui ont eu la patience de supporter mon absence
Spécialement à mon petit ange Omar*

Merci à mes frères et mes sœurs pour leur soutien inébranlable tout au long de mon parcours

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Publications:

- Carmine R, Boukhzar L, Granieri MC, **Alsharif I**, Mazza R, Lefranc B, Tota B, Leprince J, Cerra MC, Anouar Y and Angelone T. Selenoprotein T-derived peptide protects the heart against ischemia/reperfusion injury through inhibition of apoptosis and oxidative stress. *Acta physiologica*, 2018 (in press) (IF : 4,867).
- Boukhzar L, Hamieh A, Cartier D, Tanguy Y, **Alsharif I**, Castex M, Arabo A, El Hajji S, Bonnet JJ, Errami M, Falluel-Morel A, Chagraoui A, Lihrmann I and Anouar Y. Selenoprotein T exerts an essential oxidoreductase activity that protects dopaminergic neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*. 24 : 557–74, 2016 (IF: 7,4)
- Manecka, D.L., Abid, H., Boukhzar, L., **Alsharif, I.**, Lihrmann, I. and Anouar, Y. PACAP signaling for neuroprotection. In *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide*, D. Reglodi, A. Tamas (eds.). Springer, pp. 549-561, 2015 (Chapitre de livre).

Présentations orales:

- Boukhzar L, Hamieh A, Cartier D, Tanguy Y, **Alsharif I**, Castex M, Arabo A, El Hajji S, Bonnet JJ, Errami M, Falluel-Morel A, Chagraoui A, Lihrmann I and Anouar Y. (2014) “Neuroprotective role of selenoprotein T in Parkinson’s disease. 14^{ème} journée scientifique de LARC neurosciences, Caen, France

Présentations affichées:

- Boukhzar L, Hamieh A, Cartier D, Tanguy Y, **Alsharif I**, Castex M, El Hajji S, Bonnet JJ, , Errami M, Falluel-morel A, Chagraoui A, Lihrmann I, and Anouar Y. Selenoprotein T Exerts an Essential Oxidoreductase Activity That Protects Dopaminergic Neurons in Mouse Models of Parkinson's Disease.(Septembre 2015) 12th Symposium on VIP, PACAP and related peptides. Cappadocia, Turquie. (Poster)
- **Alsharif I**, Boukhzar L, Manecka, D, Lefranc B, Leprince J et Anouar Y. Rôle neuroprotecteur d’un peptide dérive de la sélénoprotéine T, une enzyme antioxydante stimulée par le PACAP, dans la maladie de Parkinson (Octobre 2016). 41ème colloque de la société de neuroendocrinologie, Corte, France.(Poster)

- **Alsharif I**, Boukhzar L, Manecka, D, Lefranc B, Leprince J et Anouar Y. Rôle neuroprotecteur d'un peptide dérive de la sélénoprotéine T, une enzyme antioxydante stimulée par le PACAP, dans la maladie de Parkinson (Octobre 2016), International Neuro and Spine Congress. Dubaï, Émirats arabes unis.

RESUME

Les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington sont des pathologies progressives qui affectent le système nerveux, conduisant à la mort de certaines cellules nerveuses. Toutes ces maladies se caractérisent par la perte progressive de neurones dans des régions plus ou moins localisées du système nerveux, entraînant des complications cognitives, motrices ou perceptives. La MP est caractérisée par une dégénérescence sélective et progressive des neurones dopaminergiques situés dans la substance noire pars compacta (SNc), et de leurs terminaisons nerveuses qui normalement libèrent la dopamine dans le striatum. Bien que les causes exactes de la MP soient inconnues, de nombreuses études ont démontré le rôle important du stress oxydatif dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques. D'ailleurs, un niveau élevé de radicaux libres est observé dans le cerveau de patients post-mortem. Ces observations suggèrent que les protéines qui jouent un rôle dans la protection des neurones contre les effets du stress oxydatif peuvent représenter des cibles thérapeutiques intéressantes. En effet, pour maintenir l'équilibre d'oxydo-réduction, les cellules recrutent plusieurs enzymes réductrices dont des membres de la famille des sélénoprotéines. Des résultats obtenus dans notre laboratoire ont montré que la sélénoprotéine T (SelT), une nouvelle sélénoprotéine identifiée dans les cellules nerveuses dans notre laboratoire, est fortement exprimée dans les conditions de dégénérescence des neurones suite à un stress oxydant, et exerce un rôle neuroprotecteur. Ce rôle est assuré par son site actif contenant une cystéine et une sélénocystéine. Le but de ce travail de thèse était de valider l'utilisation d'un peptide nommé PSELT contenant le cœur actif de la SelT en tant que traitement neuroprotecteur dans la MP. Le traitement des cellules de neuroblastome SH-SY5Y par le peptide PSELT réduit significativement les niveaux des radicaux libres et stimule la survie cellulaire en inhibant l'apoptose. Le PSELT semble traverser la membrane plasmique pour exercer son effet. *In vivo*, l'administration intranasale du PSELT protège les neurones et les fibres dopaminergiques dans un modèle de la MP chez la souris traitée par le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP). Le peptide PSELT augmente le taux de la tyrosine hydroxylase et inhibe l'apoptose, ce qui aboutit à une amélioration des troubles moteurs induits par le MPTP chez les animaux. L'ensemble de ces résultats montrent pour la première fois qu'un peptide issu de la SelT, le PSELT, est capable de protéger les neurones dopaminergiques *in vitro* et *in vivo* et d'améliorer l'activité motrice des animaux modèles de la MP, ouvrant la voie au développement d'une nouvelle thérapie de neuroprotection pour la MP.

RESUME LONG

La maladie de Parkinson (MP) est caractérisée par la dégénérescence des neurones dopaminergiques situés dans la substance noire pars compacta (SNc) au sein des noyaux gris centraux du système nerveux central. Les cause exactes conduisant à la MP sont inconnus, mais de nombreuses études ont démontré le rôle important du stress oxydatif dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques. Ces neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée sont très vulnérables à la dégénérescence à cause des propriétés intrinsèques de ces neurones.

Bien que la séquence des événements délétères conduisant à la mort cellulaire n'est pas claire, il existe de nombreux arguments impliquant le stress oxydant : i) ces neurones seraient dans un état basal de stress oxydant lié à une production élevée de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) au cours du métabolisme de la dopamine, soit par auto-oxydation, soit par la réaction catalysée par la monoamine oxydase B, et ii) ces neurones présentent une concentration plus faible d'antioxydants comme le glutathion et une expression basse de plusieurs enzymes antioxydantes avec pour conséquence directe, un seuil de sensibilité plus bas en cas d'augmentation de la concentration des radicaux libres. L'examen de cerveaux post mortem de patients décédées de la MP a d'ailleurs révélé une élévation des marqueurs du stress oxydant, et l'accumulation de fer. Cette accumulation de fer favorise également des réactions d'oxydation anormales des composants cellulaires.

Un dysfonctionnement mitochondrial est corrélé avec une augmentation des niveaux de stress oxydant. Par conséquent, le dysfonctionnement mitochondrial et le stress oxydant sont considérés comme des causes majeures de la dégénérescence des neurones dopaminergiques. En effet, dans la MP, les enzymes de détoxification et les agents réducteurs sont incapables de maintenir les niveaux des ROS intracellulaires à un niveau homéostatique, conduisant à la mort cellulaire. Pour maintenir l'équilibre d'oxydo-réduction, les cellules recrutent plusieurs enzymes réductrices dont des membres de la famille des sélénoprotéines, qui incorporent l'atome de sélénium au sein du résidu de sélénocystéine (Sec), le 21ème acide aminé naturel. Des sélénoprotéines comme les glutathion peroxydases ou les thiorédoxine réductases jouent un rôle important dans la survie et l'homéostasie cellulaire, et un rôle antioxydant important.

Ces enzymes exercent des activités antioxydantes via un domaine catalytique englobant un résidu Sec, qui régulent diverses fonctions cellulaires, y compris l'équilibre redox, le repliement des protéines ou l'homéostasie du Ca^{2+} , des processus connus pour être dérégulés dans les maladies neurodégénératives, en particulier la MP.

Afin de découvrir de nouveaux facteurs neuroprotecteurs pertinents pour les pathologies neurodégénératives, y compris la MP, les chercheurs de notre laboratoire ont identifié grâce à un crible pangénomique la sélénoprotéine T (SelT), une sélénoprotéine de fonction inconnue, comme étant un gène régulé par le facteur neurotrophique pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) dans les cellules catécholaminergiques PC12. La SelT contient un repliement de type thiorédoxine englobant le résidu Sec dans un domaine catalytique putatif. Les premières études réalisées dans notre laboratoire ont permis de montrer que la SelT est localisée dans le réticulum endoplasmique et qu'elle est impliquée dans la régulation de l'homéostasie calcique dans les cellules neuroendocrines en culture. Le gène de la SelT est robustement et largement exprimé au cours de l'embryogenèse, mais décline dans la plupart des tissus après la naissance, y compris dans le cerveau. Cependant, sa stimulation dans les cellules PC12 par le PACAP qui exerce de puissantes actions neuroprotectrices et antioxydantes et son implication potentielle dans le contrôle de l'homéostasie redox suggèraient que cette nouvelle sélénoprotéine pourrait exercer une activité oxydoréductase qui protégerait les neurones sensibles à l'oxydation tels que les neurones dopaminergiques, notamment dans des conditions physiopathologiques lors de la MP.

Les travaux antérieurs de l'Unité ont également permis de montrer que la SelT exerce un effet protecteur dans les neurones dopaminergiques suite à un stress oxydatif intense dans un modèle de la MP. La SelT augmente la résistance au stress oxydatif, augmente l'activité de la tyrosine hydroxylase et la concentration de dopamine, et promeut la survie des neurones dopaminergiques.

Ces données suggèraient que la SelT pourrait représenter une cible thérapeutique pour le traitement de la MP. Afin de contourner les difficultés liées à l'utilisation d'une protéine recombinante en thérapie ciblée, nous avons utilisé un peptide de synthèse de 10 acides aminés renfermant le cœur actif de la SelT, *i.e.* le motif CVSU où U étant le résidu Sec. Nous avons tout d'abord montré que le peptide PSELT est capable de protéger les cellules de neuroblastome SH-SY5Y contre la mort cellulaire induite par la neurotoxine MPP⁺. Nous avons ensuite produit une forme fluorescente du peptide PSELT couplé au fluorochrome dansyl qui a révélé que le peptide PSELT pénètre dans les cellules de neuroblastome, indiquant que le peptide PSELT exerce son activité à l'intérieur des cellules. Dans ce modèle *in vitro*, nous avons aussi montré que le peptide PSELT protège les cellules contre le stress oxydatif induit par le MPP⁺. Un effet est également observé au niveau de l'inhibition de l'apoptose puisque le peptide PSELT inhibe l'activité des caspases 3/7 induite par le MPP⁺ dans les cellules SH-SY5Y.

Ces résultats encourageants obtenus *in vitro* nous ont incités à rechercher d'éventuels effets du peptide PSELT dans des modèles *in vivo* de la MP. Dans un premier temps, l'utilisation d'un peptide PSELT couplé à un peptide TAT, nous a permis de montrer que le peptide PSELT pouvait atteindre la SNc et le striatum après administration intranasale.

En revanche, au niveau de l'immunohistochimie et western blot nous avons observé que l'administration intranasale de PSELT est capable de protéger les neurones et les fibres dopaminergiques contre les effets neurotoxiques du MPTP, qu'entraîne une dégénérescence au niveau de la SNc et du striatum. Nous avons confirmé ces résultats, au niveaux de caspase 3.

Dans d'autre part, nous avons montré que le PSELT inhibiteur les troubles moteurs dans les modèles de la maladie de Parkinson chez la souris en utilisant différents tests du comportement. L'ensemble des résultats obtenus lors de la préparation de cette thèse a permis de révéler l'existence un peptide dérivé du cœur actif de la SelT qui pourrait mimer l'activité de cette enzyme en exerçant un effet neuroprotecteur contre la dégénérescence induite par des neurotoxines mimant la maladie de Parkinson. L'effet protecteur du PSELT se traduit par une inhibition du stress oxydant et le maintien de l'activité de la TH et d'un taux de dopamine élevé comme révélé par les expériences *in vitro* et *in vivo*. Ces données démontrent que des sélénoprotéine comme la SelT peuvent jouer un rôle très important dans le fonctionnement et la protection des neurones dopaminergiques, ouvrant ainsi la voie à la mise au point de nouvelles application thérapeutiques ciblant les mécanismes de la neurodégénérescence dans la maladie de Parkinson.

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

FIGURE 1.....	22
FIGURE 2.....	23
FIGURE 3.....	24
FIGURE 4.....	25
FIGURE 5.....	26
FIGURE 6.....	28
FIGURE 7.....	33
FIGURE 8.....	34
FIGURE 9.....	35
FIGURE 10.....	36
FIGURE 11.....	38
FIGURE 12.....	40
FIGURE 13.....	40
FIGURE 14.....	44
FIGURE 15.....	46
FIGURE 16.....	47
FIGURE 17.....	50
FIGURE 18.....	51
FIGURE 19.....	52
FIGURE 20.....	56
FIGURE 21.....	57
FIGURE 22.....	61
FIGURE 23.....	66
FIGURE 24.....	67
FIGURE 25.....	68
FIGURE 26.	69
FIGURE 27.....	70
FIGURE 28.....	71
FIGURE 29.	77
FIGURE 30.....	77
FIGURE 31.....	78

FIGURE 32.....	79
FIGURE 33.....	79
FIGURE 34.....	80
FIGURE 35.....	81
FIGURE 36.....	82
FIGURE 37.	83
FIGURE 38.....	88
FIGURE 39.....	89
FIGURE 40.....	90
FIGURE 41.....	91
FIGURE 42.....	92
FIGURE 43.....	93
FIGURE 44.....	94
FIGURE 45.....	95
FIGURE 46.....	97
FIGURE 47.....	98
FIGURE 48.....	100
FIGURE 49.....	102
FIGURE 50.....	104
FIGURE 51.....	106
FIGURE 52.....	108
FIGURE 53.....	110
FIGURE 54.....	111
TABLEAU 1.....	54
TABLEAU 2.....	58
TABLEAU 3.....	85

LISTE DES ABREVIATIONS

- 6-OHDA** : 6-hydroxydopamine
- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- ARN** : Acide ribonucléique
- ARNm** : Acide ribonucléique messenger
- ARNt** : Acide ribonucléique de transfert
- ATP** : Adénosine triphosphate
- BHE** : Barrière hématoencéphalique
- CL** : Corps de Lewy
- COMT** : Catéchol-o-méthyltransférase
- Cys** : Cystéine
- DA** : Dopamine
- DAT** : Transporteur de la dopamine
- DRO** : Dérivés réactifs de l'oxygène
- GFAP** : Glial fibrillary acidic protein
- GILC** : Gel Intestinal de lévodopa carbidopa
- Gpi** : le globus pallidus interne
- GPx** : Glutathion peroxydase
- IDDP** : Inhibiteurs de la dopa décarboxylase périphérique
- IHC ou ICC** : Immunohisto(cyto)-chimie
- Maneb** : Mn-ethylene-1,2-bisdithiocarbamate
- MAOB** : Monoamine oxydase B
- MP** : Maladie de Parkinson
- MPDP⁺** : 1-méthyl-4-phényl-2,3-dihydropyridinium
- MPP⁺** : 1-méthyl-4-phénylpyridinium
- MPTP** : 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
- NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
- Nes-Cre** : Lignée murine nestine-cre
- NST** : Noyau sous-thalamique
- Paraquat** : 1,1'-diméthyl-4,4'-bipyridinium dichlorure
- PFA** : Paraformaldéhyde
- ROS** : Espèces réactives d'oxygène
- SCP** : Stimulation cérébrale profonde

Se : Sélénium

Sec : Sélénocystéine

SECIS: *Selenocysteine insertion sequence*

SecS : Sec synthase

Sel : Sélénoprotéine

SelT : Sélénoprotéine T

Ser : Sérine

STN : Le noyau subthalamique

TH : Tyrosine hydroxylase

TrxR: Thiorédxine réductase

INTRODUCTION

I. La maladie de Parkinson

I.1. Définition et historique de la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson (MP) fait partie des maladies neurodégénératives progressives qui affectent le système nerveux central (SNC), entraînant la mort des cellules nerveuses. Les plus connues et les plus fréquentes sont la maladie d'Alzheimer (MA) et la MP, mais il en existe d'autres. Toutes ces maladies se caractérisent par la perte progressive de neurones dans des régions plus ou moins localisées du système nerveux, entraînant des complications cognitives, motrices ou perceptives. À terme, elles peuvent conduire au décès des patients. Les maladies neurodégénératives comme la MA et la MP partagent plusieurs caractéristiques communes. Il s'agit de protéinopathies, à savoir des pathologies associées à des protéines mutées, surexprimées ou anormalement repliées. Le stress oxydant étant identifié comme facteur principal de la formation et l'accumulation de ces agrégats toxiques à l'intérieur des neurones, comme les corps de Lewy qui correspondent à des enchevêtrements neurofibrillaires et des inclusions cytoplasmiques ubiquitine-positives, ou à l'extérieur des neurones comme les plaques amyloïdes. Ces agrégats forment les principales caractéristiques neuropathologiques de ces maladies (Cummings, 2003). Les protéines nocives impliquées contribuent au développement d'une série de perturbations dans les régions vulnérables du cerveau comme l'augmentation du stress oxydant, des désordres immunologiques et des déficits de transmission synaptique, qui conduira éventuellement à la mort neuronale (Uversky et al, 2009). Les deux principaux facteurs de risque communs aux maladies neurodégénératives sont l'âge et le stress oxydant; et il est admis qu'avec le vieillissement des populations, le nombre d'individus susceptibles de développer une maladie neurodégénérative augmentera exponentiellement dans les prochaines années (Cummings, 2003; Niccoli et Partridge, 2012).

L'origine de la découverte de la MP revient au médecin anglais Sir James Parkinson, membre du Collège Royal des Chirurgiens qui a publié un ouvrage en 1817 intitulé "*An Essay on the Shaking Palsy*", dans lequel il a défini la MP comme «*paralysie agitante*» et plus en détail comme «*mouvement trémulant involontaire, associé à une diminution de la force musculaire, survenant dans les parties du corps au repos (not in action), avec une propension à courber le tronc en avant et à passer de la marche au pas de course, les sens et l'intellect restant intacts*» (Parkinson, 1817). Le médecin anglais était le premier à décrire de manière magistrale le début insidieux de la maladie même s'il a signalé brièvement dans son ouvrage que déjà Galien (129-199) pendant le II^e siècle après J.C, et aussi Franciscus de la Boë (1614-

1672) avaient observé le tremblement caractéristique de l'affection. Le travail de James Parkinson sur «la paralysie agitante», n'eut pas immédiatement la retombée scientifique que méritaient la valeur de l'œuvre et la personnalité de l'auteur. L'ouvrage devait rester méconnu pendant près de 50 ans, comme expliqué par Charcot en 1877, dans ses fameuses «Leçons sur les Maladies du Système Nerveux: *La paralysie agitante et la sclérose en plaques disséminées sont restées jusqu'à ce jour confondues sous une même rubrique, bien qu'elles soient, à tous égards, parfaitement indépendantes l'une de l'autre*». Considéré comme le père de la neurologie clinique, Jean Martin Charcot (1825-1893) qui, en étudiant les tremblements et la paralysie propose le nom de la MP en 1872, en mémoire aux travaux réalisés par James Parkinson sur le sujet (Charcot, 1872). Après Charcot, William Gowers en 1880 a consacré une importante étude à la démographie de la MP dans son ouvrage «*Manual of Diseases of the nervous system*» dans lequel il a décrit son expérience personnelle avec 80 patients. Il a ainsi correctement identifié la légère prédominance masculine et décrit les déformations articulaires typiques de la maladie. Gowers a offert une des comparaisons les plus précises concernant les tremblements de type MP (Gowers, 1893). Malgré ceci, Gowers ne consacrait qu'une vingtaine de pages à cette maladie, et ce n'est qu'après l'épidémie d'encéphalite léthargique que le troisième maître symptôme, l'akinésie, fut reconnu par Wilson en 1929, et ainsi séparé formellement de l'hypertonie (Wilson, 1929). Aujourd'hui, il est estimé que la MP affecte environ 4,3 millions de personnes dans le monde, et que ce nombre devrait malheureusement doubler d'ici 2030 (Dorsey et al., 2007). La vaste majorité des personnes atteintes sont âgées de 50 à 80 ans (Beaudet et al., 2010) et l'âge moyen d'apparition des premiers symptômes de la maladie varie généralement entre 55,3 et 62,8 ans avec légèrement plus d'hommes que de femmes atteints (Elbaz et al., 2002), et un ratio homme : femme d'environ 1,43 (Roos et al., 1996). Dans de rares cas représentant 5 à 10% des personnes atteintes et décrits sous le terme «*early onset Parkinson's disease*», la MP peut aussi débiter avant l'âge de 40 ans (Spica et al., 2013). Certaines différences ont été observées entre les personnes atteintes de la MP avant et après 40 ans (MP précoce vs. classique). Ainsi, dans la MP précoce, une progression plus lente de la maladie, une augmentation de la prévalence de la dépression (Kostic et al., 1994), un taux plus faible de démence (Schrag et al., 1998) et des troubles de la marche moins fréquents (Wickremaratchi et al., 2009) sont observés. Cependant, il existe toujours une controverse à savoir si la MP précoce est un cas particulier de la MP classique qui se manifeste plus tôt ou bien si elle représente une maladie distincte. La MP se caractérise par la mort progressive des neurones dopaminergiques principalement localisés dans la voie nigro-striée, dont le corps

cellulaire est situé dans la substance noire compacte (SNc) et ces projections axonales se terminent dans le striatum (**Figure 1**).

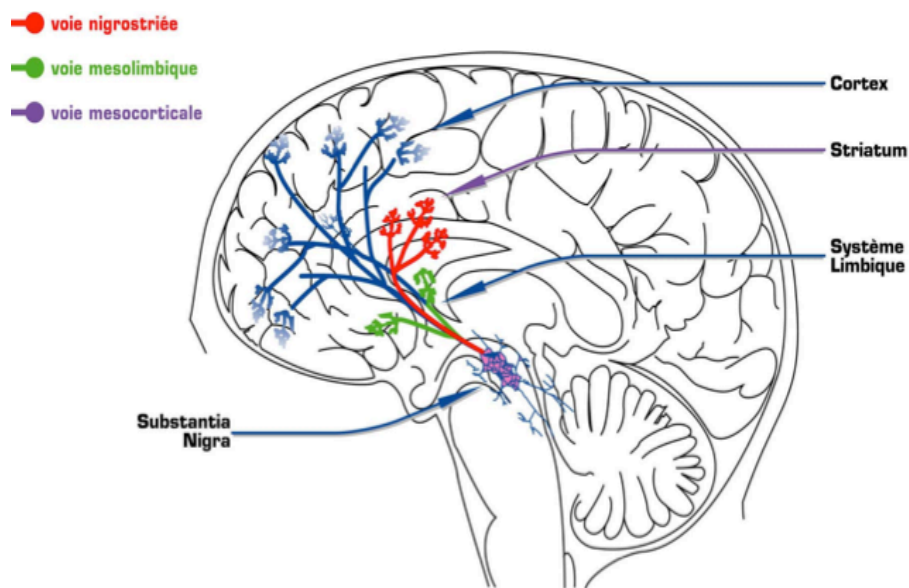


Figure 1. Les voies dopaminergiques du système nerveux central: Les neurones dopaminergiques projettent dans différentes régions du SNC formant ainsi différentes voies dopaminergiques: la voie nigro-striée (rouge), la voie mésolimbique (vert) et la voie mésocorticale (violet).

I.2. Physiopathologie de la maladie de Parkinson

Les mécanismes impliqués dans le processus neurodégénératif de la MP ne sont pas encore clairement établis. Si elle ne constitue pas une maladie génétique au sens propre du terme, son étiologie peut cependant faire intervenir des prédispositions génétiques ainsi qu'une possible toxicité environnementale telle que l'exposition à certains pesticides (Semchuk et al., 1992). L'exception est constituée de quelques formes familiales autosomales dominantes caractérisées par des mutations ponctuelles du gène codant pour l'alpha-synucléine (Polymeropoulos et al., 1997) et des formes autosomales récessives, à début précoce, liées à une mutation du gène de la parkine (Kitada et al., 1998). D'autres mutations ont été identifiées plus récemment pour cette maladie (voir plus loin). Plusieurs études ont montré que les neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée sont plus vulnérables à la neurodégénérescence à cause des propriétés intrinsèques de ces neurones qui seraient dans un état basal de stress oxydant (Richardson et al., 2005) lié à une production élevée de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) au cours du métabolisme de la dopamine, soit par auto-oxydation soit par une réaction enzymatique catalysée par la monoamine oxydase B (MAO-B) (Foley et Riederer, 2000) (**Figure 2**). De plus, ces neurones présentent une faible concentration d'antioxydants comme le glutathion et une expression basse de plusieurs enzymes antioxydantes, avec pour conséquence directe une

sensibilité importante à l'augmentation des DRO (Bharath et al., 2002). Enfin, l'accumulation de fer observée dans les cerveaux de personnes atteintes de la maladie indique que les neurones qui dégénèrent renferment une concentration très importante de fer par rapport à la normale. Cette accumulation de fer favorise des réactions d'oxydation anormales des composants cellulaires (Salazar et al., 2008) (Figure 2).

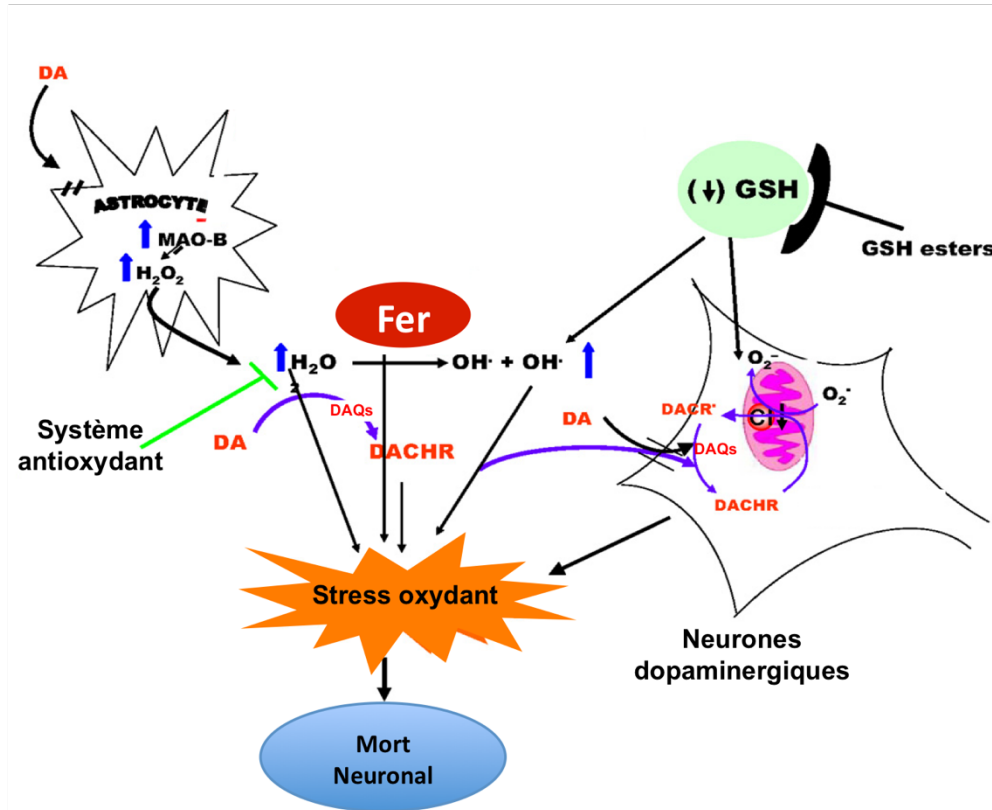


Figure 2. Propriétés intrinsèques des neurones dopaminergiques impliqués dans l'augmentation de la vulnérabilité des neurones dopaminergiques: Les différents processus cellulaires impliqués dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques comme le métabolisme de la dopamine (DA) et l'implication du fer dans des réactions d'oxydo-réduction favorisant la formation du radical hydroxyl (OH). Cette augmentation des radicaux libres aboutit à la formation du o-quinone dopaminochrome (DACHR), le produit de l'oxydation de la dopamine. Tous ces facteurs participent à l'augmentation intracellulaire du stress oxydant.

Enfin, il existe une caractéristique neuropathologique de cette maladie, le corps de Lewy, qui est une inclusion basophile intraneuronale retrouvée dans les régions affectées par le processus dégénératif. Ces inclusions contiennent de l'alpha-synucléine, protéine synaptique anormalement agrégée (synucléinopathie). Malgré les avancées réalisées sur le plan physiopathologique, l'étiologie exacte de la MP est encore peu connue, mais deux catégories de facteurs se discutent: des facteurs environnementaux et des facteurs génétiques

I.3. Etiologie de la maladie de Parkinson

a. Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux ont été fortement suspectés lorsqu'a été mis en évidence à la fin des années 1970 un syndrome parkinsonien d'origine toxique chez des toxicomanes de la côte ouest des Etats-Unis. Ces derniers s'étaient en effet injectés involontairement un produit chimique, le méthyl-phényl-tétrahydropyridine (MPTP) 1-méthyl-4-phényl-1, 2, 3, 6-tétrahydropyridine (**Figure 3**), qui s'est révélé être sélectivement toxique pour les neurones dopaminergiques. Suite à ces observations, des études épidémiologiques ont été réalisées pour rechercher une éventuelle surexposition des patients atteints de la MP à des agents chimiques de structure proche de celle du MPTP, comme certains insecticides et pesticides.

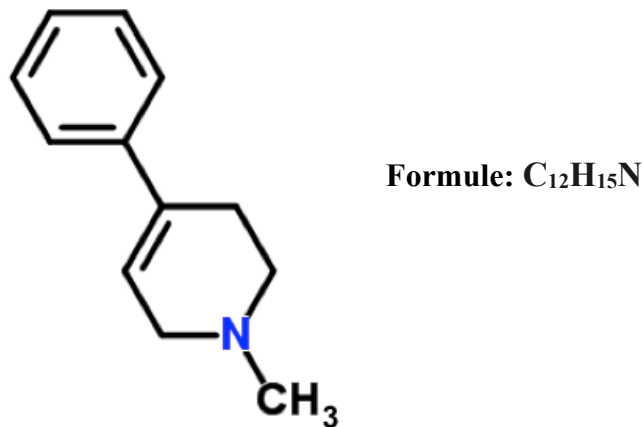


Figure 3. Structure schématique du méthyl-phényl-tétrahydropyridine (MPTP): Cette neurotoxine est responsable de l'apparition d'un syndrome parkinsonien en agissant sur les neurones dopaminergiques.

Des études épidémiologiques ont souligné le risque accru de développer la MP en relation avec l'exposition à des agents toxiques présents dans l'environnement tels que les pesticides, les solvants, les métaux et d'autres polluants atmosphériques. Plusieurs de ces composés provoquent des syndromes parkinsoniens chez l'animal suite à un effet stimulant plus ou moins direct sur les processus neurodégénératifs spécifiques des neurones dopaminergiques (Goldman, 2014). Des avancées fondamentales ont été accomplies dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la MP grâce aux modèles animaux issus de l'administration de toxines. Les premiers modèles expérimentaux ont été développés en utilisant des toxines ciblant spécifiquement les neurones catécholaminergiques, comme le 1-méthyl-4-phényl-1, 2, 3, 6-tétrahydropyridine (MPTP), la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) et les pesticides agricoles comme la roténone.

a.1. Le MPTP

La neurotoxicité du MPTP a été découverte à la suite de l'observation de symptômes majeurs de la MP chez des jeunes toxicomanes utilisateurs d'un stupéfiant opioïde, le MPPP (1-méthyl-4-phényl-4-propionoxypipéridine) contaminé par le MPTP au cours de la synthèse illicite du stupéfiant. Le MPTP hautement lipophile traverse la barrière hémato-encéphalique (BHE) et agit au niveau du cerveau après son métabolisation par la monoamine oxydase dans les cellules gliales en MPP^+ (1-méthyl-4-phénylpyridinium), avant d'être capté sélectivement par le transporteur membranaire de la dopamine au niveau du corps cellulaire des neurones dopaminergiques (Singer et al., 1988). A l'intérieur de ces neurones, le MPP^+ bloque principalement le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (**Figure 4**) (Ramsay et Singer, 1986). Au niveau des mitochondries, l'inhibition de la NADH-coenzyme Q oxidoréductase ou complexe I, ralentit l'utilisation par ce complexe du NADH, donneur d'hydrogène, et du coenzyme Q, receveur d'hydrogène. Le ralentissement de la réduction du coenzyme Q privera le complexe III de son coenzyme donneur d'hydrogène, ce qui va entraîner une inhibition de la réduction du cytochrome C ferrique en cytochrome C ferreux. Les hydrogènes apportés par le complexe II seront les seuls à parvenir au complexe III dans cette circonstance. Le manque de cytochrome C réduit va priver la cytochrome oxydase de son coenzyme donneur d'électrons, et par conséquent cette enzyme utilisera moins d'oxygène, d'où le ralentissement de la respiration.

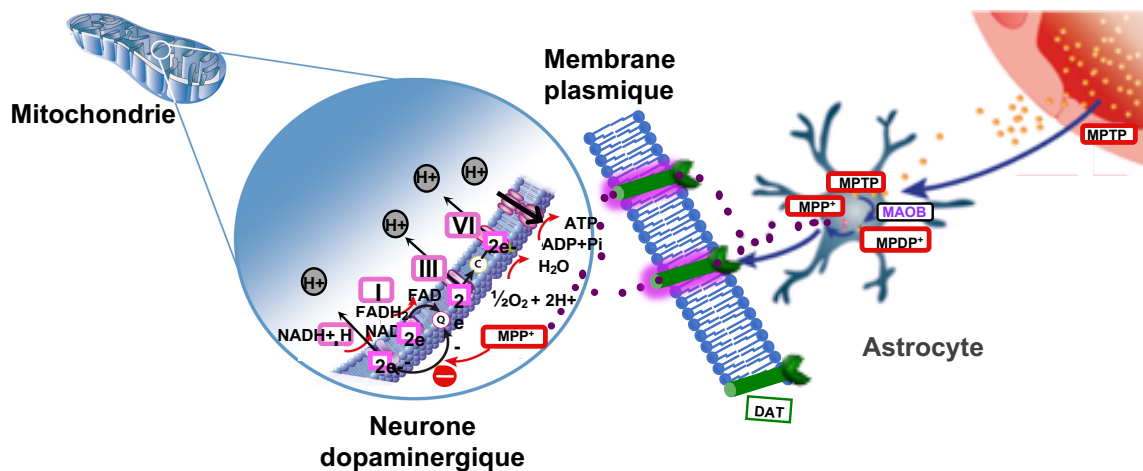


Figure 4. Mécanisme d'action du MPTP dans les neurones dopaminergiques: Le MPTP a la capacité de franchir la BHE, et une fois à l'intérieur du SNC les astrocytes le transforment en 1-méthyl-4-phényl-2,3-dihydropyridinium ($MPDP^+$), puis en MPP^+ . Ce dernier a une forte affinité pour les transporteurs de la dopamine qui vont l'acheminer vers les neurones dopaminergiques. A l'intérieur de ces neurones, le MPP^+ bloque la chaîne de transport d'électrons dans les mitochondries en s'interférant avec le complexe I mitochondrial.

Les complexes I, III et IV étant moins actifs, le pompage des protons est ralenti, puisque ce transport est couplé aux réactions d'oxydation. En conséquence, le complexe F0-F1 qui trouve l'énergie de son activité dans ce gradient de protons transmembranaire, ne pourra plus effectuer la synthèse de l'ATP à partir de l'ADP et du phosphate (**Figure 5**). La toxicité du MPTP implique un processus neurodégénératif apoptotique déclenché par le dysfonctionnement mitochondrial, impliquant la stimulation des régulateurs de l'apoptose Bax et la kinase JNK, la libération du cytochrome C et l'activation de la caspase-3 et 9, ainsi que des récepteurs du glutamate, et des processus neuroinflammatoires (Gubellini et al., 2009), provoquant ainsi la mort des neurones dopaminergiques. Cette neurotoxine est utilisée pour modéliser la MP principalement chez des primates non-humains. Le MPTP est administré par voie intrapéritonéale (i.p.). Généralement, le traitement des souris par le MPTP entraîne des symptômes moteurs détectables par des tests de comportement (Meredith et Kang, 2006), ainsi qu'une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques. Chez le singe, le modèle MPTP consiste généralement en de multiples injections de faibles doses, produisant la perte des neurones dopaminergiques accompagnée d'akinésie, de bradykinésie, de rigidité musculaire, d'une posture anormale, de la stéréotypie et parfois des tremblements (Smeyne et Jackson-Lewis, 2005).

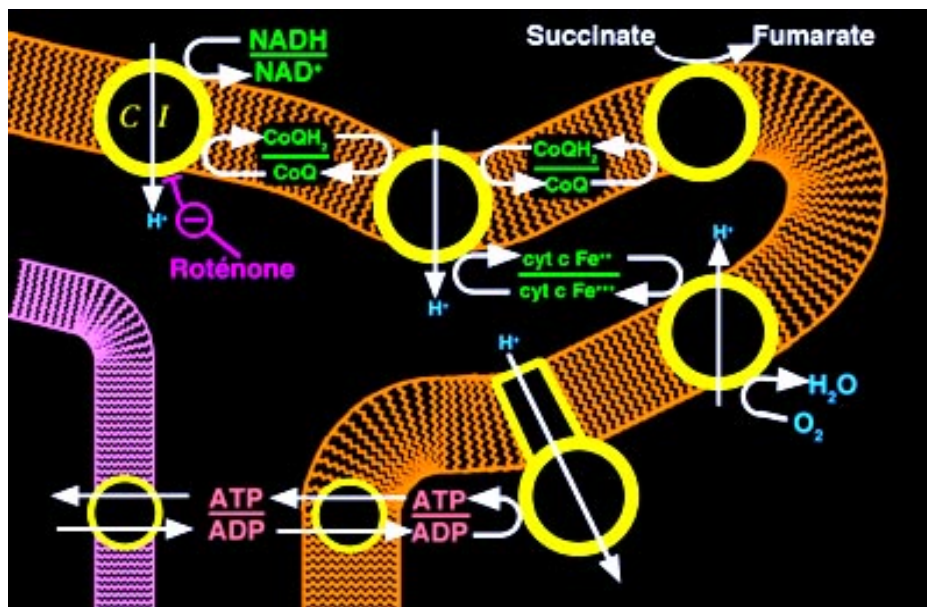


Figure 5. Mécanisme d'action de la roténone au niveau de la chaîne de transport des électrons: La roténone a la capacité de franchir la BHE, et une fois à l'intérieur du SNC. La roténone agit directement sur le complexe I mitochondrial (C I), ce qui déclenchera un déséquilibre dans le fonctionnement de la chaîne de transport d'électrons.

a.2. La 6-OHDA

La 6-hydroxydopamine (6-OHDA) est un analogue hydroxylé de la dopamine, qui a été utilisé comme un modèle expérimental pour étudier la MP. La 6-OHDA est une molécule hydrophile incapable de traverser la BHE, qui doit être directement injectée par des procédures stéréotaxiques dans la structure ciblée du cerveau, habituellement la SNc, le striatum ou le pallidum (Abedi et al., 2013) pour développer un modèle expérimental de la MP chez les rongeurs. La neurotoxicité de la 6-OHDA se produit par un mécanisme impliquant l'accumulation de cette molécule dans les neurones catécholaminergiques suite à son acheminement par les transporteurs dopaminergiques membranaires à l'intérieur de ces neurones. La 6-OHDA exerce une action inhibitrice sur le complexe I mitochondrial (Blum et al., 2011). L'injection de 6-OHDA produit en quelques jours une dégénérescence massive et rapide des neurones dopaminergiques. Une telle lésion est habituellement réalisée unilatéralement afin de réduire la mortalité des animaux et produire des défauts moteurs unilatéraux qui peuvent être détectés et mesurés efficacement et facilement, tels que l'akinésie ipsilatérale et le comportement de rotation lié à l'administration d'un agoniste dopaminergique (Gubellini et al., 2015).

a.-3. La roténone

La roténone est une molécule organique naturelle extraite de certaines plantes tropicales de la famille des rétinoides, elle a été utilisée pendant plusieurs années comme herbicide, pesticide et insecticide pour son activité inhibitrice sur les mitochondries. Hautement lipophile, la roténone traverse facilement la BHE, et pénètre ensuite dans les neurones où elle bloque le complexe I mitochondrial comme le MPTP, augmente les DRO, inhibe l'activité du protéasome et diminue les niveaux de la dopamine et du GSH, entraînant ainsi des dommages oxydatifs importants (Betarbet et al., 2000 ; Greenamyre et al., 2003). Des modèles animaux de la MP chez le rat et la souris ont été développés par administration quotidienne de roténone par voie i.p., intraveineuse, sous-cutanée ou intra-gastrique (Pan-Montojo et al., 2010) Généralement, le modèle roténone reproduit presque toutes les caractéristiques de la MP, y compris la dégénérescence des neurones dopaminergiques au niveau de la SNc et du striatum, des altérations motrices et comportementales, l'inflammation, la formation des inclusions de corps de Lewy et l'augmentation du stress oxydant dans les neurones dopaminergiques (Greenamyre et al., 2010).

b.-Facteurs génétiques

Durant plusieurs années, la MP a été considérée comme un trouble non génétique. Une étude évaluant l'héritabilité du risque de la MP dans plus de 500 familles a toutefois révélé que les facteurs génétiques sont impliqués dans le phénotype d'environ 60% des patients parkinsoniens idiopathiques (Hamza et Payami, 2010). Cependant, une minorité de 10% de cas de la MP est directement due à des mutations génétiques. De façon exceptionnelle, l'hérédité est de type autosomique dominante. Dans quelques-unes de ces familles a été mise en évidence une mutation dans le gène codant pour l' α -synucléine au niveau du chromosome 4. A ce jour, 15 gènes de cause et plus de 25 facteurs de risque génétiques ont été identifiés (Verstraeten et al., 2015; Farrer, 2006), qui sont également classés comme PARK et non-PARK (**Figure 6**). Certains d'entre eux ont été modélisés chez la souris et le rat. Les plus fréquemment modélisés sont *SNCA* (α -synucléine, Park 1 et 4), *DJ-1* (PARK7), *PRKN* (parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase, PARK2), *PINK1* (PTEN-induced putative kinase1, PARK6) et *LRRK2* (leucine-rich repeat kinase 2, PARK8), et d'autres sont en cours de développement. Dans l'ensemble, alors que ces modèles génétiques sont les plus pertinents à la pathologie, malheureusement les animaux modèles ne montrent pas systématiquement tous les symptômes caractéristiques de la maladie, même pour le triple knockout *PRKN*, *DJ-1* et *PINK1* (Kitada et al., 2009). Cependant, ces modèles offrent la possibilité d'étudier la physiopathologie de la maladie et de mieux comprendre le rôle de ces protéines dans des conditions physiologiques et pathologiques.

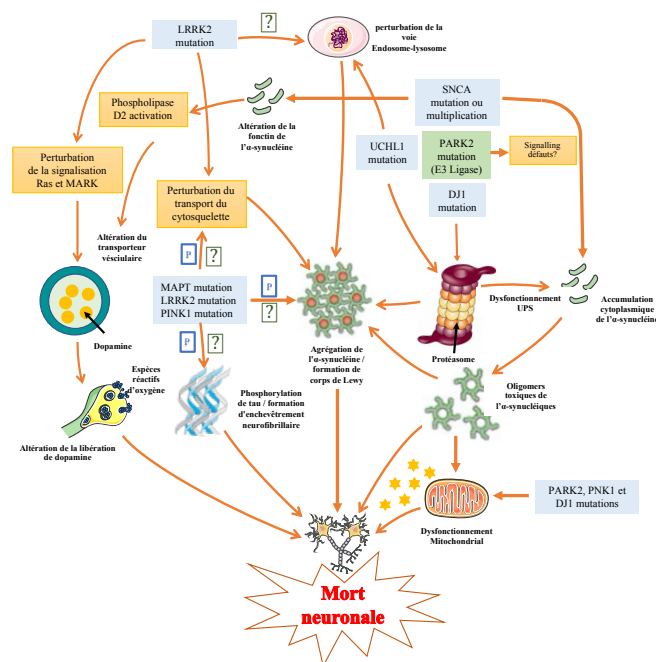


Figure 6. Facteurs génétiques impliqués dans la maladie de Parkinson: Schéma récapitulant les différents gènes mutés dans la MP et l'impact physiopathologique sur différents processus cellulaires (D'après Farrer, 2006).

b.1- α -synucléine

Le gène de l' α -synucléine (SNCA), fut le premier identifié comme étant associé aux formes familiales de la MP (PARK1 et PARK4) (Polymeropoulos et al., 1997). La SNCA est une protéine de 140 acides aminés, qui est le chef de file des protéines de la famille des synucléines qui compte deux autres membres: la β - et la γ -synucléine. Une mutation unique (A30P, A53T et E46K) ou multiple du gène *SNCA*, PARK1 et PARK4 est identifiée comme étant la cause des formes familiales autosomales dominantes de la MP (Verstraeten et al., 2015; Fujioka et al., 2012). Il a été montré que l' α -synucléine interagit avec la tubuline et le complexe SNARE pour la formation des corps de Lewy, mais sa fonction physiologique et les mécanismes par lesquels sa mutation conduit à la toxicité et la mort cellulaire sont encore mal compris (Snead et Eliezer, 2014). Le pourcentage de formes familiales impliquant la *SNCA* est inférieur à 0,5% des cas, dont une majorité sont des duplications de gène. Les duplications du gène *SNCA* constituent un rationnel pour le développement de plusieurs modèles basés sur la surexpression du gène *SNCA*. D'autres modèles sont basés sur l'expression d'une ou plusieurs des formes mutées du gène *SNCA* ou la combinaison d'une mutation/surexpression avec d'autres mutations liées à la MP ou la combinaison d'une mutation/surexpression avec d'autres mutations liées à la MP. Le nombre de ces modèles et les approches génétiques pour les obtenir sont importants et hétérogènes (Anthony et al., 2011; Le et al., 2014). En général, bien que les modèles SNCA semblent prometteurs et pertinents, aucun d'entre eux ne montre une dégénérescence de la voie nigro-striée cohérente avec des symptômes moteurs, tandis que plusieurs développent des agrégats de la SNCA dans la SNc et d'autres régions du cerveau. Malgré ses limites, ce modèle pourrait être utile pour clarifier le rôle de l' α -synucléine dans la MP.

b.2-DJ-1 (PARK7)

La protéine DJ-1 est fortement exprimée dans le pancréas, les reins, les muscles squelettiques, le foie, le cœur, le placenta, et dans le cerveau d'une façon plus concise au niveau des astrocytes. DJ-1 est située, d'un point de vue intracellulaire, dans le cytoplasme, le noyau, mais peut aussi se retrouver à l'intérieur de la mitochondrie dans certains cas. DJ-1 a aussi été retrouvée dans les inclusions tau, provenant des protéines du même nom, des patients souffrant de maladies neurodégénératives. La protéine codée par le gène *DJ-1* (PARK7) a de multiples fonctions comme la régulation transcriptionnelle, la détection du stress oxydant et la régulation des mitochondries et des protéases (Ariga et al., 2013). La mutation faux-sens de *DJ-1* est liée à la forme autosomique, récessive et précoce de la MP. Cette mutation a été initialement découverte chez des familles allemandes et italiennes (Bonifati et al., 2003). L'invalidation du

gène *DJ-1* chez la souris n'induit pas une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc, mais montre une diminution de la libération de la DA au niveau du striatum associée à une diminution de l'activité locomotrice et une modification de la plasticité synaptique corticostriatale (Goldberg et al., 2005), ainsi qu'une vulnérabilité accrue au traitement par le MPTP (Kim et al., 2005).

b.3-Parkine

Des mutations du gène Parkine ont été identifiées dans un certain nombre des familles atteintes d'une forme autosomique récessive, de début précoce de la MP. Une implication du gène de la Parkine a été ainsi démontrée dans près de 50% des cas familiaux de la MP avec un début avant l'âge de 45 ans, mais aussi dans plus de 15% des cas isolés avec un début précoce. Depuis la découverte des premières mutations du gène de la Parkine des délétions d'exons à l'état homozygote (Kitada et al., 1998), de nombreuses nouvelles altérations de ce gène furent identifiées chez des sujets de diverses ethnies. Ces altérations comprennent des combinaisons variables de délétions et de multiplications d'exons, ainsi que diverses mutations non-sens et plus fréquemment de mutations faux-sens dont la majorité affecte le domaine C-terminal de la protéine (Abbas et al., 1999). Des modèles murins sont typiquement produits par une délétion, comme la délétion de l'exon 2, 3 ou 7, et dans certains cas, par suppression de la parkine associée à l'expression de l' α -synucléine mutée. Globalement, ces modèles ne montrent pas de dégénérescence dopaminergique ou de symptômes moteurs.

Dans la majorité des cas, la maladie de Parkinson est néanmoins sporadique et vraisemblablement d'origine multifactorielle avec l'implication de facteurs génétiques et environnementaux.

I.4. Les symptômes cliniques de la maladie de Parkinson

Le déficit en dopamine striatale lié à la perte des neurones dopaminergiques de la pars compacta chez les personnes atteintes de la MP est à l'origine de la symptomatologie motrice caractéristique de cette maladie. Les principaux symptômes cardinaux caractéristique de la MP sont le tremblement, l'akinésie, la rigidité et les troubles de la marche. Ces signes moteurs ont longtemps été au centre de la prise en charge de la maladie. Depuis quelques années, les troubles non moteurs suscitent un nombre croissant de travaux de recherche et un regain d'intérêt chez les cliniciens qui désormais les recherchent plus systématiquement. Ces troubles plus difficiles à diagnostiquer et à prendre en charge que les symptômes moteurs sont parfois très handicapants pour les patients.

I.4.1. Les troubles moteurs de la maladie de Parkinson

Les symptômes moteurs de la MP apparaissent quand environ 60 à 80% des terminaisons dopaminergiques striatales et environ 40 à 50% des corps cellulaires au niveau de la SNc ont disparu (Kish et al, 1988; Javoy-Agid et al, 1982). Les troubles moteurs associés à la MP et qualifiés de symptômes cardinaux, regroupent les quatre manifestations les plus courantes et les plus handicapantes décrites chez les patients parkinsoniens:

- L'akinésie et la bradykinésie sont des troubles du mouvement qui devient lent et difficile à initier. Un délai significatif est observé entre la volonté de réaliser le mouvement et son exécution.
- La rigidité qui ressemble à une hypertonie musculaire. Cette rigidité est constante et généralisée. Le contrôle volontaire central du tonus musculaire est anormal et nécessite un effort supplémentaire pour surmonter les contraintes physiques dues à un muscle mal préparé à recevoir la commande centrale. La rigidité concerne la quasi-totalité des muscles; les mouvements de flexion prédominent sur ceux de l'extension (Delwaide et al., 1986).
- Le tremblement de repos est le symptôme le plus manifeste et le plus caractéristique de la maladie, présent chez 80% des patients. Ce symptôme apparaît généralement de manière unilatérale notamment au niveau des extrémités des membres supérieurs avec un pic de fréquence de 4-6 hertz.
- L'instabilité posturale est un symptôme tardif au cours de l'évolution de la MP. Cette instabilité est due à des troubles de l'équilibre pouvant entraîner des chutes et constitue par conséquent un handicap pour les patients (Bloem, 1992).

I.4.2. Les troubles non moteurs de la maladie de Parkinson

La MP est une affection complexe comportant également des symptômes non-moteurs qui affectent la qualité de vie des patients. Les troubles non-moteurs incluent des perturbations olfactives chez 80% des cas, tensionnelles avec une hypertension orthostatique, et gastro-intestinales et vésico-sphinctériennes chez plus de 70% des cas, mais également un déficit cognitif apparenté au syndrome dysexécutif sous-cortical frontal ou des troubles de la pensée et de la mémoire. Des troubles de l'humeur et des difficultés visuelles ont aussi été rapportés (Hawkes, 2008). La plupart des sujets parkinsoniens souffrent de douleurs chroniques soit musculo-squelettiques, soit neuropathiques, soit liés à des dystonies ou des douleurs centrales et de l'akinésie (Ford, 2010). Enfin, la dérégulation des cycles veille/sommeil est parmi les troubles non-moteurs les plus fréquents et handicapants retrouvés chez les patients parkinsoniens. Ainsi, ces différents symptômes et troubles reflètent une altération de toutes les

voies dopaminergiques même si la voie nigro-striée reste la plus touchée. Ces altérations s'accroissent avec la progression continue de la neurodégénérescence qui est estimée à une perte de 1% des neurones dopaminergiques par an, alors qu'elle est deux fois moindre chez le sujet sain (Schaman et al., 1989).

I.5. Les traitements de la maladie de Parkinson

I.5.1 Traitements Pharmacologiques

Les traitements médicamenteux de la MP visent à compenser le déficit dopaminergique. Il est toutefois important de préciser que ces traitements ne sont que symptomatiques et qu'il n'existe, à l'heure actuelle, aucune thérapeutique capable de ralentir l'évolution de la maladie ou d'empêcher la dégénérescence chronique des neurones dopaminergiques.

a. Les médicaments dopaminergiques

a.1. Lévodopa (L-Dopa)

La dopamine ne peut pas être directement utilisée en thérapeutique, car elle n'a pas la capacité de traverser la BHE et d'arriver au niveau du cerveau. La lévodopa (L-Dopa) est le précurseur de la dopamine, qui est au contraire capable de traverser la BHE. L'utilisation de la L-Dopa comme traitement de substitution de la dopamine reste fortement le « gold standard » pour l'amélioration des symptômes de la maladie (Fahn et al., 2006). L'effet antiparkinsonien de la L-Dopa reste plus puissant et plus durable que celui des agonistes dopaminergiques.

a.2. Mécanisme d'action

Dans la MP, la capacité de synthèse et de stockage des neurones dopaminergiques n'est pas totalement perdue. En revanche, la concentration de la dopa décarboxylase (DDC), l'enzyme qui transforme la L-Dopa en dopamine, est fortement diminuée. Toutefois, son activité enzymatique reste suffisante pour assurer une synthèse partielle de la dopamine après administration de L-Dopa exogène.

Au niveau cérébral, les neurones dopaminergiques captent la L-Dopa et la transforment en dopamine grâce à la DDC (Fisone et al., 2011). La dopamine libérée se fixe alors sur les récepteurs dopaminergiques. La dopamine est recaptée dans les terminaisons nigrostriatales présynaptiques à l'aide d'une protéine transporteuse spécifique de la dopamine (**Figure 7**).

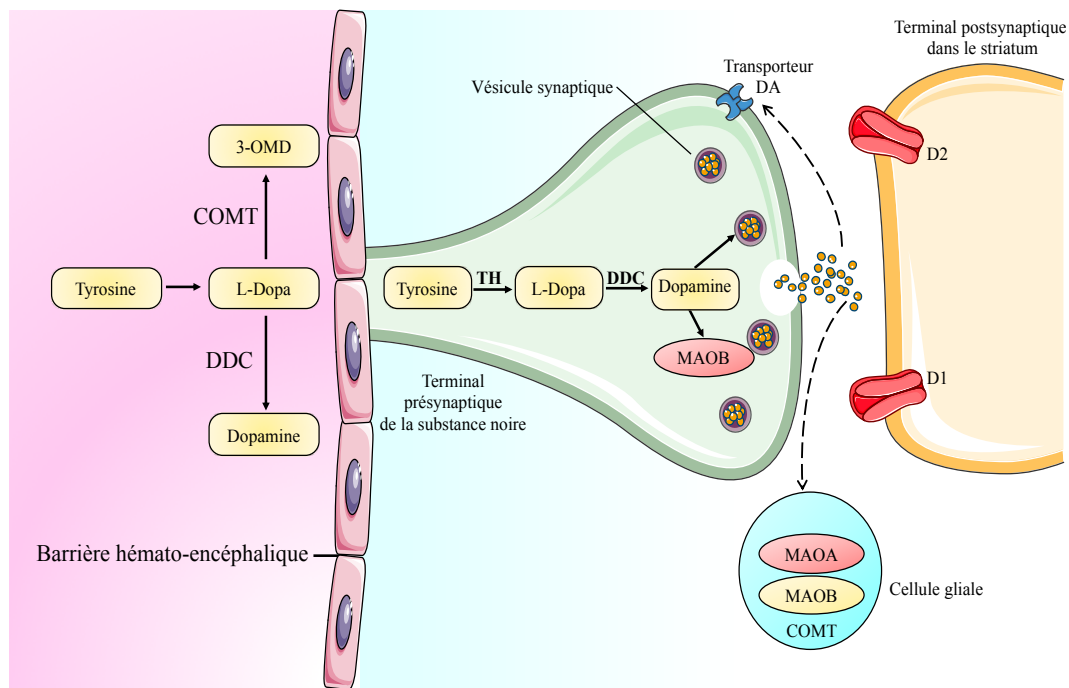


Figure 7. Mécanisme d'action de la lévodopa pour traiter la maladie de parkinson.

a.3. Pharmacocinétique

La dopamine d'origine exogène compense le déficit dopaminergique au niveau du striatum et améliore les symptômes moteurs (tremblement, rigidité, akinésie) chez les patients parkinsoniens. L'effet thérapeutique d'un médicament est généralement en grande partie lié à la valeur des concentrations plasmatiques. Le pic plasmatique est atteint en moyenne en 1 à 2 h et la demi-vie d'élimination est courte (1,5 h). De plus, les taux plasmatiques de L-Dopa ne sont pas le reflet direct de la L-Dopa intracérébrale, en raison de l'obstacle de la barrière hémato-encéphalique. Le traitement doit par conséquent être personnalisé, adapté à l'âge du patient et à l'évolution de la maladie. La L-Dopa reste le traitement le plus efficace contre les symptômes moteurs. L'effet antiparkinsonien de la L-Dopa reste plus puissant et plus durable que celui des agonistes dopaminergiques (**Figure 8**).

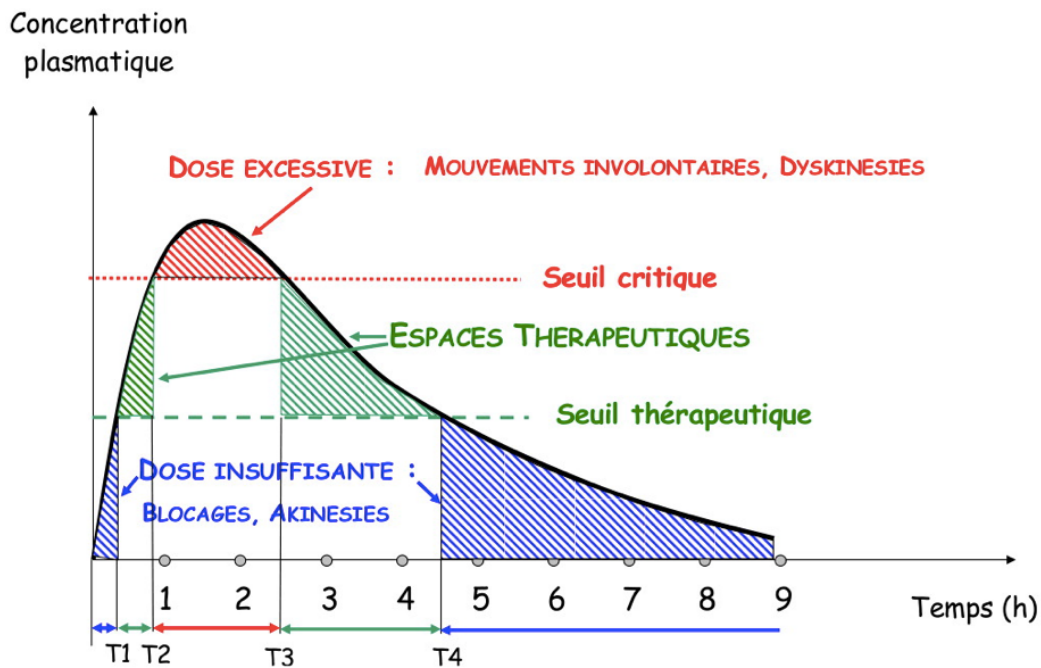


Figure 8. Représentation de la concentration plasmatique, des seuils et de l'espace thérapeutique de la L-Dopa.

Actuellement, la L-Dopa n'est plus utilisée seule, puisque les formes commerciales existantes contiennent des inhibiteurs de la dopa décarboxylase périphérique (IDDP). Les IDDP aident à augmenter la biodisponibilité centrale de la L-Dopa, ce qui permet de baisser les doses et d'améliorer la tolérance en diminuant les effets indésirables périphériques de la L-Dopa.

La L-Dopa est très efficace au début de la maladie avec une amélioration des symptômes moteurs. Cette période dure en général quelques années mais fait place ensuite à une période de fluctuations dans l'état du patient. Il faut augmenter très progressivement les doses par paliers, surtout chez les personnes âgées, jusqu'à atteindre la dose minimale efficace.

Classiquement, on décrit trois étapes du traitement à la L-Dopa:

- La "lune de miel" qui est une période variant de 3 à 8 ans et qui se définit par une vie pratiquement normale (effet maximal de la L-Dopa), pendant laquelle les symptômes sont améliorés de façon spectaculaire, ce qui augmente l'espérance de vie des parkinsoniens d'environ 5 ans. Néanmoins, il semble que son utilisation en début de maladie et surtout à fortes doses chez les patients jeunes (< à 65-70 ans) puisse les exposer plus précocement aux dyskinésies.
- La période des fluctuations: akinésie et dyskinésie touchent 60% des patients, ce qui conduit à une perte d'efficacité du traitement à la L-Dopa et à la réapparition des symptômes moteurs.
- La période de la perte d'efficacité de la L-Dopa et du retour des complications motrices.
- Les fluctuations motrices et les dyskinésies parfois plus sévères apparaissent dans 86% des cas après la période de "lune de miel", souvent 5 à 10 ans après le début du traitement (Bastide et al., 2015). Il

est donc conseillé de commencer le traitement avec des faibles doses (Damier et al., 2000; Rascol et al., 2000).

La progression de la dégénérescence des neurones dopaminergiques au cours de la MP conduit inévitablement à une augmentation du nombre des prises et des doses de L-Dopa pour maintenir son efficacité. En effet, l'équilibre obtenu avec une dose adaptée et une fréquence d'administration adéquate n'est pas définitif. Au cours des années, la fenêtre thérapeutique se referme (**Figure 9**).

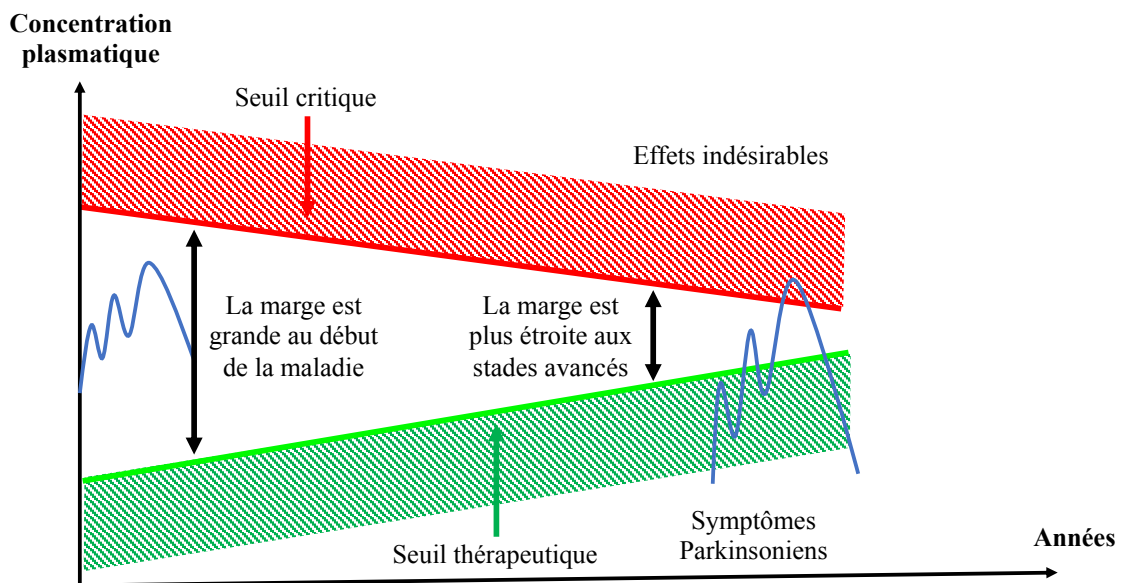


Figure 9. L'évolution des seuils et l'intervalle thérapeutique de L-Dopa au fil de années.

a.4. Les effets secondaires de la Dopa-thérapie

La lévodopa reste le traitement le plus efficace contre la symptomatologie parkinsonienne (y compris le tremblement) et le plus utilisé car il montre une très bonne efficacité contre la symptomatologie parkinsonienne (Defebvre, 2017; Yahr 1969; Rangel-Barajas et al., 2015). A long terme, lorsque la perte neuronale devient critique et les effets bénéfiques de la dopathérapie s'amenuisent, ce qui amène à augmenter les doses pour maintenir son efficacité, cette thérapie provoque néanmoins des effets secondaires importants au niveau central et périphérique. En effet, la dopamine est majoritairement absorbée au niveau périphérique et seul une faible quantité atteint le SNC. Il est donc préférable, en début de maladie, de prescrire une faible dose de L-Dopa associée à un agoniste dopaminergique ou d'utiliser des agonistes dopaminergiques en monothérapie (Katzenschlager et al., 2004; Castro et al., 2005).

a.5. Les effets indésirables périphériques

a.5.1. Les effets digestifs

Lorsque la L-Dopa est administrée seule, plus de 95% de la dose est dégradée dans le foie et la paroi intestinale, où la DCC est présente. En raison de cette dégradation périphérique, des troubles digestifs peuvent être observés tels que les nausées ou les vomissements. Ces effets digestifs surviennent habituellement en début de traitement et diminuent progressivement après quelques semaines. La L-Dopa est associée à un inhibiteur périphérique de la DCC tel que la benserazide (Modopar®) ou la carbidopa (Sinemet®). Le but de cet inhibiteur est de bloquer la transformation de la L-Dopa en dopamine au niveau digestif et ainsi diminuer les effets indésirables de ce neurotransmetteur au niveau périphérique.

a.5.2. Les effets cardiovasculaires

Les effets cardiovasculaires comprennent l'hypotension orthostatique qui résulte de la stimulation des récepteurs dopaminergiques vasculaires (vasodilatation) et rénaux (natriurèse) (McDowell, 1970 ; Sarkar, 2016). Exceptionnellement et à plus forte dose, la dopamine peut provoquer des accès d'hypertension artérielle ou des troubles du rythme (tachycardie paroxystique).

a.6. Les effets indésirables centraux

a.6.1. Les effets moteurs

Les fluctuations motrices et les dyskinésies apparaissent après une utilisation chronique de la L-Dopa et la perte progressive des neurones et de la capacité de stockage de la dopamine qui ne permettant plus de compenser les variations des concentrations plasmatiques de la L-Dopa. (Figure 10).

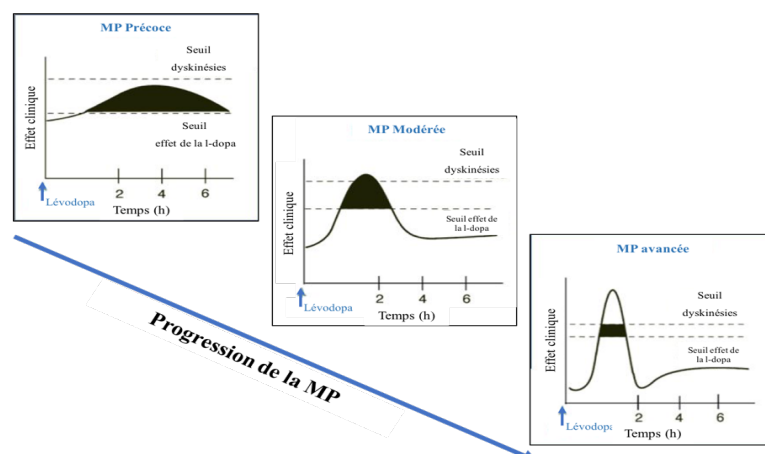


Figure 10. Réponse thérapeutique à la dopa thérapie selon la progression de la MP: Avec l'avancement de la maladie, l'effet de la l-dopa est plus en plus court et de moins en moins efficace.

a.6.2. Les effets psychiatriques

Certains troubles psychiques apparaissent également au cours du temps tels que l'agitation, l'anxiété, le délire interprétatif et les hallucinations, qui seraient la conséquence d'une stimulation excessive des récepteurs dopaminergiques (Sarkar et al., 2016). Ces effets psychiatriques surviennent plus fréquemment chez le sujet âgé. Pour améliorer la prise en charge de ces effets, une réduction des doses aux doses minimales efficaces doit être prescrite.

a.6.2.1. Troubles du sommeil

Il s'agit d'un effet indésirable fréquent pouvant se traduire par une fragmentation du sommeil, l'insomnie d'endormissement, l'apnée du sommeil des troubles du sommeil paradoxal ou une hypersomnie diurne

a.6.2.2. Troubles du comportement

Il s'agit de comportements compulsifs de type addiction au jeu, achats compulsifs, punding (comportements répétitifs sans but) et d'hypersexualité. Ces effets sont également observés avec les agonistes dopaminergiques.

b. Perfusion intra-duodénale de L-Dopa

A un stade avancé de la maladie avec des fluctuations motrices et hyperdyskinésies sévères, lorsque les associations disponibles d'antiparkinsoniens n'ont pas donné de résultats satisfaisants, il existe une possibilité d'administration de la L-Dopa ou gel intestinal de lévodopa carbidopa (GILC) par un système de pompe pour un traitement à long terme (**Figure 11**) (Fernandez et al., 2013). Une cassette de duodopa est installée par gastrotomie et relâchent directement la substance dans le duodénum à l'aide d'une pompe portable utilisée pour éviter l'estomac erratique vidé et pour améliorer l'absorption intestinale (Olanow et al., 2014).

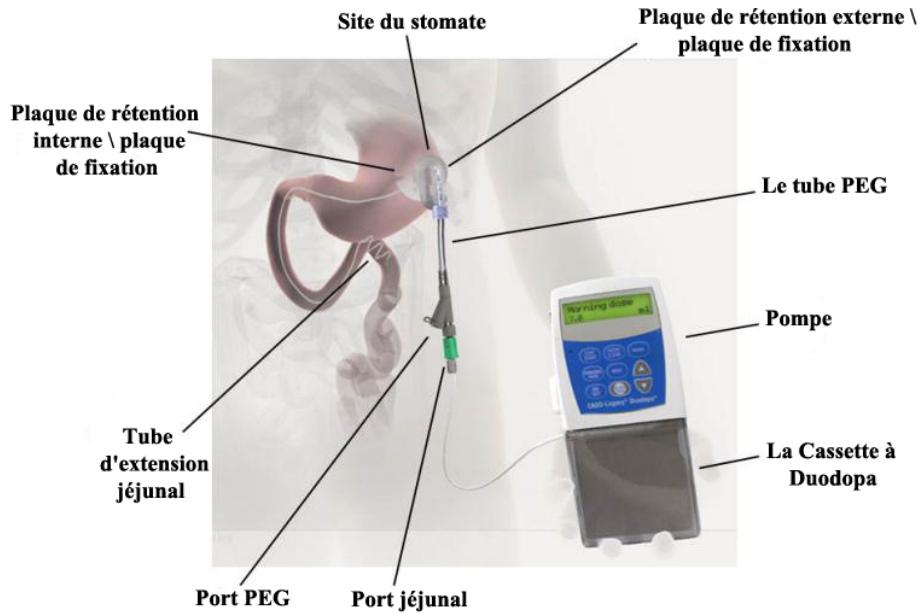


Figure 11. La lévodopa gel carbidopa est administrée en perfusion continue par voie intestinale chez les patients à un stade avancé.

Un avantage certain de cette voie d'administration est la diminution des contraintes médicamenteuses quotidiennes pour le patient parkinsonien. Ces patients sont pour la plupart âgés, souvent pluri-morbides, et astreints à une prise journalière de nombreux médicaments. Ce traitement remplace tous les médicaments pris par voie orale et permet l'obtention d'une réponse thérapeutique satisfaisante parallèlement à une réduction de la gravité des complications motrices. Plusieurs études ont montré que le GILC est un traitement efficace pour améliorer les fluctuations motrices et la qualité de vie, par rapport au traitement conventionnel (Fernandez et al., 2013). Un autre avantage de cette voie d'administration de la L-Dopa réside dans une plus grande stabilité des concentrations plasmatiques au cours de la journée. Cette stabilité accrue permet d'éviter les fluctuations de l'état clinique du patient, par exemple en fin d'intervalle de dose, et ainsi d'éviter les états «on-off» qui restent un problème important lié aux traitements pharmacologiques à longterme (Nilsson et al., 2001).

b.1. Pharmacocinétique

La dose usuelle du GILC varie d'une personne à l'autre. En général, une dose plus forte est administrée le matin afin que la quantité de médicament dans le sang atteigne rapidement le niveau voulu dans un délai de 10 à 30 min. Par la suite, des doses plus faibles sont administrées durant toute la journée jusqu'à l'heure du coucher.

b.2. Les effets indésirables

Les mises en garde et précautions applicables à l'utilisation de la Duodopa sont les mêmes que pour les autres formes pharmaceutiques de lévodopa. Au moins 1% des personnes prenant ce médicament ont signalé des effets secondaires. Un grand nombre de ces effets secondaires comme l'anxiété, des sensations de froid, de brûlure, de picotements et de piqûres sur les mains, les pieds, les bras ou les jambes, la constipation, la dépression, la diarrhée, les étourdissements, les chutes, un étourdissement ou une défaillance après être passé de la position couchée ou assise à la position debout, des hallucinations, une sudation accrue, des mouvements involontaires, des crampes musculaires et une perte d'appétit peuvent être pris en charge. Certains de ces effets secondaires peuvent disparaître d'eux-mêmes avec le temps.

c. Les agonistes dopaminergiques

Les insuffisances et les complications motrices de la dopathérapie au long cours ont conduit à rechercher d'autres voies thérapeutiques susceptibles d'améliorer la transmission dopaminergique en stimulant directement les récepteurs dopaminergiques post-synaptiques au niveau du striatum. Les agonistes dopaminergiques sont des substances capables d'activer les récepteurs de la dopamine. Tous les agonistes dopaminergiques ont une efficacité moins grande que la L-Dopa, et entraînant ainsi moins de complications motrices. Plusieurs études ont révélé une réduction de l'incidence des complications motrices et notamment des dyskinésies sous agoniste seul par comparaison à la L-Dopa seule (Rascol et al., 2000). Les agonistes dopaminergiques possèdent une demi-vie plus longue que la lévodopa et par conséquent, une durée d'action plus longue qui se compte en heures et même en dizaines d'heures. Cela permet une stimulation plus durable et plus stable des récepteurs dopaminergiques post-synaptiques. Leur efficacité en monothérapie en début de maladie a été démontrée dans plusieurs études (Rascol et al., 2000; Barone et al., 1999). Ils sont généralement utilisés pour repousser au maximum l'instauration du traitement par la L-Dopa. L'efficacité de l'association des agonistes dopaminergiques et de L-Dopa lorsque la maladie évolue, apparaît supérieure à la L-Dopa seule (Thobois et al., 2005).

Tous les agonistes dopaminergiques stimulent les récepteurs D2, initialement considérés comme étant seuls impliqués dans les effets moteurs de la dopamine. Ils agissent tous directement sur les récepteurs dopaminergiques et ne nécessitent pas de métabolisme en principe actif par les neurones dopaminergiques nigrostrié. Ces molécules ont une forte affinité pour les récepteurs D2 présynaptiques et postsynaptiques. Par leur action postsynaptique, elles

agissent de façon indépendante de la capacité de stockage de la dopamine et du nombre de neurones en amont (**Figure 12**).

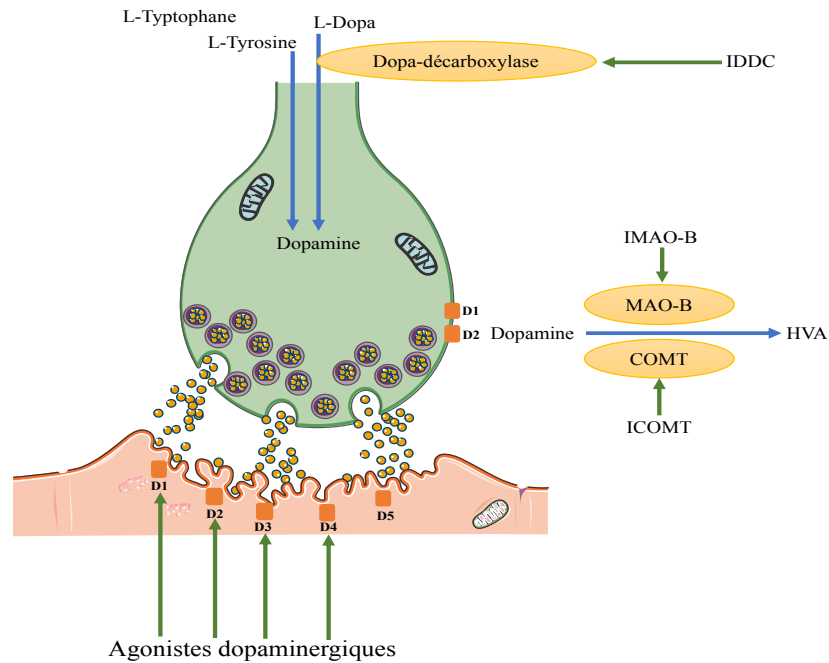


Figure 12. Représentation schématique des sites d'action des médicaments antiparkinsoniens: La L-Dopa est transformée en dopamine dans les terminaisons présynaptiques, qu'est libérée par les vésicules synaptiques. Les agonistes dopaminergiques agissent sur les récepteurs dopaminergique post-synaptiques. La dopamine est métabolisée en acide homovanillique (HVA) dans la fente synaptique par les enzymes monoamine oxydases (MAO) et catécholamine-o-méthyltransférase (COMT). Des inhibiteurs de ces enzymes (IMAO et ICOMT) sont également utilisés en thérapie.

Il existe trois classes d'agonistes dopaminergiques : les dérivés de l'ergot de seigle et les dérivés non ergotés.

c.1. Les dérivés des alcaloïdes de l'ergot de seigle

Les agonistes dérivés de l'ergot de seigle ont tous la même structure de base : l'ergoline (**Figure 13**). Ces dérivés portent les noms de bromocriptine, lisuride ou pergolide.

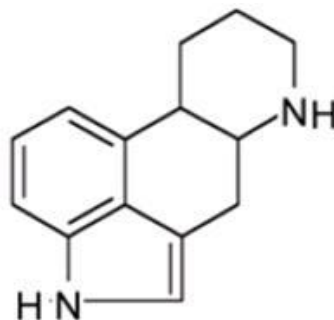


Figure 13. Structure de la molécule d'ergoline.

Ils possèdent, outre les propriétés agonistes dopaminergiques, des propriétés d'action également sur les récepteurs alpha-adrénergiques et sérotoninergiques, ce qui occasionne des effets indésirables tels que vasospasme, œdème des membres inférieurs, fibrose pulmonaire (Belal et al., 2008). Les agonistes dopaminergiques dérivés de l'ergot de seigle ne sont donc utilisés qu'en deuxième intention.

c.1.1. La bromocriptine, un peptide de la famille des alcaloïdes dérivés de l'ergot de seigle, est un agoniste dopaminergique utilisé notamment dans le traitement de la MP.

c.1.2. Le lisuride, est un agoniste dopaminergique D2 spécifique à action centrale prédominante. Au niveau nigrostrié, par stimulation directe et prolongée des récepteurs dopaminergiques D2 post-synaptiques, le lisuride pallie la déplétion en dopamine. Son association avec la L-Dopa renforce la fonctionnalité synaptique.

c.1.3. Le pergolide, est un agoniste des récepteurs dopaminergiques D1, D2 et D3. Dans la MP, le pergolide agit en stimulant directement les récepteurs dopaminergiques post-synaptiques du système nigrostriatal.

c.2. Les dérivés non ergotés

Les agonistes dopaminergiques non dérivés de l'ergot de seigle comme l'apomorphine, le ropinirole, le pramipexole, le piribédil ou la rotigotine. Constituent une famille hétérogène ayant l'avantage de ne pas induire de fibrose contrairement aux agonistes dopaminergiques dérivés de l'ergot de seigle.

c.3. L'apomorphine

L'apomorphine est un dérivé hémisynthétique de l'opium, utilisable seulement par voie injectable sous-cutanée car il est totalement détruit par le foie après administration par voie orale. Sa durée d'action est très faible (une heure), il est donc utilisé pour corriger les fluctuations brutales de l'état moteur du patient, notamment lorsqu'il souffre d'un effet on-off invalidant. Dérivée de la morphine, cette molécule n'en a pas les propriétés de stupéfiant et ressemble structurellement.

c.3.1. Les effets indésirables

c.3.1.1. Troubles digestifs

Ces troubles sont liés à la stimulation des récepteurs D2 de l'area postrema, zone de déclenchement du vomissement. Ils peuvent survenir en général en début de traitement lors de la progression posologique. La prise en charge de ces troubles consiste à augmenter la posologie

progressivement jusqu'à l'obtention de la posologie minimale efficace, et à prescrire un anti-émétique.

c.3.1.2. Les troubles psychiques

Le risque de troubles psychiatriques paraît empiriquement plus important avec les agonistes qu'avec la L-Dopa (délire, agitation, hallucinations, etc...). Les troubles seraient la conséquence d'une stimulation excessive des récepteurs dopaminergiques méso-corticolimbiques et/ou d'une hyperactivité sérotoninergique. Ces complications concernent plus volontiers le sujet âgé et le plus affecté sur le plan cognitif.

c.3.1.3. Les complications motrices

Les complications motrices sont de deux types:

- a-** Fluctuations motrices avec akinésie de fin de dose sous-tendue par une diminution progressive de la durée d'efficacité du traitement anti-parkinsonien.
- b-** Dyskinésies avec apparition de mouvements anormaux après la prise d'agoniste, traduisant une hypersensibilité des récepteurs dopaminergiques.

Les fluctuations motrices et les dyskinésies surviennent rarement au cours d'un traitement de première intention par les agonistes dopaminergiques seuls. Néanmoins, lorsqu'ils sont prescrits en deuxième intention après un traitement par la L-Dopa, les complications motrices apparaissent tout aussi fréquemment. Il semble donc que la L-Dopa soit nécessaire et joue un rôle déclenchant dans la genèse de ces effets indésirables moteurs.

d. Les inhibiteurs enzymatiques

Le concept sous-jacent au développement des inhibiteurs du catabolisme de la dopamine (ICOMT et IMAO-B) est de prolonger l'effet thérapeutique de la L-Dopa en inhibant les enzymes participant à sa dégradation comme la catéchol-o-méthyltransférase (COMT) et la monoamine oxydase (MAO). La MAO a été la première cible pharmacologique dans ce domaine.

d.1. Inhibiteur de la MAO-B

Comme leur nom l'indique, Les IMAO-B inhibent l'activité des monoamines oxydases, un groupe d'enzymes dégradant les monoamines comme la sérotonine et les catécholamines. Les IMAO-B agissent de façon sélective et réversible en empêchant l'action de l'enzyme de dégradation de la dopamine: la monoamine oxydase. Ils entraînent donc l'augmentation de la concentration de ces neurotransmetteurs dans les synapses. De plus, les IMAO-B possèderaient aussi une action inhibitrice sur la MAO-B cérébrale permettant de corriger une partie de la

déficience dopaminergique par l'augmentation du taux de dopamine striatale (Pires et al., 2017). Ils renforcent également l'action de la dopamine en augmentant son temps de demi-vie ce qui permet aussi de diminuer les doses de L-Dopa. Actuellement, la sélégiline et la rasagiline sont les inhibiteurs de la MAO-B les plus couramment utilisés dans le traitement de la MP (Peretz et al., 2016).

d.2. Inhibiteurs de la COMT

La COMT est une enzyme du métabolisme à la fois de la dopamine et de la L-Dopa. Les inhibiteurs de la COMT agissent au niveau périphérique essentiellement en inhibant la dégradation de la L-Dopa en 3-O-méthyl-dopa, un métabolite qui antagonise la pénétration de la L-Dopa dans le cerveau. Ces inhibiteurs sont toujours utilisés en association avec la L-Dopa dans le traitement des fluctuations de fin de dose permettant d'augmenter la période ON et de diminuer les doses. Tous les médicaments de cette classe pharmacologique sont des inhibiteurs compétitifs sélectifs de la COMT.

e. Traitements neurochirurgicaux

Depuis la fin des années 1980, le traitement par neurochirurgie de la MP a connu une réelle expansion. La stimulation cérébrale profonde (SCP) est une technique dès lors très largement utilisée pour le traitement des formes avancées de la MP suite à la limitation dans le temps de l'efficacité de la dopathérapie. La SCP peut être appliquée au niveau de trois cibles différentes: le noyau ventral intermédiaire du thalamus, le pallidum interne et le noyau sous-thalamique (NST) (Pollak et al., 2002).

Dans la MP, la dégénérescence de la voie dopaminergique nigrostriée entraîne une hyperactivité pathologique du noyau subthalamique et du pallidum interne responsable d'une inhibition des voies thalamo-corticales qui rend compte en partie de la symptomatologie parkinsonienne (Defè., 2013).

Le NST est la principale cible thérapeutique des traitements par la SCP. La SCP à haute fréquence du thalamus a été introduite en 1987 pour traiter les tremblements et a été appliquée en 1993 sur le NST pour traiter la MP avancée (Anaes, 2002). La SCP est devenue le traitement chirurgical de choix (Benabid et al., 2005).

Après l'implantation d'une électrode dans le NST ou le pallidum interne (**Figure 14**), une stimulation électrique continue permet de rétablir l'activité cérébrale perturbée. Celle-ci entraîne une diminution du tremblement, de l'hypertonie, de l'akinésie, des dyskinésies et des troubles de la marche.

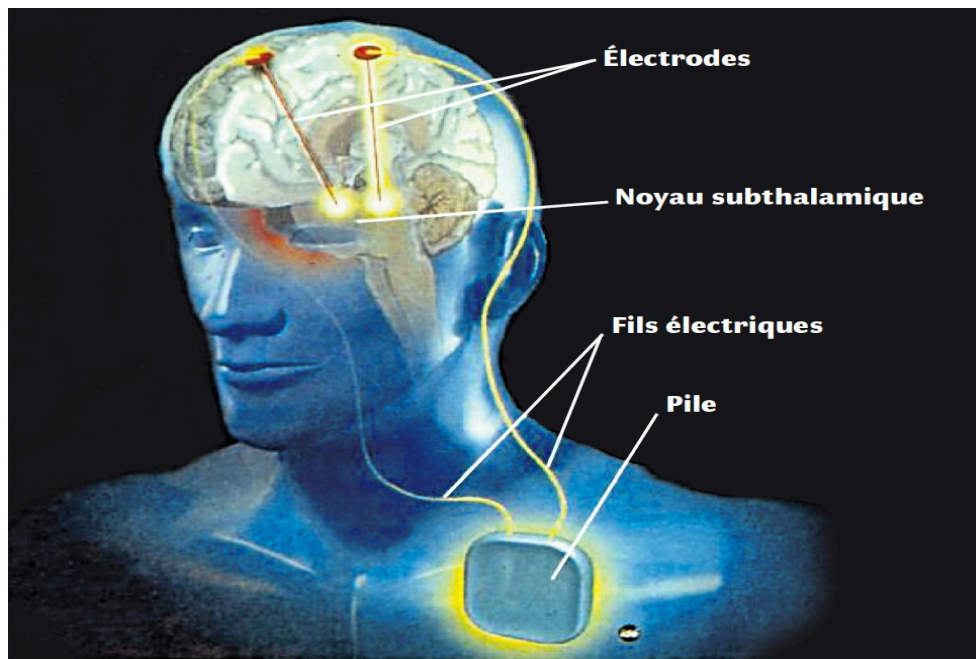


Figure 14. Schéma d'implantation du système de stimulation cérébrale profonde.

Le traitement neurochirurgical de la MP reste réservé à des patients répondant à des critères de sélection bien définis et souffrant de complications motrices induites par la lévodopa, mais répondant encore au traitement par la L-Dopa et ne présentant pas de troubles du comportement, de l'humeur ou cognitifs (Pollak et al., 2002). Leur état physique et psychologique doit permettre l'acte chirurgical (Gateff, 2009).

Cette thérapie n'est pas curative et n'empêche pas l'évolution de la maladie. Avec le temps, peuvent réapparaître les nombreux effets secondaires possibles: troubles de la marche, dysarthrie, dystonie, aboulie, diplopie, troubles de l'humeur, détérioration des fonctions cognitives, etc... D'autre part, la batterie des neurostimulateurs n'a qu'une durée de vie limitée (3-5 ans), ce qui nécessite de fréquents remplacements, impliquant de nouvelles interventions chirurgicales sur les patients. Enfin, il existe certains risques inhérents à l'intervention chirurgicale elle-même, notamment un risque d'hémorragie cérébrale et d'infections.

II. Stress oxydatif et sélénoprotéines

II.1. Définition du stress oxydatif

Le « stress oxydatif » a été décrit pour la première fois en 1985 par Helmut Sies, qui l'a défini comme étant « une perturbation de l'équilibre entre les oxydants et les antioxydants, en faveur des premiers » (Sies, 1985). Selon cette définition, les oxydants endommagent les constituants cellulaires lorsque les antioxydants ne sont pas en quantité suffisante pour les neutraliser. Cependant, un déséquilibre de la signalisation redox peut se produire sans effet néfaste obligatoirement. Pour cette raison, une nouvelle définition du stress oxydatif a été proposée par Sies et Jones en 2007, comme étant un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants en faveur des oxydants, conduisant à une perturbation de la signalisation redox et/ou des mécanismes de contrôle des dommages moléculaires qui en résultent (Sies et Jones, 2007). Différentes voies cellulaires contribuent à la production des dérivés ou des espèces réactives de l'oxygène (DRO, ERO ou ROS) qui sont générées dans divers compartiments cellulaires, à savoir la mitochondrie, le réticulum endoplasmique, la membrane plasmique ou le cytosol, et qui sont à la base du stress oxydatif.

II.2. Les radicaux libres

Les radicaux libres résultent du non appariement de certains électrons qui auront tendance à s'apparier avec des électrons d'autres molécules pour stabiliser un état qui est à l'origine instable. En donnant ou en acceptant un électron, ils peuvent se comporter comme des agents oxydants ou réducteurs très réactifs (Cheeseman et Slater, 1993; Halliwell et Gutteridge, 2007). Ainsi, l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est produit au cours de la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie à partir du dioxygène qui est nécessaire au métabolisme énergétique (Smith et al., 2007). Lors de la respiration mitochondriale, la réduction de la molécule d' O_2 en eau, est un processus imparfait qui entraîne une fuite légère d'électrons au niveau de la chaîne de transport des électrons dans la membrane mitochondriale interne au niveau des complexes mitochondriaux I et III, qui génère une faible concentration de l'anion superoxyde dans les conditions normales (Turrens, 2003). Toutefois, cet anion peut aussi être produit par la cytochrome P450 oxygénase au niveau du réticulum endoplasmique dans le foie, le poumon et l'intestin grêle (Coon et al., 1992; Reed et Backes, 2012). Il est aussi généré par la NADPH oxydase localisée dans la membrane des phagocytes (DeLeo et Quinn, 1996; Finkel, 2000) et la xanthine oxydase dans le cytosol, qui génère également du peroxyde d'hydrogène (Gandhi et Abramov, 2012). L'anion superoxyde peut aussi être produit par une voie dite non enzymatique, par le simple transfert direct d'un électron à l'oxygène par des coenzymes réduits,

des groupements prosthétiques (par exemple, les flavines) ou des xénobiotiques tel que l'herbicide paraquat, déjà réduits par certaines enzymes (Turrens, 2003). L'anion superoxyde ainsi produit, de par sa nature très réactive, est considéré comme le précurseur de la majorité des ERO (**Figure 15**) (Pincemail et al., 2002). Il est converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) spontanément ou à la suite d'une réaction catalysée par la superoxyde dismutase (SOD). Les molécules de peroxyde d'hydrogène, en présence de cations métalliques comme le Fe^{2+} , peuvent aussi être réduites en radical hydroxyle OH^\bullet (réaction de Fenton), également très réactif et hautement toxique (Chance et al., 1979; Shi et al., 2005; Wardman et Candeias, 1996).

Le métabolisme cellulaire peut donner naissance à d'autres types de radicaux libres tels que des espèces réactives de l'azote (ERN ou RNS). Ces autres radicaux libres correspondent au monoxyde d'azote (NO^\bullet), à l'anion nitroxy (NO^\ominus), au dioxyde d'azote (NO_2^\bullet), au cation nitrosonium (N^+) et au peroxydinitrite ($ONOO^\ominus$). Le terme ERN inclut à la fois les radicaux libres dérivés de l'azote et d'autres molécules réactives dont le centre actif est l'azote. (**Figure 15**) (Li et al., 2013; Powers et al., 2011). L'oxyde nitrique est à l'origine des ERN. Il est formé à partir de la L-arginine et de l' O_2 en présence de co-facteurs comme le NADPH, à l'aide d'une famille d'enzymes appelée *nitric oxide synthase* (NOS). Il réagit avec l'anion superoxyde pour donner naissance au peroxydinitrite, qui est un oxydant fort, et dont la rupture produit deux puissants oxydants (NO_2^\bullet et OH^\bullet) (Burton et Jauniaux, 2011).

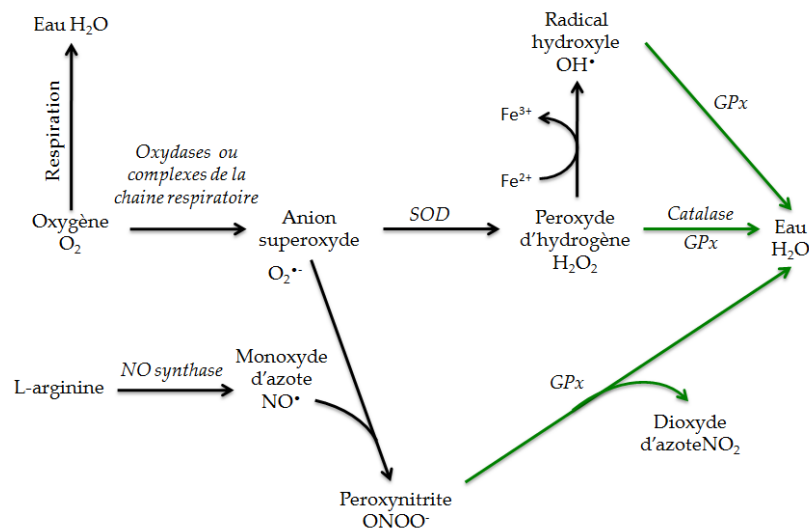


Figure 15. Voies biochimiques impliquées dans la production et le métabolisme des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote: L'oxygène subit des étapes successives de réduction conduisant à la formation des ERO et ERN. Les enzymes antioxydantes, les SOD (superoxyde dismutase), glutathion peroxydases (GPxs), et catalases, réduisent les ERO et les ERN en dioxyde d'azote (NO_2) ou en eau.

Les radicaux libres sont produits en permanence lors du fonctionnement normal des cellules et peuvent participer à la signalisation intracellulaire. Il a été montré qu'à des concentrations physiologiques, ils représentent des éléments modulateurs importants des états d'activation et de différenciation cellulaire, *via* leurs rôles en tant que seconds messagers associés à diverses kinases/phosphatases (Rangasamy et al., 2010; Yamamoto et al., 2009). Ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques tels que la régulation de la transduction des signaux cellulaires, l'induction de la réponse mitogénique, la participation à la défense immunitaire contre les agents infectieux, la survie cellulaire, la différenciation et la migration (**Figure 16**).

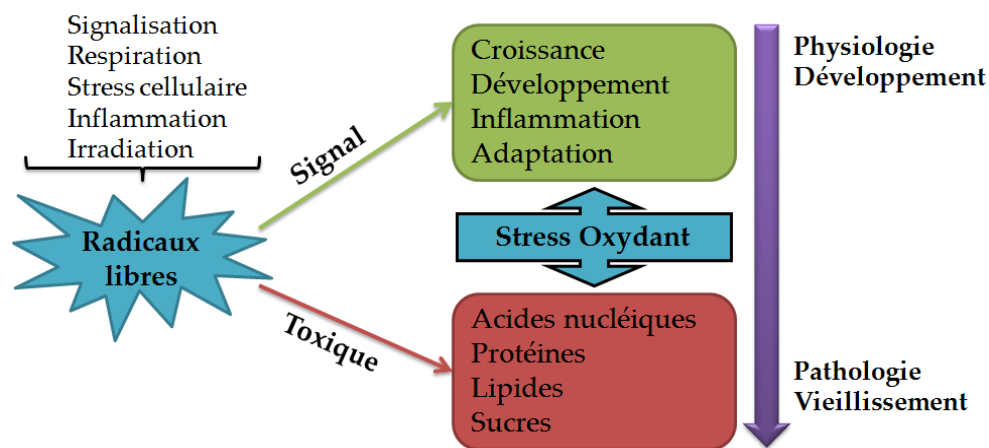


Figure 16. Les radicaux libres, très délétères, intervenant dans diverses pathologies, sont aussi des facteurs clés pour plusieurs processus vitaux (D'après Barouki, 2006).

Ainsi, les neutrophiles produisent des radicaux libres pour détruire les agents pathogènes, alors que le foie utilise les radicaux libres pour la détoxification (Lunec et al., 2002). Plusieurs dérivés des radicaux libres jouent un rôle essentiel de signalisation dans différents tissus. Ainsi, le monoxyde d'azote (NO) est le seul neurotransmetteur gazeux qui franchit les membranes biologiques sous la forme dissoute. Il est sécrété par les cellules endothéliales, les macrophages, les hépatocytes et les neurones et agit au niveau intracellulaire par l'intermédiaire d'une enzyme soluble, la guanylate cyclase (Rapoport et Murad, 1983). L'activation de cette enzyme stimule la production de guanosine monophosphate cyclique (GMPc), qui active une protéine kinase dépendante du GMPc, la PKG (Tremblay et al., 1988), et contrôle l'ouverture de canaux ioniques membranaires (Fesenko et al., 1985). Dans le système immunitaire, le NO agit comme un agent antiviral, antibactérien et antiparasitaire, alors que dans le système vasculaire il exerce une action vasorelaxante. Enfin, dans le système nerveux le NO agit en tant que médiateur dans l'activité et la plasticité neuronale.

Le peroxyde d'hydrogène, le groupement hydroxyle et l'anion superoxyde sont aussi des médiateurs chimiques qui activent plusieurs voies de signalisation impliquées dans la croissance cellulaire et la différenciation. A faible concentration, le peroxyde d'hydrogène favorise la différenciation de plusieurs types cellulaires, en activant la voie des MAP kinases (Kato et al., 1999). La voie p38 MAPK (p38 *Mitogen-activated protein kinase*), activée lors de la réponse au stress, est impliquée dans les processus de différenciation cellulaire, l'apoptose et l'autophagie (Bhat et Zhang, 1999; Nguyen et al., 2004). De plus, les ERO activent de nombreux facteurs de transcription qui sont connus pour jouer un rôle clé dans plusieurs mécanismes cellulaires. Ainsi, la stimulation de AP-1 (*activator protein-1*) par l'augmentation des ERO régule l'expression de plusieurs acteurs de la croissance cellulaire (Mendes et al., 2003; Xu et al., 1997), et l'activation de la voie Nrf2 (*nuclear factor erythroid-2-related factor 2*) stimule la survie cellulaire en contrôlant l'expression de gènes antioxydants *via* la séquence régulatrice ARE (Antioxydant response element) (Fourquet et al., 2010). D'autre part, en réponse aux ERO, l'activation de NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) stimule la réponse immunitaire et la réponse au stress cellulaire (Takada et al., 2003), alors que l'activation de P53 régule certaines fonctions cellulaires telles que la mitose ou la mort cellulaire programmée (Huang et al., 2000; Zhang et al., 2014).

Lorsque les radicaux libres sont produits en excès, ils peuvent alors être associés au développement et à la progression de nombreuses pathologies comme le cancer, les maladies cardiovasculaires, les complications diabétiques (Chen et al., 2002) et les maladies neurodégénératives (Li et al., 2013; Uttara et al., 2009; Cerutti, 1985; Dias et al., 2013; Marlatt et al., 2008; Yorek, 2003). Sans un système de défense efficace, les radicaux libres pourraient induire des dommages cellulaires en provoquant un déséquilibre redox et une altération des macromolécules biologiques, à savoir les lipides, les acides nucléiques et les protéines (Lobo et al., 2010; Young et Woodside, 2001). En effet, le stress oxydant peut induire des cassures au niveau de l'ADN avec des possibilités de mutation, la dénaturation des protéines et l'inactivation d'enzymes, l'oxydation du glucose et la peroxydation lipidique. L'ensemble de ces altérations peut avoir des conséquences irréversibles sur la cellule, conduisant à sa mort.

II.3. Les radicaux libres et les pathologies neurodégénératives

Les maladies neurodégénératives correspondent à un ensemble de pathologies hétérogènes du système nerveux central et périphérique, caractérisées par une mort neuronale de localisation différente en fonction de chaque maladie. Ces maladies neurodégénératives sont le plus souvent associées au vieillissement, et incluent entre autres, la MA, la MP, la maladie de Huntington et

la sclérose latérale amyotrophique. L'étiologie de ces maladies n'est pas encore établie mais plusieurs altérations y sont décrites comme le dysfonctionnement mitochondrial, l'augmentation des dommages oxydatifs, un défaut au niveau du système ubiquitine-protéasome, une agrégation de protéines anormales, des changements du métabolisme du fer, et des signes d'excitotoxicité et d'inflammation (Halliwell et Gutteridge, 2007). La production de radicaux libres tels que l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le groupement hydroxyle peut contribuer à l'initiation des mécanismes de neurodégénérescence. De plus, les ERN tels que l'oxyde nitrique, peuvent également entraîner la mort neuronale. Ainsi, l'excès d'ERO et d'ERN provoque des altérations mitochondriales, conduit à une augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire, et inhibe l'activité du protéasome qui assure normalement l'élimination des protéines oxydées et mal conformées. L'inhibition du protéasome entraîne à son tour une accumulation des protéines altérées et accroît le stress oxydatif (Cecarini et al., 2007; Ding et al., 2006; Halliwell, 2006). Les radicaux libres contribuent à la neurotoxicité dans ces différentes pathologies via l'oxydation de diverses protéines, comme la glutamine synthétase dans le cas de la MA (Butterfield et al., 1997) et la protéine DJ-1 dans le cas de la maladie de Parkinson (Miyama et al., 2011). Les ERO peuvent également activer certaines kinases comme les kinases JNK et p38 qui stimulent la phosphorylation des protéines tau directement ou indirectement dans le cas de la MA (Coma et al., 2008). L'activation de JNK et p38 peut aussi stimuler l'enzyme BACE1 responsable du clivage du précurseur de la protéine amyloïde, conduisant à l'accumulation du peptide amyloïde β . Celui-ci, à son tour, peut activer la NADPH oxydase pour produire l'anion superoxyde très neurotoxique. Dans la MP, le stress oxydant induit des modifications post-traductionnelles d' α -synucléine comme la nitration ou l'oxydation qui sont impliquées dans l'agrégation de la protéine et sa neurotoxicité (Xiang et al., 2013). Dans la maladie de Huntington, la modification oxydative des agrégats de la huntingtine mutée augmente la taille des agrégats et modifie leur agrégation, et augmente l'agrégation du stretch de polyglutamine situé en N-terminal entraînant la mort cellulaire (Goswami et al., 2006; Mitomi et al., 2012) (**Figure 17**). Enfin, une accumulation du fer est observée au cours du vieillissement pour devenir nocif, en stimulant la production de radicaux libres par la réaction de Fenton, en favorisant et avec d'autres métaux l'agrégation des protéines pour aboutir à la neurodégénérescence (Zecca et al., 2004).

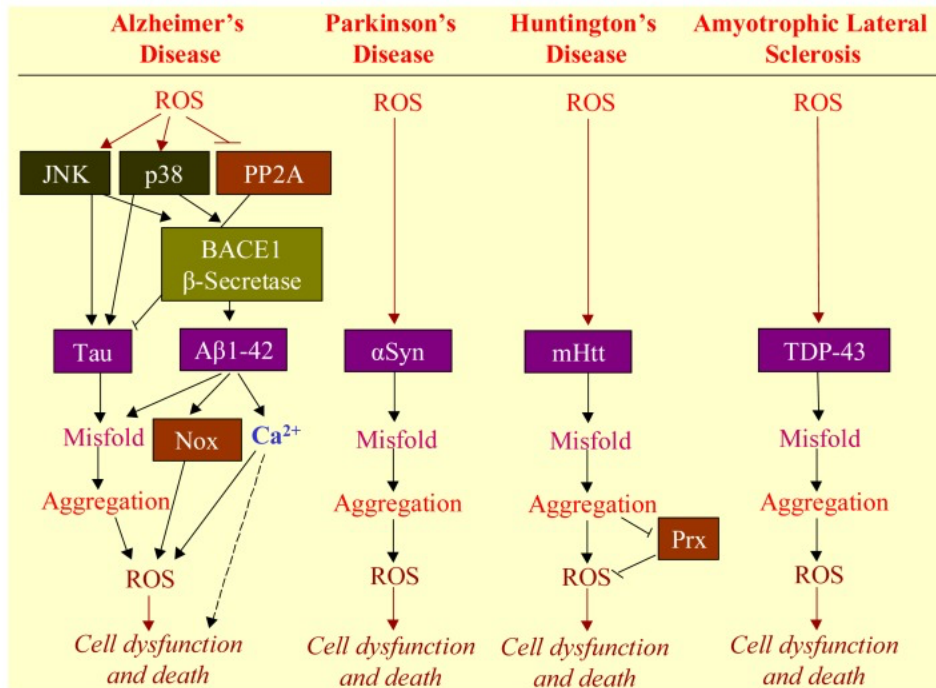


Figure 17. La relation entre les espèces réactives de l'oxygène et les protéines mal repliées à l'origine des maladies neurodégénératives (D'après Li et al., 2013).

II.4. Les antioxydants cellulaires

Les systèmes de défense antioxydants se chargent de détoxifier la cellule et de préserver son intégrité contre les dommages potentiels des radicaux libres. Les antioxydants sont capables d'éliminer les radicaux libres en les piégeant ou en inhibant leur production, et en fixant des ions métalliques nécessaires à la catalyse de la production de ROS. Ils retardent ou inhibent ainsi les dommages moléculaires qui résultent d'un excès de radicaux libres (Halliwell, 1995). Ce sont en général des facteurs réducteurs assez stables, capables de fournir un électron afin de neutraliser les radicaux libres. L'organisme assure la défense contre des agents oxydants grâce à un réseau complexe d'antioxydants qui repose sur des stratégies enzymatiques et non enzymatiques. On distingue deux types d'antioxydants selon leur origine: les antioxydants endogènes se composent principalement d'enzymes, de protéines (ferritine, transferrine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs, comme les endonucléases, et les antioxydants exogènes provenant d'aliments riches en acide ascorbique (vitamine C) et α -tocophérol (vitamine E), en caroténoïdes et flavonoïdes, en glutathion et en acide lipoïque. Certains oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des facteurs indispensables à l'activité cellulaire antioxydante sont également apportés par l'alimentation (Haleng et al., 2007). Les antioxydants enzymatiques sont de type métalloenzyme dont le centre actif permet le transfert d'électrons d'un oligoélément vers les radicaux libres (**Figure 18**). Ce

système antioxydant enzymatique comprend la SOD, la glutathion peroxydase (GPx), la thiorédoxine réductase (TrxR) et la catalase (Valko et al., 2007).

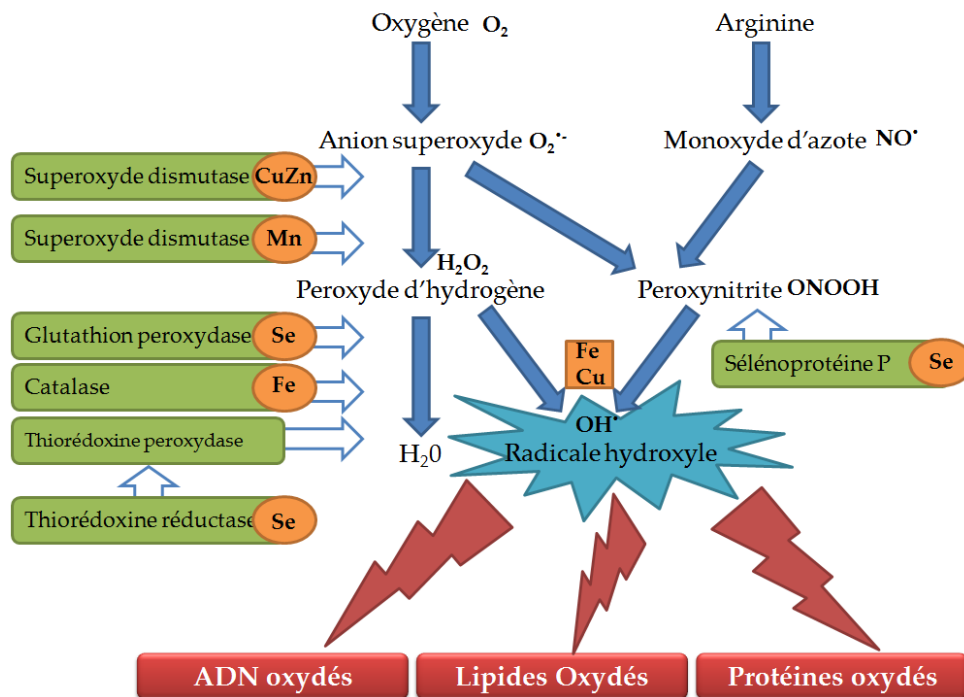


Figure 18. Principaux systèmes enzymatiques antioxydants avec leur cofacteur métallique, et leur mode d'action.

La SOD représente une des premières lignes de défense antioxydante car elle permet d'éliminer l'anion superoxyde sous forme d' O_2 et d' H_2O_2 par une réaction de dismutation (Figure 19). La SOD possède trois isoformes, SOD1, SOD2 et SOD3 dont la localisation subcellulaire est différente. La SOD1, située dans le cytosol, contient du cuivre et du zinc comme co-facteurs métalliques associés à chacune de ses 2 sous-unités. La SOD2, l'isoforme mitochondriale, contient du manganèse associé à chacun de ses 4 monomères (MnSOD). La SOD3 est une grosse glycoprotéine extracellulaire, structurellement similaire à la SOD1 puisqu'elle contient du cuivre et du zinc comme co-facteurs (Zelko et al., 2002). Ces différentes enzymes sont essentielles à la survie de la cellule, et leur dysfonctionnement est associé à des processus physiopathologiques caractéristiques des maladies neurodégénératives, cardiovasculaires et pulmonaires ou de certaines formes de cancer (Kalmar et al., 2008; Pawlak et al., 2009; Oberley, 2001). Par ailleurs, des mutations de la forme Cu/ZnSOD peuvent être à l'origine de la neurodégénérescence de motoneurones, responsable de la maladie de Charcot ou de la sclérose latérale amyotrophique (Orrell et al., 1995).

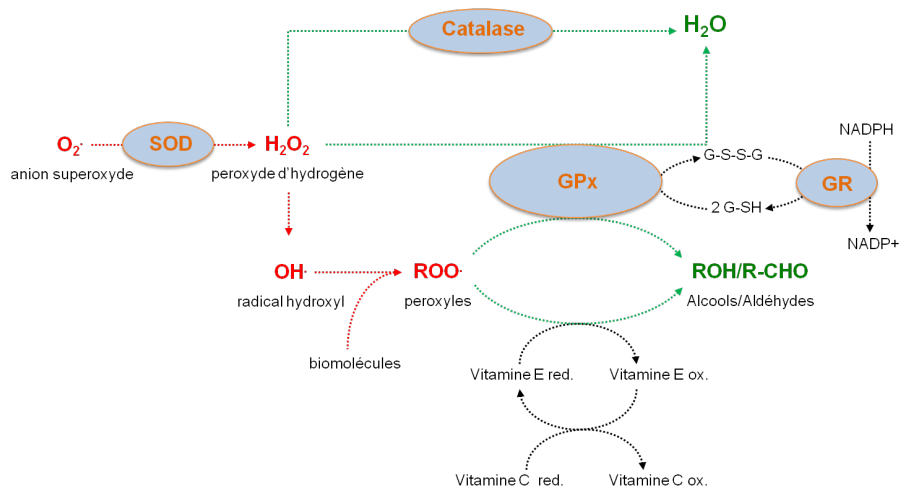


Figure 19. Principaux mécanismes de dégradation des ERO: Les cellules disposent de facteurs non-enzymatiques (glutathion (G-SH/G-S-S-G), vitamines C et E, etc.) ou enzymatiques (SOD, catalase, GPx, etc.) qui leur permettent de maintenir leur équilibre redox.

Trois enzymes prennent ensuite en charge le H_2O_2 . La GPx détruit les peroxydes ($ROOH$ et H_2O_2) pour former de l' H_2O en présence de glutathion, son substrat spécifique. La TrxR veille à maintenir l' H_2O_2 à un niveau bas en le réduisant en H_2O et en O_2 (Lu et Holmgren, 2014; Stanley et al., 2011). La catalase convertit l' H_2O_2 (généralement produit par la SOD) en H_2O et O_2 . Elle est localisée dans les peroxysomes de la plupart des cellules eucaryotes et possède une grande activité catalytique puisqu'une molécule de catalase peut convertir 6 millions de molécules de H_2O_2 en H_2O et O_2 par minute (Bashan et al., 2009; Valko et al., 2006).

La catalase et les GPx ont une fonction similaire de dismutation du peroxyde d'hydrogène, avant que celui-ci ne soit converti en radical hydroxyle. Toutefois, l'activité de la catalase est beaucoup moins importante dans le cerveau (Marklund et al., 1982). En association avec les SOD, les GPx ont un rôle fondamental. Fait important, il a été montré que la GPx1 était associée à un atome de sélénium, un oligoélément essentiel (Rotruck et al., 1973). Cette découverte a permis de définir une nouvelle famille de protéines, les sélénoprotéines, qui contiennent une ou plusieurs sélénocystéines (Sec), le 21^{ème} acide aminé naturel (voir paragraphe II.5.2 plus loin).

II.5. Les sélénoprotéines dans la défense antioxydante

Les cellules disposent d'un arsenal très complexe de défense contre les radicaux libres. Parmi les facteurs enzymatiques essentiels du système de défense antioxydant, la famille des sélénoprotéines joue un rôle important dans la survie cellulaire car ces protéines se trouvent au cœur d'un réseau redox présent dans différents compartiments cellulaires qui permet d'éliminer les ERO, de réparer les dommages moléculaires qu'ils induisent et de maintenir l'homéostasie

redox. Cette famille de protéines comprend une trentaine de membres identifiés à ce jour, caractérisés par la présence d'au moins une molécule de sélénium incorporée dans leur séquence sous forme de sélénocystéine (Sec ou U) (Bellinger et al., 2009).

II.5.1. Le sélénium

Le sélénium (Se) a été découvert en 1817 par le chimiste suédois, Jakob Berzelius qui l'a ainsi baptisé en référence à la lune, *selene*, et en opposition au tellurium (Te pour terre), une autre de ses découvertes. Dans la table périodique des éléments, le Se apparaît dans le groupe des métalloïdes bivalents, et est considéré comme un oligoélément, au même titre que le cuivre, le fer, le zinc, le magnésium ou le manganèse. Initialement le Se a été considéré comme nocif et ses effets bénéfiques n'ont été reconnus que récemment. En effet, au cours d'un voyage en Chine occidentale en 1295, Marco Polo remarqua que ses chevaux perdaient progressivement leurs sabots, et finissaient par mourir à cause d'une ingestion d'astragale, une plante connue pour accumuler le Se. L'oligoélément a ainsi été considéré à tort comme toxique pour l'homme et l'animal. A l'inverse, ce n'est qu'en 1958 que Schwartz et Foltz ont établi l'importance du Se en démontrant qu'une carence en cet oligoélément pouvait entraîner des troubles relativement graves touchant les muscles, le cœur et le foie (Schwarz et Foltz, 1958). Ainsi, une carence en Se est responsable d'une cardiomyopathie congestive ou maladie de Keshan (Cheng et Qian, 1990) qui a entraîné le décès de 10 millions de personnes en un siècle, atteignant jusqu'à 80% de mortalité dans les populations atteintes. A partir de 1978, une supplémentation systématique de l'alimentation en sélénite de sodium a permis d'éradiquer presque totalement la maladie, démontrant ainsi que le Se est un élément essentiel, devant être obligatoirement apporté, mais sans excès, par l'alimentation (Fairweather-Tait et al., 2011). Le Se est aujourd'hui apprécié pour ces nombreux effets (**Table 1**).

Le Se provient essentiellement du sol qui conditionne ses taux dans les aliments dont les plus riches sont les céréales, la noix du Brésil (Rayman et al., 2008), la viande, les produits laitiers et le poisson (Fairweather-Tait et al., 2011).

Dans l'organisme, le sélénium est principalement présent sous 3 formes: il peut être associé à des acides nucléiques (sélénobase), conjugué à des glucides ou des lipides, ou retrouvé sous la forme de 2 acides aminés séléniés, *i.e.* la sélénométhionine et la sélénocystéine. La sélénométhionine est présente essentiellement dans certaines enzymes de l'espèce bactérienne *Clostridium* (thiolases, β -D-hydroxybutyryl-coenzyme A, β -galactosidase), ainsi que chez les plantes. Au cours du métabolisme des composés soufrés, un atome de sélénium peut remplacer de façon aléatoire un atome de soufre; la fréquence de cet événement est directement

proportionnelle à la concentration de sélénium présent dans la cellule. La sélénocystéine (Sec ou U) est un analogue de la cystéine, dans lequel l'atome de soufre du groupement thiol est remplacé par un atome de sélénium pour former un groupement séléniol. Par son mécanisme d'incorporation spécifique dans les sélénoprotéines, la Sec est considérée comme le 21ème acide aminé protéogénique et se distingue donc de la sélénométhionine, incorporée de façon aléatoire. Le groupement séléniol ($pK_a=5,2$), contrairement au thiol ($pK_a=8$), est entièrement ionisé à pH physiologique. Cette ionisation fait du séléniol un meilleur nucléophile, rendant la réactivité des protéines à sélénocystéine bien plus importante que celle de leurs homologues à cystéine (Gromer et al., 2003 ; Johansson et al., 2005 ; Muller et al., 1994).

La majorité des effets bénéfiques du Se sont dus aux protéines dans lesquelles il s'incorpore au cours de leur traduction, les sélénoprotéines. Ces protéines sont retrouvées dans les trois règnes de la vie, à savoir les archées, les procaryotes et les eucaryotes, même si certaines espèces en sont dépourvues. Une sélénoprotéine très particulière, la SePP est la principale forme circulante du Se. En effet, la SePP se caractérise par un court domaine C-terminal qui comporte 10 résidus Sec, et qui est considéré comme la source circulante de Se (Burk et Hill, 2009b). Grâce à cette sélénoprotéine particulière, le Se peut être distribué dans tout l'organisme et exercer une grande variété d'effets bénéfiques (**Table 1**), ce qui en fait un oligoélément essentiel.

Tableau 1. Effets bénéfiques du sélénium: Les effets indiqués ont été observés chez l'homme, généralement en carence en Se.

Tissu	Bénéfices accordés
Général	Un faible taux plasmatique en Se est associé à une espérance de vie réduite, en particulier chez les personnes âgées (Akbaraly et al., 2005; Walston et al., 2006)
Système cardiovasculaire	Déficiences associées à une cardiomyopathie (Cheng et Qian, 1990), notamment dans la région du Keshan, où les sols sont très peu sélénifères.
Système nerveux central	Carence alimentaire et faible taux plasmatique en sélénium sont corrélés avec des déficits cognitifs (Berr et al., 2000; Akbaraly et al., 2007; Gao et al., 2007), à l'apparition de crises épileptiques (Weber et al., 1991) et à l'étendue des processus neurodégénératifs survenant au cours de différentes pathologies du SNC, comme la maladie de Parkinson (Kim et

	al., 1999, 2000), la maladie d'Alzheimer (Cornett et al., 1998) ou les accidents vasculaires cérébraux (Angelova et al., 2008).
Système immunitaire	L'apport thérapeutique de Se potentialise les capacités immunitaires (Peretz et al., 1991; Kiremidjian-Schumacher et al., 1994, 2000) Un faible taux en sélénium conduit à une sensibilité élevée aux infections virales telles que l'hépatite B ou C (Yu et al., 1997, 1999) ou au VIH (Baum et al., 1997; Campa et al., 1999).
Reproduction	Un taux plasmatique réduit en Se est corrélé avec une diminution de la motilité des spermatozoïdes (Scott et al., 1998), une augmentation du risque de fausses couches (Barrington et al., 1997, 1996) et des prééclampsies (Rayman et al., 2003).
Cancer	De nombreuses études ont démontré que le sélénium pouvait prévenir l'apparition de cancers du poumon (Zhuo et al., 2004), de la thyroïde (Glattre et al., 1989), du foie (Bjelakovic et al., 2004), de l'œsophage et des voies gastro-intestinales (Wei et al., 2004), de la vessie (Zeegers et al., 2002), de la prostate (Etminan et al., 2005) ou colorectaux (Jacobs et al., 2004); mais aussi contribue à leur progression et à leur propagation sous forme de métastases (Rayman, 2005).
Fonction endocrine	Une supplémentation alimentaire en sélénium permet de réduire l'inflammation au cours de thyroïdites (Gartner et al., 2002 ; Duntas et al., 2003) et diminue aussi le risque d'hypothyroïdisme (Negro et al., 2007).

II.5.2. Biosynthèse des sélénoprotéines chez les eucaryotes

Le Se est incorporé dans les sélénoprotéines sous la forme d'une sélénocystéine. Cette molécule est synthétisée à partir du sélénide (Se^{2-}), qui est greffé sur un résidu phosphosérine, préalablement porté sur l'ARNt spécifique de la sélénocystéine (ARNt-Sec).

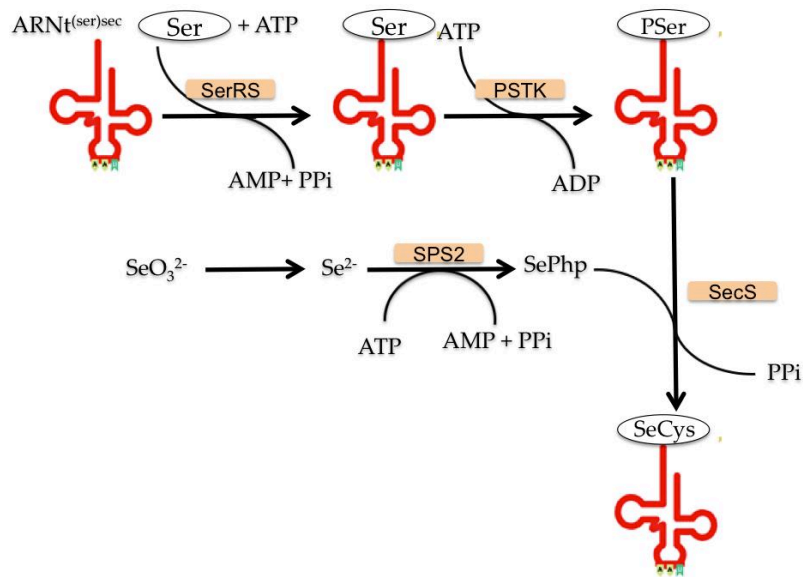


Figure 20. Biosynthèse de la Sec chez les eucaryotes: La séryl-ARNt synthétase (SerRS), en présence d'ATP, charge la sérine sur son ARNt spécifique pour donner l'ARNtSer. Le résidu sérine est ensuite phosphorylé par une o-phosphoséryl-ARNt kinase (PSTK) pour donner l'ARNt[PSer]. La Sec synthase (SecS) prend en charge le résidu sérine phosphorylé et convertit, en présence de monosélénophosphate produit par la sélénophosphate synthétase (SPS2), l'ARNt[PSer] en ARNtSec. D'après (Allmang et al., 2009).

Les réactions de biosynthèse de la Sec sont catalysées par plusieurs enzymes dont les sélénophosphate synthase 1 (Low et al., 1995) et 2 (Guimaraes et al., 1996 ; Tamura et al., 2004) et la sélénocystéine synthase (SecS) (Gelpi et al., 1992) (**Figure 20**). La Sec ainsi synthétisée est incorporée dans les sélénoprotéines en cours de traduction grâce à un mécanisme spécifique. En effet, l'ARNt-Sec reconnaît le codon stop UGA (Berry et al., 1991) suite à l'intervention de facteurs spécifiques qui reconnaissent une séquence clé dite SECIS, ou *selenocystein insertion sequence* (Driscoll et Copeland, 2003). Chez les eucaryotes, ce motif nucléotidique correspond à un repliement nucléotidique au niveau de la partie 3' non-codante de l'ARNm des sélénoprotéines. L'interaction de nombreux facteurs, spécifiques et non spécifiques à la traduction des sélénoprotéines, entre eux ou avec le SECIS, permet *in fine* la lecture du codon UGA en sélénocystéine (**Figure 21**). Parmi eux, la *SECIS-binding protein 2* ou SBP2, qui s'arrime sur les séquences SECIS dans le noyau et qui interagit également avec le ribosome (Copeland et al., 2000 ; Kinzy et al., 2005), est essentielle pour la synthèse des sélénoprotéines et l'accomplissement de leur fonction. En effet, il a été montré que des mutations de son gène étaient associées à une dysfonction de la thyroïde, liée à une activité iodothyronine déiodinase de type II (DIO2) très atténuée (Dumitrescu et al., 2005), mais aussi à une azoospermie, des troubles musculaires et une sensibilité au stress oxydatif induit par les rayons ultraviolets (Schoenmakers et al., 2010).

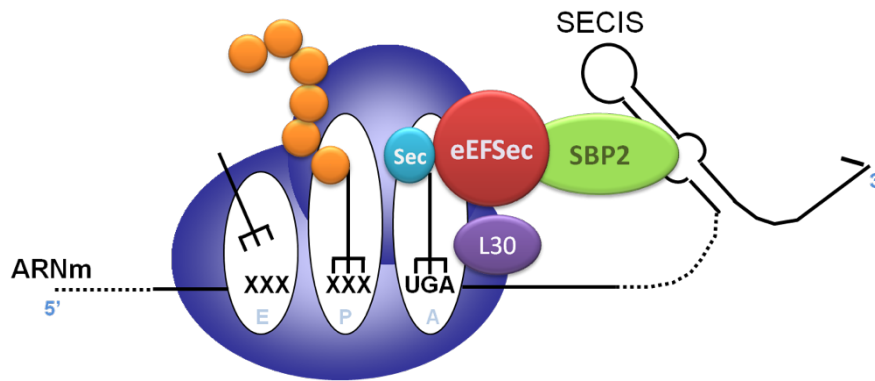


Figure 21. Traduction des sélénoprotéines eucaryotes: L'élément SECIS, se trouvant dans l'extrémité 3' non-codante de l'ARNm des sélénoprotéines, est reconnu par un complexe de protéines, comprenant notamment SBP2 et eEFSec, qui permettent d'introduire l'ARNt-Sec au niveau du codon UGA dans la logette A du ribosome.

II.6. Le sélénoprotéome

La connaissance des sélénoprotéomes chez différentes espèces a grandement bénéficié des développements des techniques de génomique et des outils bioinformatiques modernes. En particulier, le développement du programme SECISearch par l'équipe de V. Gladyshev aux Etats-Unis sur la base de l'existence concomitante d'un codon UGA et d'un motif SECIS thermodynamiquement stable (Kryukov et al., 1999) a permis d'identifier plusieurs gènes codant des sélénoprotéines, notamment celui de la sélénoprotéine T (SelT ou SELENOT). Cette équipe a mis en place une base de données publique, la « SelenoDB» (www.selenodb.org), qui recense l'ensemble des informations connues sur les sélénoprotéines (Castellano et al., 2008).

Ainsi, ces outils ont permis d'identifier 26 sélénoprotéines chez l'Homme, dont la distribution tissulaire et subcellulaire, ainsi que la fonction sont reportées dans la **Table 2**.

Table 2. Caractéristiques du sélénoprotéome humain: DI, déiodinase ; GPx, glutathion peroxydase ; TrxR, thiorédoxine réductase ; RE, réticulum endoplasmique ; TGI, tractus gastro-intestinal ; N.D., non déterminé.

	Distribution tissulaire	Localisation subcellulaire	Fonctions	Références
DI1	Thyroïde, foie, rein et hypophyse	Membrane	Activation et désactivation des hormones thyroïdiennes	Bates et al., 1999 Behne et al., 1990 Croteau et al., 1996
DI2	Cerveau, tissu adipeux, hypophyse et placenta			
DI3	SNC, placenta et peau			
GPx1	Ubiquiste	Cytosol	Dégradation des radicaux libres, enzymes antioxydantes essentielles à la survie cellulaire.	Rotruck et al., 1973 ; Margis et al., 2008 ; Brigelius-Flohe et al., 1994 ; Maiorino et al., 2003
GPx2	TGI	Cytosol		
GPx3	Plasma, rein	Extracellulaire		
GPx4	Ubiquiste, élevée dans le cerveau et le testicule	Membrane, mitochondrie, noyau		
GPx6	N.D.	N.D.		
SPS2	Ubiquiste, surtout foie et testicule	Cytosol	Intervient dans la biosynthèse de la sélénocystéine	Guimaraes et al., 1996
Sep15	Ubiquiste, élevé dans le cerveau	RE	N.D.	Labunskyy et al., 2007
SelH	Variée	Noyau	Antioxydant et régulation de la transcription	Novoselov et al., 2007
SelI	Variée	Membrane	Biosynthèse des phospholipides	Kryukov et al., 2003
SelK	Variée	RE	N.D.	

SelM	Variée, élevée dans le cerveau	RE	Protection contre le stress oxydatif	Labunskyy et al., 2007
SelN	Muscle squelettique, foie, cœur, SNC	RE	Régulation de l'homéostasie calcique	Petit et al., 2003
SelO	Variée	Cytosol	N.D.	Kryukov et al., 2003
SePP	Ubiquiste, foie	Extracellulaire	Source circulante du sélénium et activité antioxydante	Saito et al., 1999 ; Takebe et al., 2002 ; Burk et Hill, 2009
SelR	Ubiquiste, cerveau	Cytosol, noyau	Antioxydant à activité méthionine sulfoxide réductase	Kim et al., 2006
SelS	Astrocytes réactifs	RE, membrane	Réponse UPR	Ye et al., 2004 Kryukov et al., 2003
SelT	N.D.	RE, appareil de Golgi et mitochondrie	Mobilisation du calcium intracellulaire, régulation redox	Grumolato et al., 2008 Dikiy et al., 2007
SelU	N.D.	N.D.	N.D.	
SelV	Testicule	Cytosol	N.D.	Kryukov et al., 2003
SelW	Elevée dans le muscle squelettique, cœur, SNC, testicule, rate	Cytosol	Antioxydant	Chung et al., 2009 Whanger, 2009
TrxR1	Ubiquiste, élevée dans le cerveau	Cytosol, noyau	Régulation redox, implication dans des mécanismes de transduction et de régulation d'expression de gènes	Arner et Holmgren, 2000 ; Gasdaska et al., 1995 ; Rigobello et al., 1998 ; Jakupoglu et al., 2005
TrxR2	Ubiquiste	Mitochondrie		
TrxR3	Ubiquiste	Mitochondrie		

II.7. Implications des sélénoprotéines dans les mécanismes de survie cellulaire: rôles dans la protection et la réparation des dommages relatifs au stress oxydatif

Comme indiqué précédemment, les sélénoprotéines sont généralement différemment exprimées au sein des tissus et des cellules. Ceci est notamment le cas pour les GPx, qui sont au nombre de 8, dont 5 sont des sélénoprotéines contenant un résidu sélénocystéine au sein de leur site actif (Margis et al., 2008). De nombreuses études ont permis de mettre en évidence leur fonction cruciale dans la protection contre le stress oxydatif, en permettant la catalyse, avec le glutathion pour co-facteur, de la dismutation des molécules d'H₂O₂ et des radicaux peroxydes issus des phospholipides membranaires. Cette dernière activité est notamment portée par la GPx4, dont le rôle est essentiel pour la cellule puisqu'elle permet de maintenir l'intégrité des membranes (Conrad et al., 2007). De plus, ce réseau antioxydant spécialisé comprend également d'autres sélénoprotéines telles que la SelH (Novoselov et al., 2007) ou la SelW (Beilstein et al., 1996 ; Chung et al., 2009). Par ailleurs, les TrxR, même si elles sont également impliquées dans des voies de régulation de transduction et de transcription (Rundlof et Arner, 2004), contribuent aussi à cet arsenal de défense. En effet, ces enzymes, dont des taux élevés sont présents de manière complémentaire dans les cellules et les tissus, catalysent, avec le NADPH comme co-facteur, la réduction de leur substrat principal, à savoir les thiorédoxines oxydées (Holmgren, 1989 ; Arner et Holmgren, 2000). Ces dernières sont impliquées dans des réactions de formation et de rupture de ponts disulfures, et permettent notamment de maintenir des cystéines sous forme réduite, car elles peuvent être oxydées par un stress oxydatif (Gilbert, 1990). Par ailleurs, les TrxR sont également impliquées dans la régénération d'agents antioxydants tels que les peroxyrédoxines (Chae et al., 1999) ou les méthionine sulfoxyde réductases (Moskovitz et al., 2001).

Il est bien établi que l'état redox de la cellule influence l'équilibre entre thiorédoxine réduite/oxydée. En effet, des conditions oxydatives sont connues pour stimuler l'expression de thiorédoxines (Ohira et al., 1994), ce qui contribue à déclencher des voies de réponse au stress oxydatif, en particulier l'activation des protéines p53, un facteur transcriptionnel régulant notamment l'apoptose, ou le *Redox factor 1* (Jayaraman et al., 1997), qui est une endonucléase permettant de réparer les dommages de l'ADN (Seki et al., 1991).

Certaines sélénoprotéines ont été également décrites pour leurs propriétés à réparer ou à dégrader les protéines altérées par des conditions de stress. En effet, la SelR ou MsrB1, fait partie de la famille des méthionine sulfoxyde réductases, et catalysent la réduction des résidus méthionine oxydés. Ce système contribue à restaurer les fonctions des protéines cellulaires, et

la présence de Se au sein de MsrB1 potentialise ses capacités catalytiques, en comparaison des autres Msr (Kim et al., 2006). Enfin, ce système se complète par la participation de la Sep15, de la SelS et de la SelM, toutes trois localisées dans le RE (Labunskyy et al., 2007 ; Ye et al., 2004), dans la réponse au stress liée à l'accumulation des protéines mal repliées (connue sous la dénomination *Unfolded protein response* ou UPR). En effet, en cas de stress oxydatif notamment, les structures tridimensionnelles des protéines néosynthétisées sont altérées, ne peuvent plus être exportées vers l'appareil de Golgi et s'accumulent donc au sein du RE. Cette accumulation est notamment perçue par la *Glucose-Related Protein 78* (GRP78) ou BIP, qui est une protéine chaperonne, dont la fonction est de reconnaître des signatures protéiques tridimensionnelles anormales (Bertolotti et al., 2000). Cette reconnaissance lui permet donc d'initier différentes voies activatrices de l'expression de facteurs qui vont permettre de replier correctement les protéines, notamment par le jeu de réarrangement de ponts disulfures, ou de les dégrader par un système appelé *Endoplasmic reticulum Associated-Degradation* (ou ERAD) (**Figure 22**). Ainsi, il a été démontré que la Sep15 est capable d'interagir dans le RE avec l'UDP-Glucose Glycoprotéine Glycosyl Transférase, une protéine qui contribue au repliement des protéines néosynthétisées (Korotkov et al., 2001 ; Labunskyy et al., 2005). Enfin, il a été observé que la SelS contribue quant à elle à la dégradation des protéines mal repliées. En effet, celle-ci interagit avec la protéine ATPase p97 et la Derline-1, deux protéines du complexe ERAD qui permettent d'acheminer les protéines altérées vers le système ubiquitine/protéasome (Ye et al., 2004).

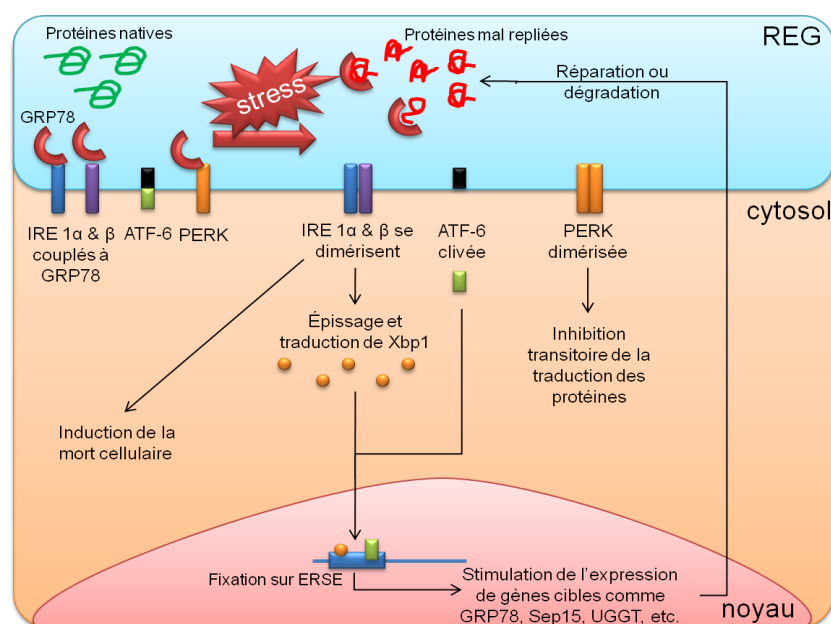


Figure 22. Induction de la réponse UPR par l'accumulation de protéines mal repliées au sein du RE: En condition de stress, la protéine GRP78 se fixe naturellement sur les protéines altérées, ce qui libère les facteurs inositol-requiring enzyme 1 α & β (IRE1 α & β) et la PKR-like ER-localized eIF2 α kinase (PERK). Cela permet à

IRE1 α & β de se dimériser, de s'autophosphoryler et de devenir une endonucléase qui achève l'épissage de l'ARNm xbp1 (Tirasophon et al., 2000). Ainsi, le clivage de son intron résiduel lui permet d'être traduit, et de se fixer, en association avec ATF-6, sur leur élément promoteur *Endoplasmic Reticulum Stress response Element* (ERSE) au niveau des gènes intervenant dans la réponse UPR (Calfon et al., 2002). Cependant, si l'action de ces derniers s'avère être vaine, les voies JNK (Jun-N terminal protein Kinase) ou C/EBP homologous protein (CHOP) peuvent être stimulées et provoquer la mort de la cellule (Zinszner et al., 1998 ; Urano et al., 2000).

La participation de la SelM dans la réponse UPR demeure encore hypothétique (Labunsky et al., 2005) même si une étude récente a montré son rôle clef dans la survie cellulaire et le maintien de l'homéostasie calcique en condition de stress (Reeves et al., 2010). D'autre part, la SelN est une sélénoprotéine transmembranaire localisée dans le RE (Petit et al., 2003), qui est particulièrement abondante dans le muscle squelettique, où elle participe à la régulation des taux calciques cytosoliques. En effet, une étude récente a démontré sa capacité à interagir physiquement avec le récepteur de la ryanodine, dont l'activité est redox-dépendante (Jurynek et al., 2008). Cette fonction de la SelN serait notamment déterminante au cours de l'ontogenèse musculaire où son expression est particulièrement élevée, et dont l'inhibition provoque de graves altérations structurales du tissu embryonnaire musculaire. (Denziak et al., 2007) En accord avec ces résultats, de nombreuses études ont rapporté que plusieurs dystrophies musculaires congénitales, telles que la *rigid spine muscular dystrophy*, parfois nommée en France syndrome de la colonne raide associée à une dystrophie musculaire (Flanigan et al., 2000), et certaines myopathies à multimyotomes (Ferreiro et al., 2002) ou avec surcharge en desmine (Ferreiro et al., 2004) sont associées à des mutations du gène de la SelN.

L'ensemble de ces données révèle l'importance des sélénoprotéines pour le fonctionnement et la survie cellulaire, et montre que l'altération de leur expression conduit à de nombreuses perturbations au niveau cellulaire et tissulaire qui sont à l'origine de différentes pathologies.

II.8. Rôles des sélénoprotéines dans le SNC

Puisque le stress oxydatif est une des causes majeures invoquées lors de processus neurodégénératifs (Niizuma et al., 2009), plusieurs équipes de recherche se sont intéressées à la distribution et aux rôles des sélénoprotéines dans le système nerveux. Des modèles de surexpression et de *knockout* ciblé dans le cerveau a permis de mettre en évidence leur rôle déterminant dans le développement du SNC et le maintien de l'homéostasie cérébrale.

II.8.1. Expression et rôle neuroprotecteur des sélénoprotéines dans le SNC

Certaines sélénoprotéines sont très abondantes dans le cerveau des mammifères, comme les TrxR1 et 2 (Hill et al., 1997; Lovell et al., 2000), la SePP (Hill et al., 1997; Scharpf et al., 2007), la SelR (Moskovitz et al., 1996) ou la SelM (Pitts et al., 2013). Certaines sélénoprotéines telles

que la SelR (Moskovitz et al., 1996) et la SePP sont abondantes dans les cellules GABAergiques de Purkinje (Saijoh et al., 1995), et cette dernière a été par ailleurs détectée dans le liquide céphalo-rachidien et les cellules épendymaires (Scharpf et al., 2007). Enfin, la SelW été détectée dans le cortex, le cervelet et le thalamus (Sun et al., 2001a).

Les niveaux d'expression des sélénoprotéines peuvent être stimulés lors de lésions cérébrales. Ainsi, les taux de GPx (Lindenau et al., 1998) et plus particulièrement de la GPx4, mitochondriale et membranaire (Savaskan et al., 2007), ainsi que de la SelM (Reeves et al., 2010) sont nettement accrus lors de processus neurodégénératifs. D'ailleurs, l'inactivation des gènes de ces deux sélénoprotéines, réduisait significativement la survie des cellules gliales *in vitro*, à l'état basal et suite à un traitement au peroxyde d'hydrogène. Enfin, une stimulation de l'expression de la SelS, un facteur important de la réponse UPR, a été rapportée suite à une ischémie cérébrale ou une injection excitotoxique de kainate (Fradejas et al., 2008; 2011).

L'activité neuroprotectrice des sélénoprotéines a tout d'abord été démontrée *in vitro* en utilisant des modèles cellulaires permettant leur inhibition ou surexpression. Ainsi, Reeves et al. (2010) ont montré que l'inactivation de la SelM dans des cellules d'origine neuronale et gliale, les rendait plus sensibles à un stress oxydatif. Ils ont à l'inverse montré que la surexpression de cette sélénoprotéine diminuait significativement la toxicité calcique induite par un traitement à l'H₂O₂, favorisant ainsi la survie cellulaire.

Plusieurs études suggèrent également un rôle neuroprotecteur de la SePP, grâce à son extrémité N-terminale portant une activité redox. En effet, Steinbrenner et al. (2006) ont montré que l'inhibition de la SePP diminuait la viabilité des astrocytes en conditions contrôles ou oxydantes. Par ailleurs, la présence de la SePP a été montrée au sein des plaques amyloïdes, dans les plexus choroïdes et le liquide céphalo-rachidien chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, ce qui suggère un rôle de cette protéine dans la physiopathologie de cette maladie neurodégénérative (Bellinger et al., 2008, Rueli et al., 2015).

D'autre part, la surexpression de la SelS rend les cellules gliales plus résistantes face à un stress du réticulum, alors que son inhibition diminue fortement la survie de ces cellules (Fradejas et al., 2011). Enfin, plusieurs auteurs ont également souligné l'activité antioxidante de la SelW dans au niveau cérébral. En effet, la SelW qui est abondante au cours des stades tardifs de l'ontogenèse cérébrale (Chung et al., 2009), et son rôle protecteur vis-à-vis d'agents neurotoxiques tels que les métaux lourds a été documentée (Amantana et al., 2002; Kim et al., 2005).

II.8.2. Apport des souris transgéniques

Le développement du système d'inactivation Cre/Lox, a permis de générer un large éventail de souris, dont des *knockout* ciblés au cerveau des gènes des sélénoprotéines, ce qui a été essentiel pour l'étude de ces protéines notamment celles dont le knockout global est létal comme la GPx4 ou la TrxR1 et 2. Ainsi, une lignée de souris portant une délétion conditionnelle du gène de l'ARNt de la Sec dans le cerveau et plus particulièrement dans les neurones a entraîné un retard de croissance, une perte d'équilibre et une hyperexcitabilité. Dans tranches d'hippocampe ont montré une activité épileptogène spontanée. Le cerveau présentait une neurodégénération massive, des ventricules élargis et une microcéphalie, démontrant le rôle crucial des sélénoprotéines dans le développement cérébral (Wirth et al., 2010). D'autre part, Seiler et al. (2008) ont développé une lignée transgénique portant une délétion de la GPx4 dans les neurones corticaux et hippocampiques. Dès P10, les jeunes souris présentaient une démarche ataxique alors qu'à P12, ces animaux étaient devenus hyperexcitables et très agressifs.

Sorensen et al. (2008) ont invalidé la TrxR1 dans le cerveau par croisement de souris TrxR1^{fl/wt} et Nestin-Cre, provoquant une diminution significative de la taille des animaux homozygotes TrxR1^{fl/fl}/Nes-Cre et une ataxie très sévère. Les auteurs ont observé que la structure du cervelet était fortement altérée et que les animaux homozygotes TrxR1^{fl/fl}/Nes-Cre présentaient un défaut de prolifération des cellules granulaires immatures et une perturbation organisationnelle de la glie de Bergmann.

Même si les souris *knockout* pour le gène GPx1 ont montré une forte sensibilité à un traitement par le Méthyl-4-phényl-1,2,5,6-tétrahydropyridine (MPTP) (Klivenyi et al., 2000) ou par la 6 hydroxydopamine (Bensadoun et al., 1998), représentant deux modèles physiopathologiques de la maladie de Parkinson, ces souris n'ont pas montré de phénotype neuronal particulier. Ces souris GPx1^{-/-} présentaient aussi un volume d'infarct cérébral 3 fois supérieur à celui de souris contrôles dans un modèle d'ischémie/reperfusion (Crack et al., 2001).

Il apparait donc que les sélénoprotéines sont indispensables pour le développement du SNC et pour limiter les processus pathologiques neurodégénératifs. Toutefois, l'étude de certaines sélénoprotéines identifiées plus récemment comme la SelH, I, K, O, U, V ou encore T, sont à l'heure début et il est fort à parier que leur caractérisation permettra de mettre en évidence leur rôle important dans différents tissus dont le SNC.

III. Identification et caractérisation d'une nouvelle sélénoprotéine essentielle: la sélénoprotéine T (SelT)

III.1. Découverte et structure

La SelT a été initialement identifiée par une approche bioinformatique basée sur la reconnaissance de l'élément SECIS dans les bases de données génomiques (Kryukov et al., 1999). Au cours de l'évolution, sa séquence nucléotidique est extrêmement conservée, avec 97-100% d'homologie entre l'Homme et les mammifères, 95% avec le poulet ou encore 89% avec la grenouille (Mariotti et al., 2012; Moustafa et Antar, 2012). La SelT fait partie des plus anciennes sélénoprotéines chez les vertébrés, et il en existe des homologues contenant la Cys à la place de la Sec chez des protozoaires, des plantes terrestres et aquatiques et des insectes. Ces observations indiquent que la SelT pourrait avoir une origine très ancienne chez les organismes vivants, ce qui renforce l'idée d'un rôle important de cette protéine (Moustafa et Antar, 2012).

La transcription et l'épissage des 6 exons du gène de la SelT génère un ARNm contenant la région 3'-non codante où est situé l'élément SECIS, nécessaire à l'incorporation de l'acide aminé Sec dont le codon est localisé dans l'exon 2 (**Figure 23A**). La traduction de cet ARNm forme une protéine de 195 acides aminés contenant plusieurs éléments de structures secondaires (**Figure 23B**). A l'instar des sélénoprotéines de type rédoxine, la SelT possède un centre redox Cys-X-X-Sec compris dans un motif de type thiorédoxine qui généralement porte une activité oxydoréductase en formant un pont disulfure. Le motif thiorédoxine se caractérise également par l'existence de feuillets β entourés par plusieurs hélices α (**Figure 23C**). Bien que la structure tertiaire de la SelT ne soit pas encore caractérisée, l'homologie de ses structures secondaires suggère un repliement similaire à la thiorédoxine et la SelW (**Figure 23D**). De manière intéressante, il s'avère que la SelT, par la présence de quatre hélices α supplémentaires, partage une homologie de structure avec la DsbA (pour Disulfide bond formation protein A), une oxydoréductase présente chez les bactéries. Bien que ce ne soit pas le cas pour cette enzyme bactérienne, les hélices α de la SelT pourraient constituer un domaine transmembranaire (Grumolato et al., 2008; Moustafa et Antar, 2012).

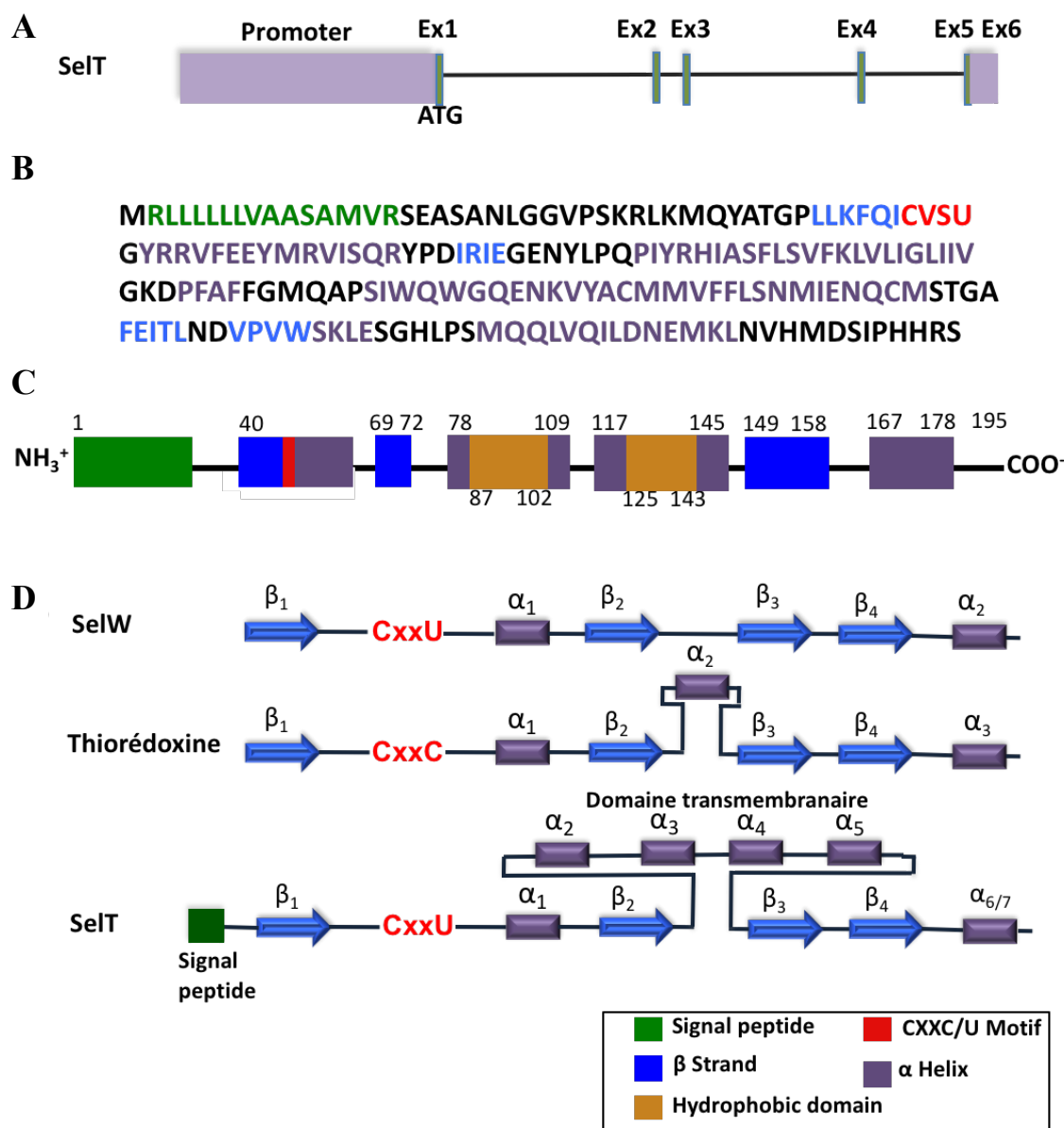


Figure 23. Structure de la SelT: A) Structure du gène de la SelT de souris formé de 6 exons (Ex) qui après transcription et épissage donne lieu à un ARNm contenant les codons initiateurs (ATG) et stop (TAG), et le codon de la Sec (TGA). L'exon 6 constitue la région 3' non codante de l'ARNm où est situé l'élément SECIS. B) et C) Séquence primaire de la SelT contenant le peptide signal (vert), les feuillets β (bleu), le motif CVSU (rouge) et les hélices α (brun). D) Comparaison des structures secondaires de 3 protéines homologues (SelW, thioredoxine et SelT). Ces enzymes ont en commun un motif de type thioredoxine (Trx) : β - α - β - β - α . La Trx possède une troisième hélice α_2 localisée entre les brins β_2 et β_3 tandis que la SelT possède quatre hélices α supplémentaires (Adapté de Moustafa et Antar, 2012).

III.2. Expression de la SelT

Une recherche dans les bases de données a montré que les séquences SelT sont peu abondantes dans les tissus humains, indiquant la faible expression de cette protéine chez l'adulte. En revanche, le tissu cérébral de l'enfant ou le placenta semblaient être enrichis en SelT (Kruyokov et al., 1999). Les études de distribution tissulaire menées dans notre unité ont confirmé l'expression abondante et diffuse de la SelT au cours du développement chez le rat, notamment dans le tissu nerveux, la thyroïde et le cœur (Grumolato et al., 2008; Tanguy et al., 2011). En revanche, cette expression décroît fortement dans la plupart des tissus après la naissance pour devenir quasiment indetectable chez l'adulte. Toutefois, l'expression de la SelT est exceptionnellement maintenue dans les cellules endocrines de l'hypophyse, du pancréas ou du testicule (Tanguy et al., 2011; Prevost et al., 2013). Dans ces tissus, l'analyse par microscopie confocale ou par microscopie électronique a révélé que la SelT est localisée dans le reticulum endoplasmique des cellules sécrétrices (**Figure 24**).

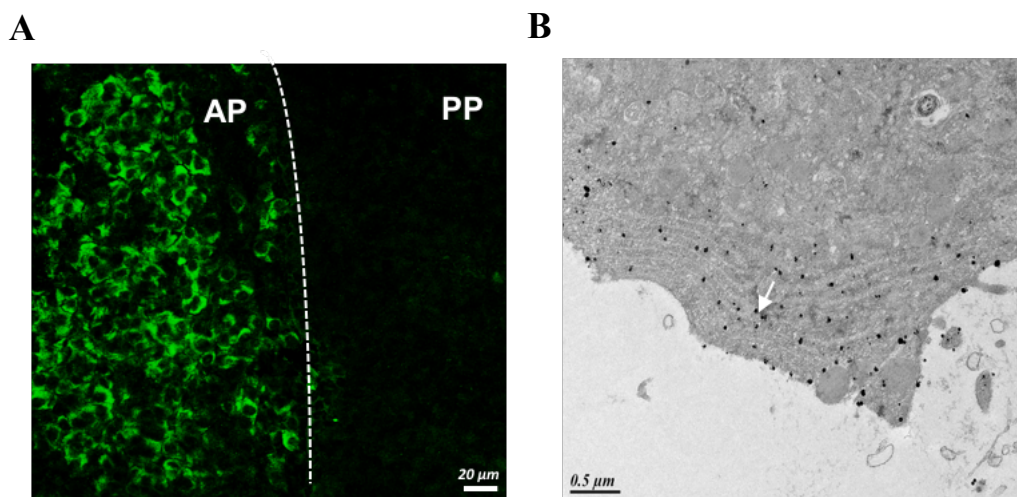


Figure 24. Localisation de la SelT dans les cellules endocrines de l'anté-hypophyse: (A) au niveau du réticulum endoplasmique (B). AP: anterior pituitary, PP: posterior pituitary (Adapté de Tanguy et al., 2011 et Hamieh et al., 2017).

Au niveau cérébral, les travaux de notre équipe ont mis en évidence la localisation de la SelT dans le lignage neural au cours de l'embryogenèse. En effet, dans le cortex cérébral en développement, cette sélénoprotéine est particulièrement abondante dans les neurones immatures en cours de migration et de différenciation. À la naissance, la SelT reste exprimée dans les neurones en cours de différenciation et également dans la glie radiaire, et ensuite la SelT n'est retrouvée que de manière résiduelle dans quelques cellules gliales chez l'adulte. De la même manière, la SelT est présente dans le cervelet en développement (**Figure 25**), au sein

des cellules en grain et des cellules de Purkinje en migration et en différenciation, et des cellules gliales. Elle est en revanche très peu exprimée dans le cervelet chez l'adulte à part dans quelques cellules gliales (Tanguy et al., 2011).

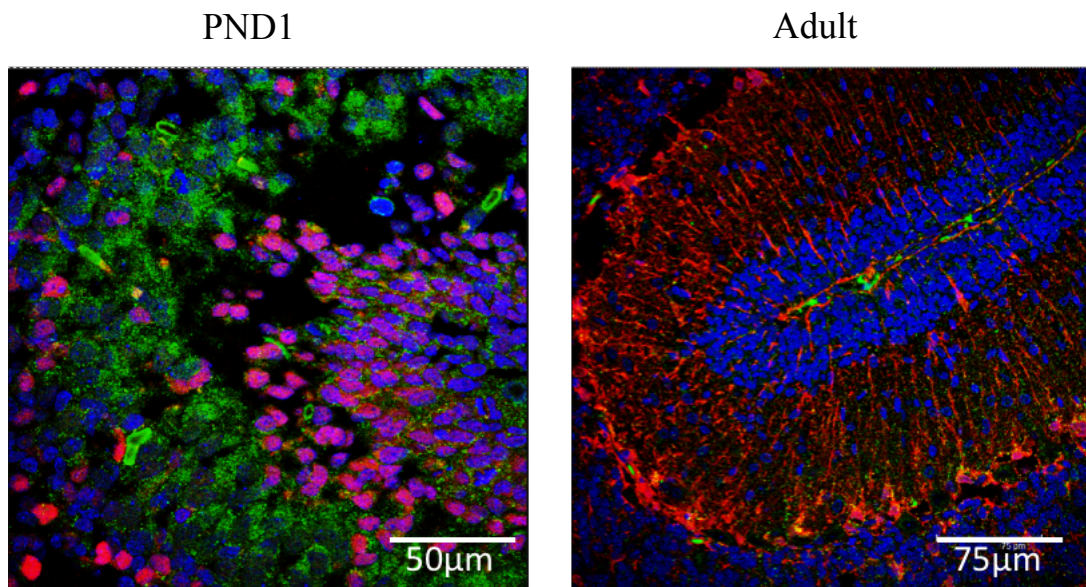


Figure 25. Localisation de la SelT: (vert) et du *neuronal nuclear antigen* «NeuN» dans le cervelet de rat au jour post-natal 1 (PND1) et chez l'adulte. Les noyaux sont colorés en bleu (d'après Tanguy et al., 2011; Boukhzar et al., 2016b).

III.3. Fonction de la SelT

Notre équipe a initialement identifié la SelT dans les cellules chromaffines tumorales au cours de leur différenciation par le neuropeptide PACAP (Grumolato et al., 2008). La localisation de la SelT dans le RE a orienté les recherches de notre équipe sur le rôle de cette protéine dans les phénomènes cellulaires de régulation du calcium et dans l'homéostasie protéique en relation avec la balance redox. Les chercheurs de notre équipe ont pu démontrer que la SelT joue un rôle clé dans l'action du PACAP sur la mobilisation du calcium intracellulaire, nécessaire à la sécrétion des catécholamines par les cellules neuroendocrines tumorales PC12 (**Figure 26**) (Grumolato et al., 2008).

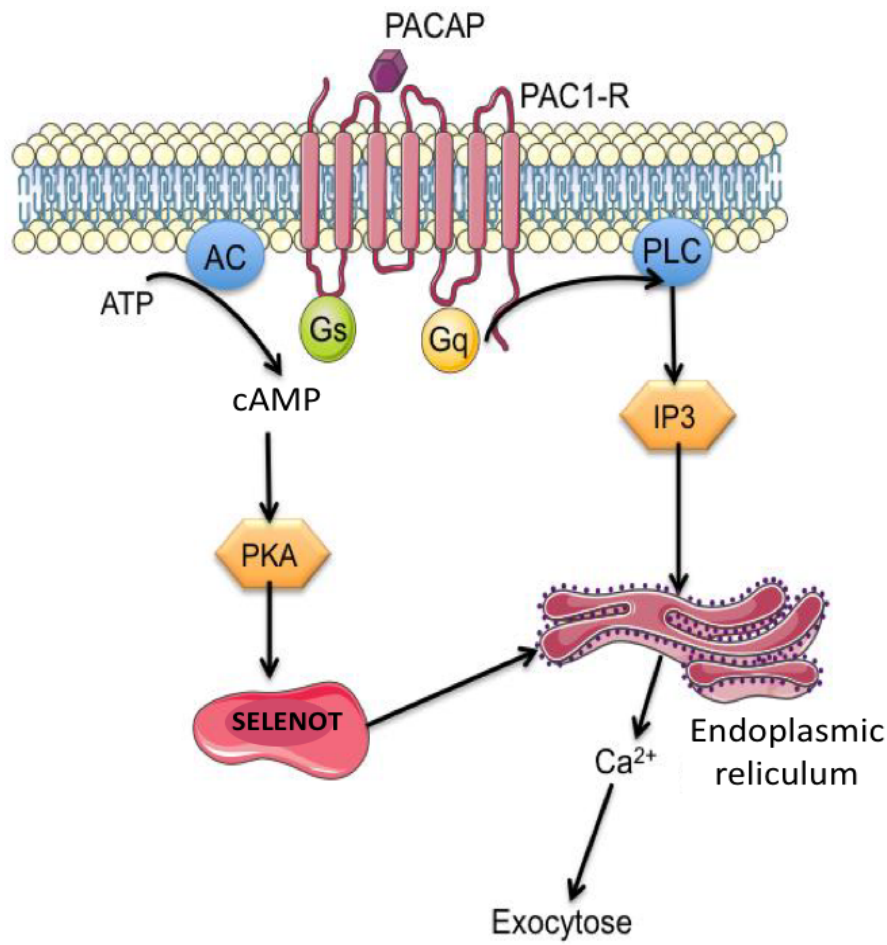


Figure 26. Modèle proposé pour l'implication de la SelT dans le contrôle de la mobilisation du calcium intracellulaire et la sécrétion hormonale pendant la différenciation des cellules PC12 après stimulation par le PACAP (D'après Grumolato et al., 2008 modifié dans Anouar et al., 2018).

Cette action sur la sécrétion hormonale a également été démontrée pour la libération d'insuline *in vivo* chez des souris *knockout* pour la SelT dans des cellules β -pancréatiques, ou *in vitro* dans des cellules β -pancréatiques stimulées par le PACAP après inhibition de la SelT par des siRNA (Prevost et al., 2013). Au niveau moléculaire, d'autres travaux de l'équipe soulignent l'importance de la SelT dans le RE au cours de la production de protéines destinées à être sécrétées (Hamieh et al., 2017). En effet, les chercheurs de l'équipe ont montré que la SelT fait partie du complexe oligosaccharyltransférase (OST) qui est impliqué dans la N-glycosylation et la maturation post-traductionnelle de glycoprotéines hormonales, pour lesquelles la formation de ponts disulfures est essentielle (**Figure 27**).

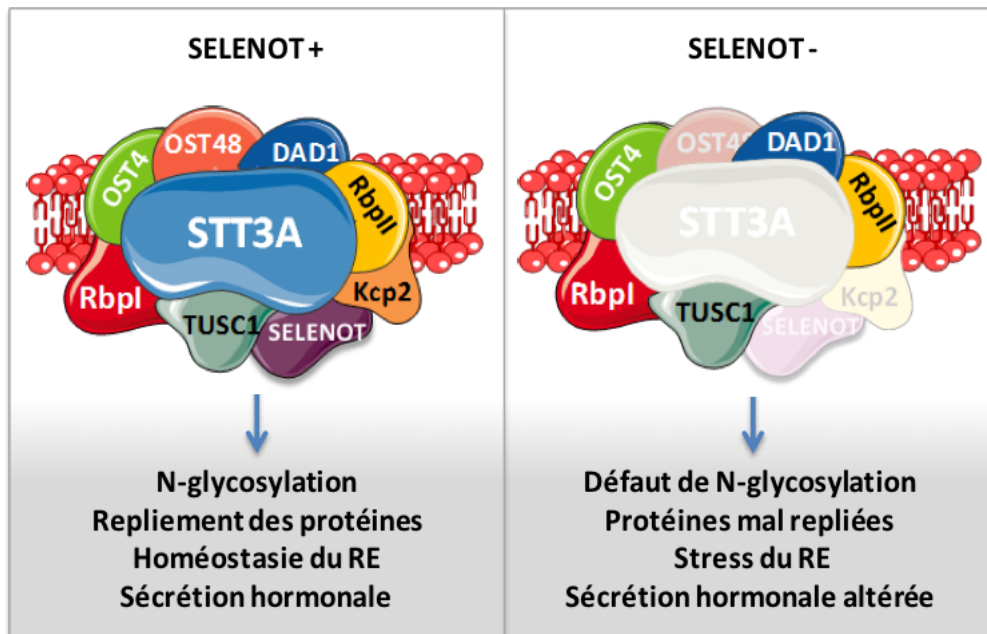


Figure 27. Modèle proposé pour l'intégration de la SelT dans le complexe OST constitué de plusieurs sous-unités et nécessaire pour assurer la N-glycosylation et la production des hormones: Son absence entraîne un défaut de glycosylation, l'accumulation de protéines mal-conformées, un stress du réticulum et une sécrétion hormonale altérée. (d'après Hamieh et al., 2017).

Par ailleurs, Sengupta et al., (2009) ont observé une altération de l'adhésion des fibroblastes murins suite à la répression de l'expression de la SelT au moyen d'ARN interférent. Dans ces cellules, l'inhibition de la SelT provoque une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la morphologie cellulaire, pouvant être à l'origine de ce phénotype. De même, l'absence de la SelT induit l'expression génique des oxydoréductases SelW, SOD1 ou encore DIO2, suggérant la mise en place d'un mécanisme compensatoire et un potentiel rôle d'oxydoréductase de la SelT. Ainsi, ces études évoquent des fonctions de la SelT au cours de la sécrétion/production de protéines et pendant le processus d'adhésion cellulaire via des mécanismes d'oxydoréduction encore indéterminés.

Afin d'élucider les fonctions physiologiques et physiopathologiques de la SelT, en particulier dans le cerveau, une approche d'invalidation génique de cette sélénoprotéine a été réalisée chez la souris, au sein de notre laboratoire. De façon fort intéressante, l'invalidation globale de la SelT provoque une mortalité précoce dès les premiers jours embryonnaires chez la souris (Boukhar et al., 2016a), soulignant le rôle essentiel de cette sélénoprotéine au cours du développement. Nous avons alors réalisé l'invalidation conditionnelle de la SelT dans le cerveau grâce au système Cre/Lox. Les animaux dépourvus de SelT dans le cerveau sont viables mais présentent un phénotype hyperactif et anxieux associé à des altérations neuroanatomiques.

Au niveau moléculaire, les chercheurs de l'équipe ont montré que la SelT est impliquée dans les mécanismes de contrôle du stress oxydatif et de la survie neuronale (Castex et al., 2016).

Dans une autre étude, nous avons mis en évidence une stimulation de la production de la SelT dans les neurones dopaminergiques dans un modèle murin de la maladie de Parkinson induite par le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP), une toxine ciblant ces neurones. Ces résultats suggéraient fortement un rôle de la SelT dans les mécanismes de protection des neurones dopaminergiques face au stress oxydatif. Une telle fonction a été confirmée chez les souris transgéniques dont le gène de la SelT est invalidé spécifiquement dans le cerveau. En effet, les neurones dopaminergiques des souris invalidées ont montré une grande vulnérabilité au MPTP et à la roténone, une autre neurotoxine affectant les neurones dopaminergiques, entraînant l'apparition de symptômes parkinsoniens sévères (akinésie, raideur et tremblements) au bout de quelques heures (1-2 h) après le début du traitement. Ce phénotype est associé à une accumulation de radicaux libres dans le système nigro-strié des souris et une altération de l'activité de la TH et par conséquent de la production de dopamine (Figure 28).

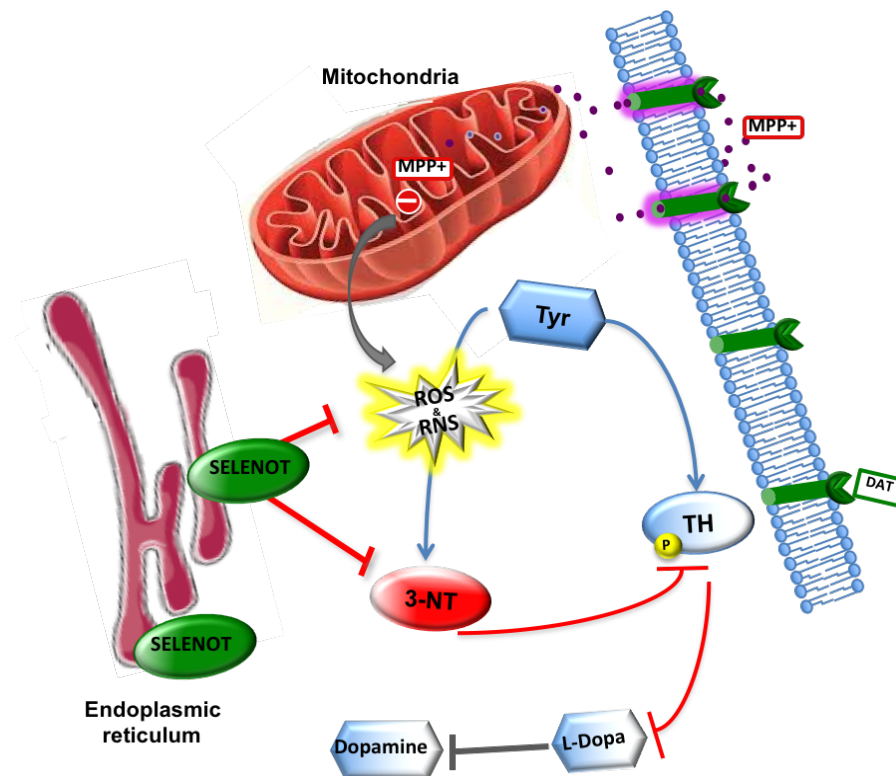


Figure 28. Schéma montrant le rôle de la SelT dans la protection des neurones dopaminergiques: En inhibant les radicaux libres induits par les neurotoxines tel que le MPTP et en favorisant la production de la dopamine par la TH dont l'activité peut être affectée par la nitrosylation des tyrosines (D'après Boukhzar et al., Springer 2016).

Nous avons aussi pu montrer que la SelT était capable de protéger des neurones dopaminergiques en culture contre un traitement par le 1-Methyl-4-phenylpyridinium iodide (MPP⁺), un dérivé du MPTP, ou contre le peroxyde d'hydrogène. A l'inverse, la suppression de son expression par des siRNA ou la mutation de la Sec en Ser dans le cœur actif augmentaient la sensibilité des neurones aux radicaux libres. Ces différentes données originales obtenues *in vivo* et *in vitro* ont permis de démontrer un puissant effet protecteur de la SelT au cours de la dégénérescence des neurones dopaminergiques, suggérant une possible application thérapeutique (Boukhzar et al., 2016a). Les différentes données actuellement disponibles sur la SelT et ses activités en physiologie et physiopathologie ont été récemment regroupées dans une revue à paraître dans le journal *Free Radical in Biology and Medicine* (Anouar et al., 2018).

Objectif de la thèse

Le stress oxydant semble être au centre de la physiopathologie de la MP mais également d'autres maladies neurodégénératives puisqu'il est à l'origine de la mort neuronale provoquée par l'altération des constituants cellulaires (Perfeito et al., 2013). Les neurones, notamment avec l'âge, sont vulnérables au stress oxydant en raison de leur forte consommation d'oxygène et de la teneur élevée des lipides, alors que leur système antioxydant est relativement faible (Salim 2016). Les antioxydants incluent un arsenal de facteurs de protection représentés par les enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase, la catalase ou les glutathion peroxydases et les agents antioxydants non-enzymatiques comme le glutathion ou certains oligoéléments (Jiang et al., 2016). Lorsque le système antioxydant devient insuffisant pour contenir l'excès de radicaux libres, le stress oxydant qui résulte de l'accumulation de substances toxiques peut entraîner la mort cellulaire comme dans le cas des neurones dopaminergiques dans la MP (Shukla et al, 2011).

Les sélénoprotéines peuvent jouer un rôle essentiel dans la survie neuronale et dans l'inhibition des processus neurodégénératifs via leurs propriétés antioxydantes et redox (Pillai et al., 2014). Une première indication du rôle important des sélénoprotéines dans la MP est la baisse du sélénium circulant chez les patients (Shahar et al., 2010), probablement en raison d'une synthèse accrue des sélénoprotéines pour protéger les neurones en dégénérescence. D'autre part, il a été montré que le taux de glutathion est réduit dès les stades précoces de la MP avant l'apparition des symptômes cliniques (Zeevalk GD, ce qui contribue à la baisse de l'activité peroxydase (Ambani et al., 1975). Il a été également montré que la GPx1 est présente dans les cellules microgliales et co-localise avec les CL (Power et Blumbergs, 2009). alors que la GPx4 co-localise avec la neuromélanine dans la SNc (Bellinger et al., 2011). L'expression de cette dernière sélénoprotéine qui est régulée par l'oxydation du gène muté dans la MP, DJ-1 (van der Brug et al., 2008) est altérée dans la SNc, les axones dystrophiques du striatum et dans le cortex de patients atteints de la MP (Blackinton et al., 2009; Bellinger et al., 2001) La SelP est également localisée dans les terminaisons présynaptiques du striatum, et son niveau rapporté au nombre de cellules est plus élevé dans la SNc de patients analysée post-mortem (Bellinger et al., 2012).

Même si ces données récentes suggèrent que les sélénoprotéines peuvent jouer un rôle important dans la protection des neurones et notamment des neurones dopaminergiques, il n'existe aucune étude reliant directement une sélénoprotéine à la fonction de ces neurones, en

particulier parmi les membres décrits plus récemment. Nos résultats récents ayant montré que dans des modèles de la MP chez la souris, la SelT pourrait exercer une activité neuroprotectrice et que cet effet est porté par son cœur actif renfermant le Se au niveau de la Sec du motif Cys-Ser-Val-Sec, nous avons émis l'hypothèse qu'un petit peptide, nommé PSELT, portant cette séquence pourrait également exercer cette activité et représenter ainsi un outil thérapeutique potentiel dans la maladie de Parkinson pour laquelle il n'existe aucun traitement curatif ou préventif à l'heure actuelle. L'objectif de cette thèse était donc de:

- 1- Montrer que le peptide PSELT pourrait exercer une activité protectrice *in vitro* dans un modèle de dégénérescence de neurones dopaminergiques.
- 2- Montrer que le peptide PSELT pourrait exercer une activité protectrice *in vivo* dans un modèle de la MP chez la souris après administration intranasale.
- 3- Montrer les effets bénéfiques du peptide PSELT au niveau fonctionnel, en réversant les effets délétères sur la motricité observés chez les modèles animaux de la MP.

MATERIELS

&

METHODES

1. Synthèse peptidique

Le peptide PSELT (FQICVSUGYR) oxydé et réduit, le peptide PSELT-TAT (FQICVSUGYRYGRKKRRQRRR) et le peptide PSELT-dansyl ont été synthétisés en phase solide en utilisant des résines Fmoc et un synthétiseur de peptide Applied Biosystems (ABI, Villebon sur Yvette, France) (Leprince et al., 1998).

2. Études *in vitro*

Des modèles cellulaires qui reproduisent certaines des caractéristiques des neurones dopaminergiques ont contribué à de nombreuses avancées dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la maladie. Les altérations des processus biochimiques liés à la MP sont induites soit par des mutations de gènes pertinents soit par l'utilisation de toxines liées à cette pathologie comme le MPP⁺ ou la roténone (Alberio et al., 2012).

Toutes les études *in vitro* de ce travail de thèse ont été réalisées sur les cellules SH-SY5Y (cellules catécholaminergiques) largement utilisées comme modèle *in vitro* mimant la dégénérescence des neurones dopaminergiques. La lignée cellulaire de neuroblastome SH-SY5Y humaine (ATCC, Manassas, VA) a été cultivée dans un milieu Eagle's modifié par Dulbecco (DMEM) (Life Technologies, Saint Aubin, France) supplémenté avec du sérum de veau fœtal à 10% (Lonza, Levallois, France), 1% de L- glutamine, 50 U/ml de pénicilline et 50 U/ml de streptomycine (Life Technologies). Les cellules ont été maintenues dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂ à 37° C.

2.1. Traitement des cellules et mesure de la viabilité cellulaire

Les cellules SH-SY5Y ont été traitées par du MPP⁺ (500 µM) pendant 36 h en présence ou en absence du peptide PSELT (10 µM) sous sa forme oxydée ou réduite. Le nombre de cellules viables a été déterminé en utilisant le test CellTiter-Blue® de viabilité cellulaire (Promega, Madison, WI) basé sur la conversion redox du réactif resazurine en un produit final fluorescent, la résorufine. La figure suivante montre le protocole de traitement des cellules (**Figure 29**).

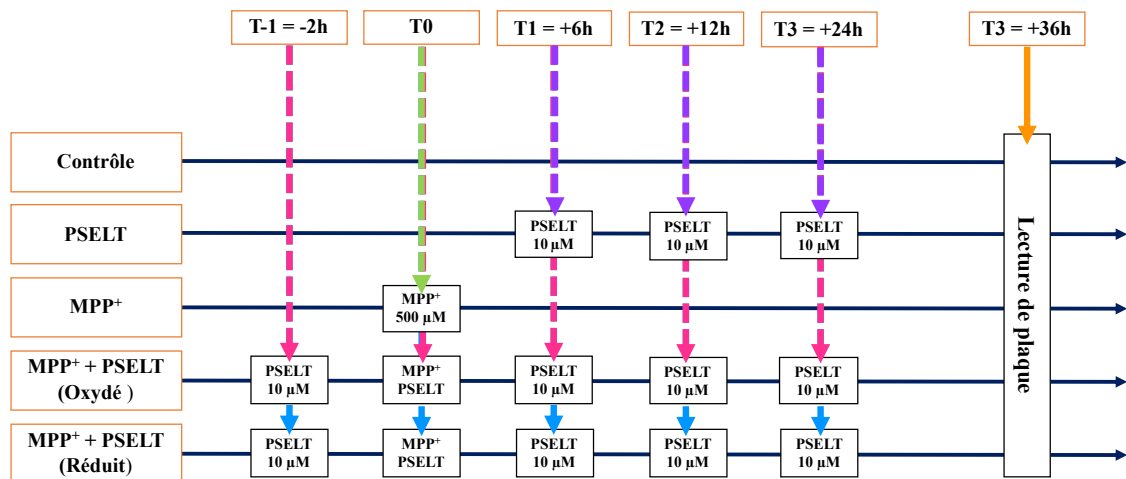


Figure 29. Protocole d'expérimentation cellulaire: Les cellules de neuroblastome SH-SY5Y ont été traitées par du MPP⁺ (500 µM) pendant 36 h en présence ou en absence du peptide PSELT oxydé ou réduit. La viabilité des cellules SH-SY5Y a été mesurée grâce au test de viabilité Cell Titer blue.

Afin d'étudier le site d'action du peptide PSELT, les cellules SH-SY5Y ont été incubées pendant 2 h ou 4 h avec PSELT-dansyl le fluorescent à une concentration de 5 µM (**Figure 30**). Le marquage a été analysé par microscopie confocale.

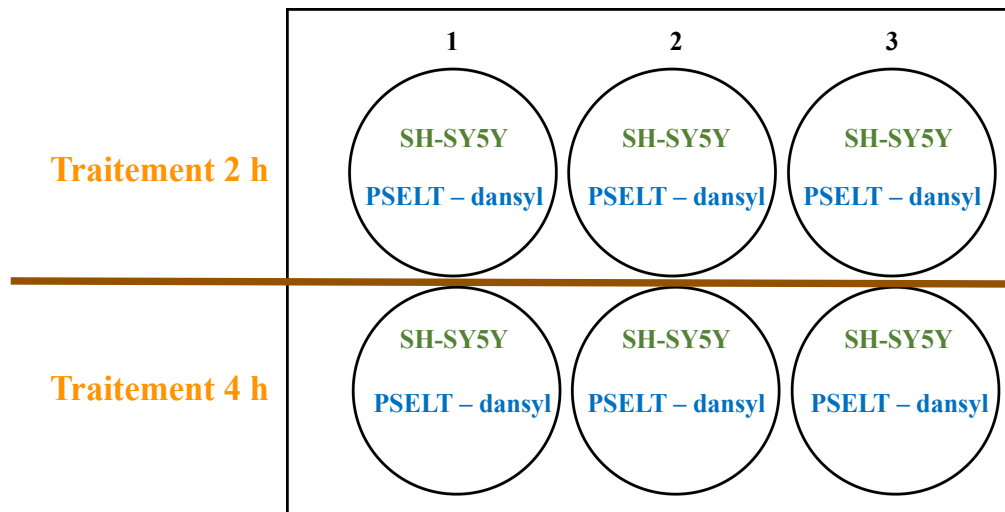


Figure 30. Traitement des cellules par le PSELT marqué au dansyl: Les cellules de neuroblastome ont été cultivées dans une plaque de 6 puits pendant 24 h et ont ensuite été incubées en présence du PSELT-dansyl pendant 2 h et 4 h.

2.2. Mesure des niveaux de radicaux libres

Les radicaux libres intracellulaires hydroxyl, peroxy et autres ERO ont été mesurés en utilisant le kit de détection des radicaux libres cellulaires grâce au réactif 2', 7' - dichlorofluorescéinediacétate (DCFDA) (Abcam, Paris, France) suivant le protocole schématisé ci-dessous (**Figure 31**). La fluorescence du 2', 7' -dichlorofluorescéine (DCF) oxydé par les ERO a été mesurée à 530 nm.

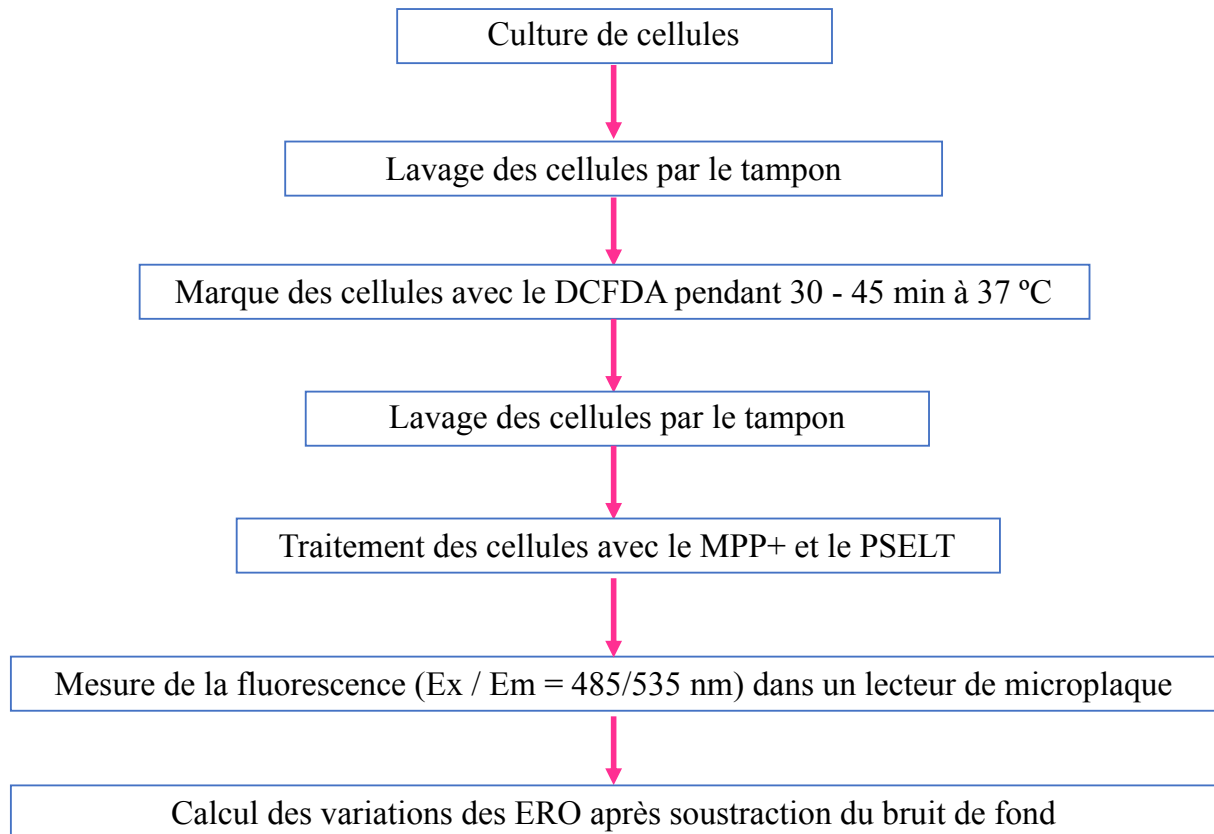


Figure 31. Schéma récapitulant les différentes étapes du protocole expérimental de mesure des ERO à l'aide de la sonde DCFDA *in vitro*.

3. Études *in vivo*

3.1 Animaux

Toutes les expériences ont été réalisées en utilisant des souris C57Bl/6j mâles, âgées d'environ 12 semaines et d'un poids moyen de 24-29 g. Les souris ont été hébergées en cages collectives (5 par cage) sous conditions contrôlées de température de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ avec un cycle lumière/obscurité de 12 h, avec libre accès à l'eau et à la nourriture. Toutes les procédures expérimentales ont été approuvées par le Comité d'éthique régional de Normandie (Autorisation n° 05-02-13/13 /02-16) et ont été réalisées conformément à la Directive de l'Union Européen

du 24 novembre 1986 (86/609/CEE).

3.2. Administration du PSELT

Nous avons dans un premier temps étudié la capacité du peptide PSELT à atteindre le système nigro-strié après administration par voie intranasale. Pour ce faire, nous avons utilisé un peptide PSELT couplé à un peptide TAT afin de localiser le PSELT dans le cerveau grâce à un anticorps dirigé contre le peptide TAT (**Figure 32**).

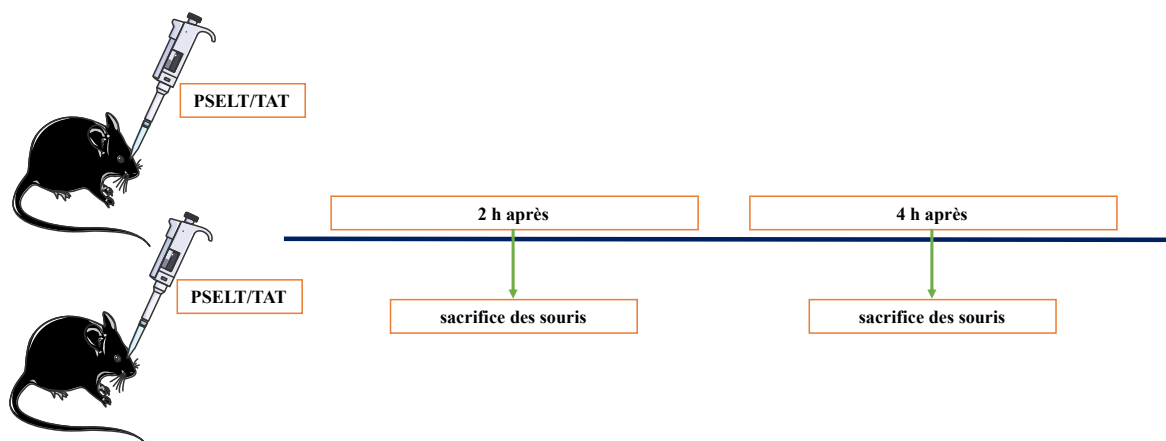
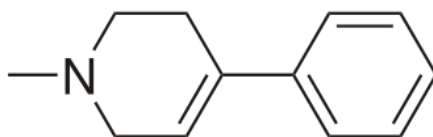


Figure 32. Schéma expérimental montrant le protocole expérimental d'administration du peptide PSELT lié au TAT chez la souris C57Bl/6j par voie intranasale.

3.3 Traitements par le MPTP

Le MPTP dont la formule chimique est montrée dans la **figure 33** a été utilisé pour mimer le parkinsonisme chez la souris.



MPTP: C₁₂H₁₅N

Figure 33. Structure et formule chimique du MPTP.

Dans ce travail de thèse, plusieurs protocoles d'administration du MPTP et d'analyse du comportement ont été utilisés:

3.3.1. Protocole expérimental n° = 1

Dans ce protocole, nous avons choisi la procédure utilisée par Ciesielska et ses collaborateurs avec une dose administrée de MPTP de 60 mg/kg en 4 injections de 15 mg/kg en intrapéritonéale (i.p.) toutes les 2 h. Ce protocole d'administration induit une dégénérescence des neurones dopaminergiques qui se rapproche du stade précoce de la MP (Ciesielska et al., 2009).

Typiquement, les animaux ont été divisés en 4 groupes de 5 à 10 animaux :

- Groupe 1 (G1) : animaux contrôles traités uniquement par du NaCl 0.9% .
- Groupe 2 (G2) : animaux traités uniquement par le PSELT 30µg/10µl de tampon.
- Groupe 3 (G3) : animaux traités uniquement par du MPTP.
- Groupe 4 (G4) : animaux traités par du MPTP et du PSELT.

Au début de l'expérience, les souris reçoivent par voie intrapéritonéale 4 doses de MPTP-HCl (Sigma-Aldrich) à 15 mg/kg ou du tampon à 2 h d'intervalle. Ensuite, les animaux reçoivent 1 injection intranasale (i.n.) de 30 µg/10 µl de PSELT (5 µl/narine) ou du tampon quotidiennement pendant 5 j. Des tests de comportement accompagnant les traitements ont été réalisés comme expliqué dans le schéma suivant (**Figure 34**).

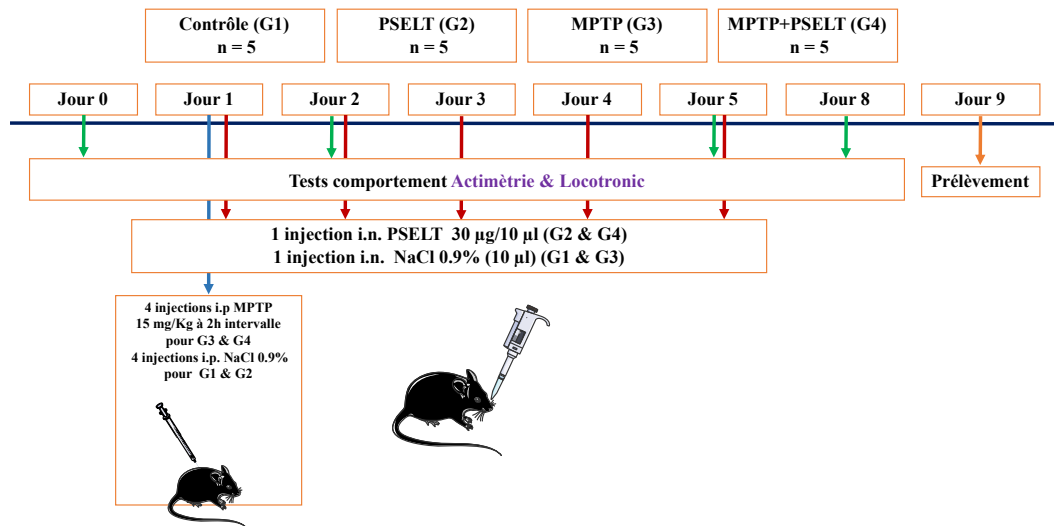


Figure 34. Schéma du protocole expérimental n° = 1 utilisé pour l'administrateur de MPTP et de PSELT ou du tampon chez les animaux traités ou contrôle.

3.3.2 Protocole expérimental n° = 2

Les animaux ont été divisés en 4 groupes expérimentaux: contrôle ayant reçu uniquement du NaCl 0.9% (G1), un groupe traité par le PSELT (G2), un groupe traité par le MPTP (G3) et un groupe traité par le MPTP et le PSELT (G4). Les souris des groupes 3 et 4 ont reçu des injections par voie i.p. de 30 mg/kg de MPTP du jour 0 jusqu'au jour 4. Les souris des groupes 2 et 4 ont reçu 1 injection par voie i.n. de 30 µg/10 µl de PSELT (5 µl/narine) quotidiennement pendant 5 j. Les animaux témoins ont été traités uniquement avec du NaCl par voie i.p. et par voie i.n.. Des tests de comportement accompagnant les traitements ont été réalisés suivant le schéma ci-dessous (**Figure 35**).

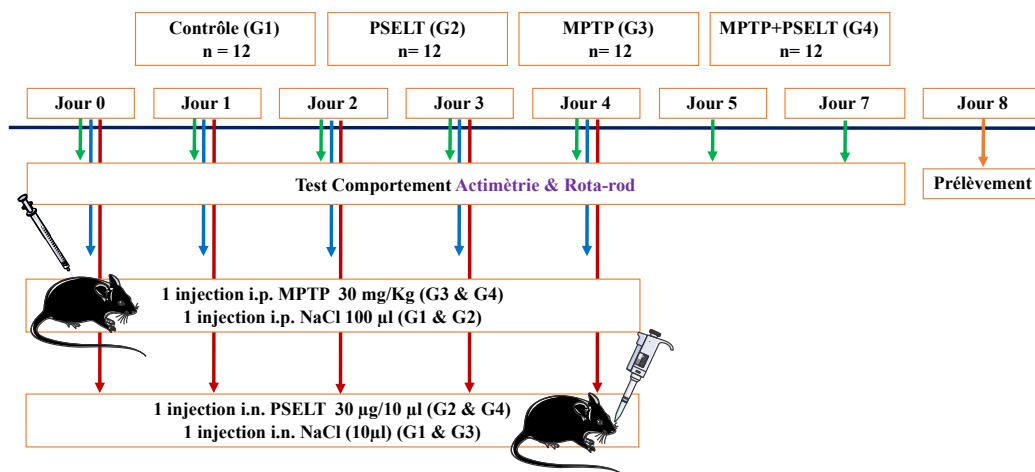


Figure 35. Schéma du protocole expérimental n° = 2 montrant les temps utilisés pour l'administration du MPTP et du PSELT ou du tampon salin.

3.3 Tests de comportement

L'objectif des analyses comportementales est d'évaluer la capacité du peptide PSELT à inhiber les troubles moteurs dans les modèles de la MP chez la souris. Plusieurs tests de comportement ont été utilisés au cours de cette étude. Ces tests ont permis d'évaluer:

- 1- L'activité motrice globale à l'aide d'un **actimètre** « **Open field** »,
- 2- La coordination motrice des animaux à l'aide du test du **rotarod**.

3.3.1 Évaluation de l'activité motrice globale : Actimétrie «Open field»

L'actimètre «Open field» permet d'évaluer le retard moteur, la réponse à la nouveauté, le mécanisme d'habituation, l'exploration, les réponses au stress, l'anxiété, les effets sédatifs, les rythmes circadiens, etc (Ghoshet al., 2012). L'actimètre utilisé mesure L= 20cm, I= 20cm et H= 30cm, et est équipé de deux barres contenant des faisceaux infrarouges situés à deux

hauteurs différentes. Il permet de quantifier 3 types de mouvements: horizontaux, stéréotypés et les redressements (Belujon et al., 2007). Les tests sont réalisés dans des pièces calmes et les souris sont placées dans la salle d'expérimentation 30 min avant le test, permettant ainsi aux animaux de s'acclimater à ce nouvel environnement et d'éviter les réponses de type néo-phobiques. Chaque souris a été placée dans l'actimètre pendant 30 min et son activité a été enregistrée automatiquement comme montré dans les images suivantes (**Figure 36**).

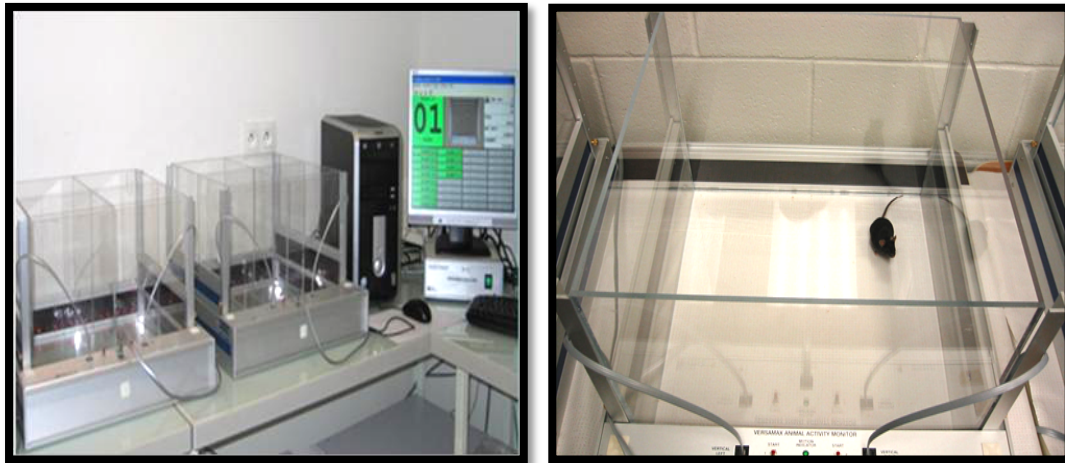


Figure 36. Photographie de l'équipement utilisé et d'une souris placée dans l'actimètre au cours du test.

3.3.2. Évaluation de la coordination motrice par le rotarod

Le rotarod est un test standard pour l'évaluation de la coordination motrice, l'équilibre et la fatigue des rongeurs. Il constitue une solution idéale pour étudier les dommages du système nerveux central et les effets de différentes pathologies sur la coordination motrice. Le rotarod Rotamex™ rotarod (Columbus Instruments, Columbus, OH) utilisé est constitué de cylindres en plastique de 3 cm de diamètre qui forment quatre compartiments identiques. Les animaux ont été placés pendant 4 min (240 sec) sur le tambour face au mur de telle sorte que le cylindre ait un sens de rotation opposé à la direction de l'animal comme montré dans la photographie ci-dessous (**Figure 37**).

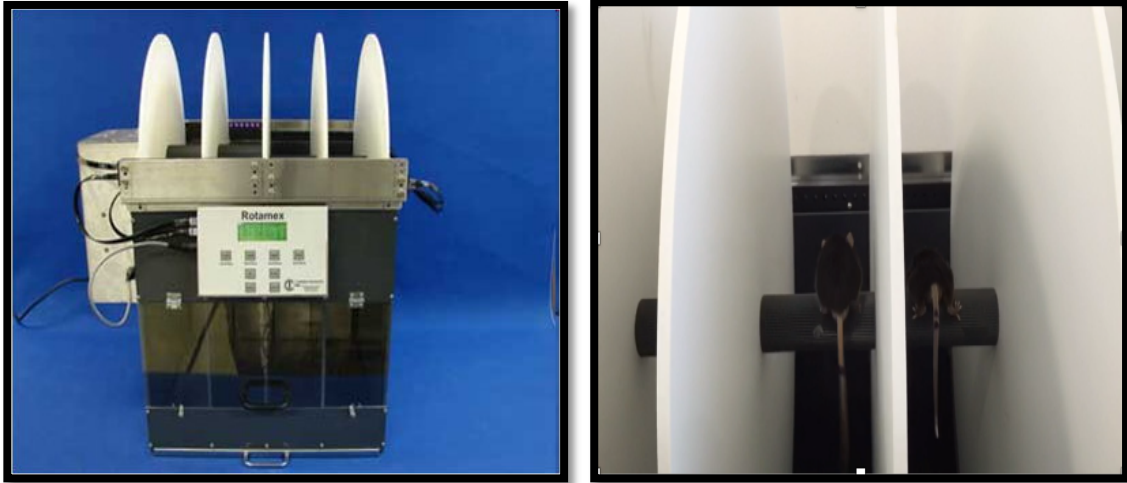


Figure 37. Photographie du rotarod utilisé et des souris placées sur le tambour à voies multiples: L'animal est placé sur le tambour à voies multiples du rotarod et le temporisateur est démarré. Lorsque l'animal tombe, en toute sécurité dans son propre couloir, le temps de chute (en minutes et secondes) et la vitesse de rotation sont automatiquement enregistrés.

4. Immunohistochimie

Les animaux ont été anesthésiés avec du pentobarbital de sodium (120 mg/kg, Ceva Santé Animale, Libourne, France), héparinés et perfusés par une canule intracardiaque avec 0,9% de NaCl dans du tampon phosphate 0,1 M (pH 7,4), puis 4% de paraformaldéhyde (PFA), dans du PBS. Les cerveaux ont été prélevés et postfixés dans le même fixateur à 4°C, qui a été remplacé par du sodium azide après 24 h. Les tissus ont été coupés en tranches de 40 µm avec levibratome. Les coupes ont été incubées avec du serum d'âne à 1% dilué dans du BSA à 1% et du Triton X-100 à 0,3% dans du PBS pendant 2 h à température ambiante, puis exposées pendant une nuit à 4°C à des anticorps primaires, anti-TH dilué 1 :200 (Millipore, Temecula, CA) pour marquer les neurones et les fibres dopaminergiques et anti-Cleaved Caspase-3 dilué 1: 400 (Cell Signaling, Danvers, MA) pour révéler les cellules apoptotiques. L'immunocoloration a été visualisée en utilisant des anticorps secondaires conjugués à l'Alexa Fluor 488 ou 594 dilués à 1 :200 (Invitrogen, Saint Aubin, France). Une contre-coloration avec du 4,6-diamino-2-phénylindole (DAPI, Sigma-Aldrich) à 1 pg/ml dans du PBS pendant 1 min a été effectuée avant le montage des lames avec du PBS / Glycerol 50/50.

Les échantillons ont été analysés à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser Leica SP2 (DMRAX-UV) équipé du système Acousto-Optical Beam Splitter (Leica Microsystems, Nanterre, France).

5. Western blot

5.1. Préparation et dosage des protéines

Les animaux ont été anesthésiés par inhalation d'isoflurane (AErrane ®, Baxter, Maurepas, France) et les cerveaux ont été immédiatement prélevés après décapitation. Les échantillons ont ensuite été placés dans de la glace. Les tissus prélevés ont été homogénéisés dans un tampon de lyse (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France) à 4°C suivi par une sonication des échantillons pendant 10 sec. Les échantillons ont été par la suite centrifugés à 13000xg pendant 20 min à 4°C, les protéines présentes dans le surnageant sont récupérées et transférées dans de nouveaux eppendorfs avant de procéder au dosage des protéines. Le dosage est réalisé à l'aide du Kit *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* de Bradford (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). Une gamme d'étalonnage d'albumine bovine est réalisée en parallèle, comprenant 6 points de concentration croissante de 0 à 40 µg/ml.

5.2. Migration et séparation

Le marqueur de poids moléculaire utilisé couvre une gamme de poids moléculaire de 10 kD à 180 kDa (Thermo Scientific, Rockford, IL). Les gels d'électrophorèse des protéines sont des gels à base d'acrylamide et Bis acrylamide (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) contenant le détergent SDS. Au volume correspondant à 40 µg de protéines est ajouté le tampon de Laemmli pour un volume final de 50µl. Le mélange est chauffé 1 min à 95°C, puis déposé dans le gel d'acrylamide en présence du détergent SDS. La migration à ampérage constant dans une cuve contenant le tampon de migration (Tris/Glycine/SDS) est réalisée à 110V pendant 1 h30.

5.3. Transfert des protéines

Le gel est placé en sandwich avec une membrane de PVDF ou de nitrocellulose (GE Healthcare, France). Le transfert des protéines est ensuite réalisé à voltage constant dans la cuve contenant le tampon de transfert (Tris/Glycine/Ethanol) pendant 1 h.

5.4. Immunodétection des protéines d'intérêt

Après le transfert des protéines, les membranes sont ensuite incubées dans une solution de saturation contenant 5% de lait et 0,5% de BSA dans le tampon PBS pendant 1 h à température ambiante, pour bloquer les sites d'interactions non spécifiques, puis rincées avec du PBS et incubées à nouveau dans une solution contenant l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt à 4°C pendant la nuit (**Table 3**). Après 3 cycles de lavage de 10min avec une solution de PBS contenant du Tween 20 à 0,5%, les membranes sont incubées 1 h à température ambiante, sous agitation avec un anticorps secondaire (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) dilué au 1/2000ème et lavées trois fois avec du PBS-Tween 0,5%. La détection est réalisée par

chimiluminescence, au moyen du kit Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) et d'un appareil *ChemiDoc XRS+ System* (BioRad). Après numérisation, les valeurs de densité optique tout obtenues au moyen du logiciel Image J.

Tableau 3. Liste des anticorps utilisés en western blot

	Espèce	Dilution	Fournisseur
Tyrosine hydroxylase	Souris	1 :1000	Millipore
α -Tubulin	Souris	1:1000	Sigma-aldrich

6. Dosage de la dopamine

Les concentrations de dopamine dans les homogénats de striatum ont été déterminées en utilisant un kit Elisa pour la mesure de la dopamine de souris suivant les instructions du fabricant (Mybiosource, San Diego, CA). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM et représentent les données provenant d'au moins trois expériences indépendantes.

7. Analyse statistique

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel GraphPad Prism 7 en utilisant le test *t* de Student ou le test *U* de Mann-Whitney.

RESULTATS

1. Effet protecteur du PSELT sur les cellules de neuroblastome SH-SY5Y contre la dégénérescence cellulaire induite par le MPP⁺ *in vitro*

Dans le but de tester l'effet de différents peptides dérivés du centre actif de la Selt, des formes oxydée (PSELTo) et réduite (PSELTr) de différentes tailles ont été synthétisées et testées *in vitro* sur des cellules de neuroblastome SH-SY5Y traitées par 500 μ M de MPP⁺. L'analyse des résultats suite à la mesure de la viabilité cellulaire a montré que la forme réduite de PSELT de 10 acides aminés exerce un effet protecteur contre la toxicité induite par le MPP⁺ comme montré dans la **figure 38A**. Afin de vérifier si l'effet protecteur du PSELTr est exercé en intra ou extracellulaire, une forme du PSELTr marquée au Dansyl a été utilisée. L'analyse des cellules traitées au PSELTr-Dansyl par microscopie confocale a révélé que le peptide PSELTr traverse la membrane cellulaire et pénètre dans les cellules dès 2h d'incubation, indiquant que le PSELTr exerce probablement son activité à l'intérieur des cellules (**Figure 38 B**). Dans la suite de ce manuscrit, le nom de la PSELT représentera le PSELTr.

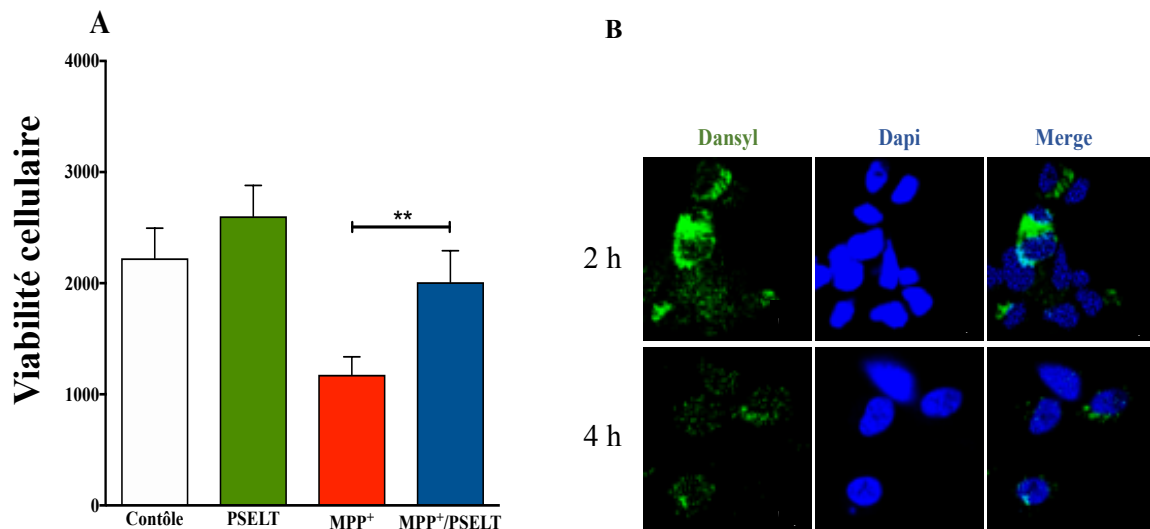


Figure 38. Le peptide PSELT protège les cellules SH-SY5Y de la mort cellulaire induite par le MPP⁺, en pénétrant dans ces cellules: (A) Les cellules SH-SY5Y ont été traitées par du MPP⁺ (500 μ M) pendant 36 h en présence ou en absence du peptide PSELT réduit (10 μ M). La viabilité des cellules SH-SY5Y a été mesurée grâce au test de viabilité Cell Titer blue. ****** $p < 0,001$ (Student's *t*-test). (B) Les cellules SH-SY5Y ont été traitées pendant 2 h ou 4 h avec le peptide PSELT-dansyl fluorescent (5 μ M). La fluorescence du peptide PSELT-dansyl a été ensuite visualisée en vert et les noyaux ont été visualisés en bleu en utilisant le DAPI.

2. Le peptide PSELT diminue le taux des radicaux libres dans les cellules de neuroblastome traitées par le MPP⁺

Plusieurs études ont confirmé l'implication des radicaux libres dans la physiopathologie de la MP suite à un dysfonctionnement au niveau de la chaîne mitochondriale de transport des électrons, induisant ainsi une forte libération de radicaux libres (Dauer et Przedborski, 2003). La neurotoxine MPP⁺ reproduit ce dysfonctionnement dans des modèles de neurones dopaminergiques *in vitro* tels que les cellules de neuroblastome SH-SY5Y. L'analyse par microscopie confocale du niveau des radicaux libres marqués à l'aide de la sonde DCFDA, a montré une augmentation considérable de la teneur en radicaux libres dans les cellules de neuroblastome 6h après traitement par le MPP⁺ par rapport au contrôle (**Figure 39A**). Le traitement des cellules par le PSELT dans ces conditions entraîne une baisse des niveaux intracellulaires des radicaux libres libérés sous l'effet du MPP⁺ (**Figure 39A**). La quantification de l'intensité de la fluorescence par le logiciel image J a confirmé ces résultats avec une différence statistiquement significative des niveaux intracellulaires des radicaux libres entre les cellules traitées uniquement par le MPP⁺ et les cellules traitées par le MPP⁺ et le PSELT (**Figure 39B**). Ainsi, dans ces conditions de stress oxydatif intense induit par le MPP⁺, nous avons trouvé que le peptide PSELT exerce une importante activité antioxydante en réduisant les radicaux libres et en protégeant les cellules SH-SY5Y.

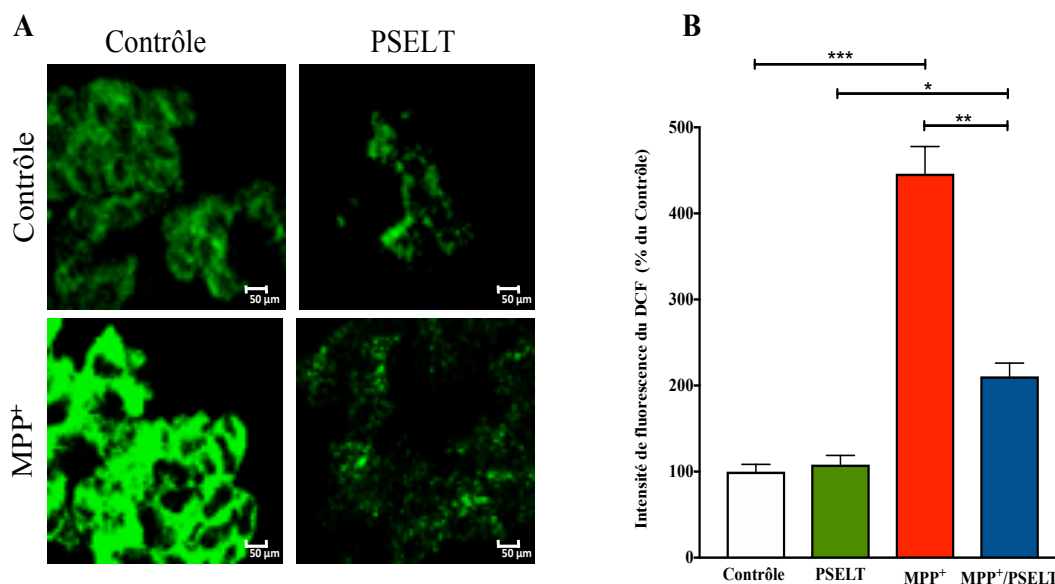


Figure 39. Effet du peptide PSELT contre le stress oxydatif: (A) Les cellules SH-SY5Y ont été exposées au MPP⁺ (1 mM) pendant 6 h en présence ou en absence du peptide PSELT (10 µM). La sonde DCFDA a été ensuite ajoutée pendant 20 min pour évaluer la production des radicaux libres. La fluorescence du DCF a été analysée par microscopie confocale. (B) La fluorescence du DCF a été quantifiée par Image J. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001. (Student's *t*-test).

3. Effet inhibiteur du peptide PSELT sur l'activité caspase-3/7 dans les cellules de neuroblastome SH-SY5Y traitées par le MPP⁺

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont montré que le MPTP ou son métabolite actif le MPP⁺, entraînait une mort cellulaire par apoptose (Yoshinaga et al., 2000) impliquant le stress oxydant qui est responsable de l'oxydation accrue des lipides, de l'ADN et des protéines. L'analyse de l'activité des caspases 3 et 7, acteurs principaux de l'apoptose (Friedlander, 2003) dans les cellules de neuroblastome traitées par le MPP⁺ en présence ou en absence du peptide PSELT a montré un effet inhibiteur du peptide sur l'activité de ces enzymes. Ainsi, une différence statistiquement significative entre le groupe MPP⁺ et le groupe MPP⁺/PSELT concernant l'activité des caspases est observée (**Figure 40**).

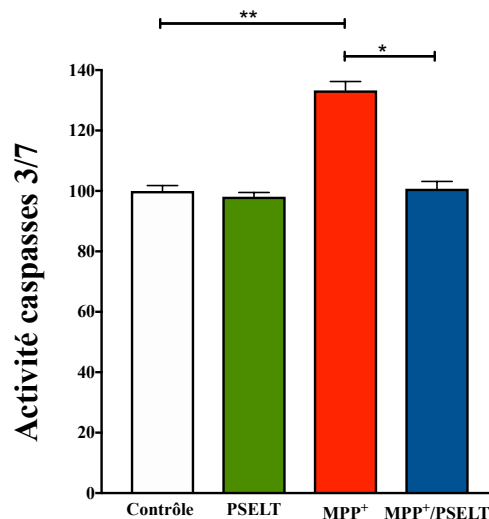


Figure 40. Le peptide PSELT inhibe l'activité caspase dans les cellules SH-SY5Y traitées par le MPP⁺: Les cellules SH-SY5Y ont été exposées au MPP⁺ (1 mM) pendant 6 h en présence ou en absence du peptide PSELT (10 μ M). L'activité des caspases 3/7 a été évaluée dans les cellules SH-SY5Y en utilisant le kit Apo-ONE. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Mann-Whitney *U* test).

4. Étude de la capacité du peptide PSELT à atteindre le système nigro-strié *in vivo* après administration par voie intranasale

Afin d'examiner la capacité du PSELT à atteindre le système dopaminergique central, le peptide lié à une séquence TAT de 30 μ g/ 10 μ l a été administré *in vivo* par voie intranasale chez la souris C57BL/6j. Nous avons utilisé la forme liée au TAT pour pouvoir détecter le PSELT par immunohistochimie à l'aide de l'anticorps anti-TAT dont nous disposons. L'analyse des cerveaux de ces animaux par microscopie confocale a révélé que le peptide PSELT a pu atteindre les zones cérébrales contenant les neurones et les terminaisons dopaminergiques

marquées à la TH 2 h après son administration (**Figure 41A**). Le peptide est plus fortement concentré dans les neurones TH positifs au bout de 4h après administration intranasale (**Figure 41B**).

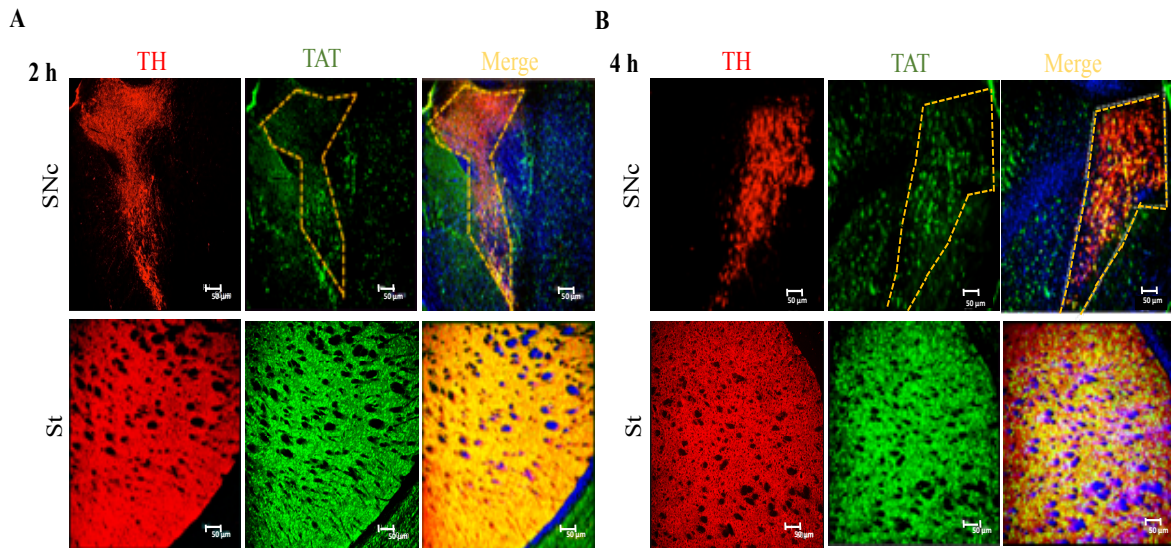


Figure 41. Localisation du peptide PSELT dans le striatum et la substance noire 2 h (A) et 4 h (B) après injection intranasale: Les souris ont reçu une injection i.n. de 30 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ du peptide PSELT (5 $\mu\text{l}/\text{narine}$). Les souris ont été sacrifiées 2 h et 4 h après l'administration. Les cerveaux ont été analysés par immunohistochimie à l'aide de l'anticorps anti-TH et l'anticorps anti-TAT pour marquer respectivement les neurones dopaminergiques et le peptide lié au TAT dans la substance noire (SNc), et dans le striatum (St). La SNc est entourée par les pointillés.

5. Étude de l'effet du peptide PSELT sur la dégénérescence dopaminergique induite par le MPTP

Afin d'évaluer *in vivo* l'effet du peptide PSELT sur la neurodégénérescence induite par l'administration du MPTP chez la souris C57BL/6j, les cerveaux des souris ont été prélevés et analysés par immunohistochimie afin de détecter l'immunoréactivité de la TH. Les résultats ont montré une activité protectrice du PSELT contre l'effet neurotoxique du MPTP sur les neurones dopaminergiques de la substance noire et leurs terminaisons dans le striatum. (**Figure 42**).

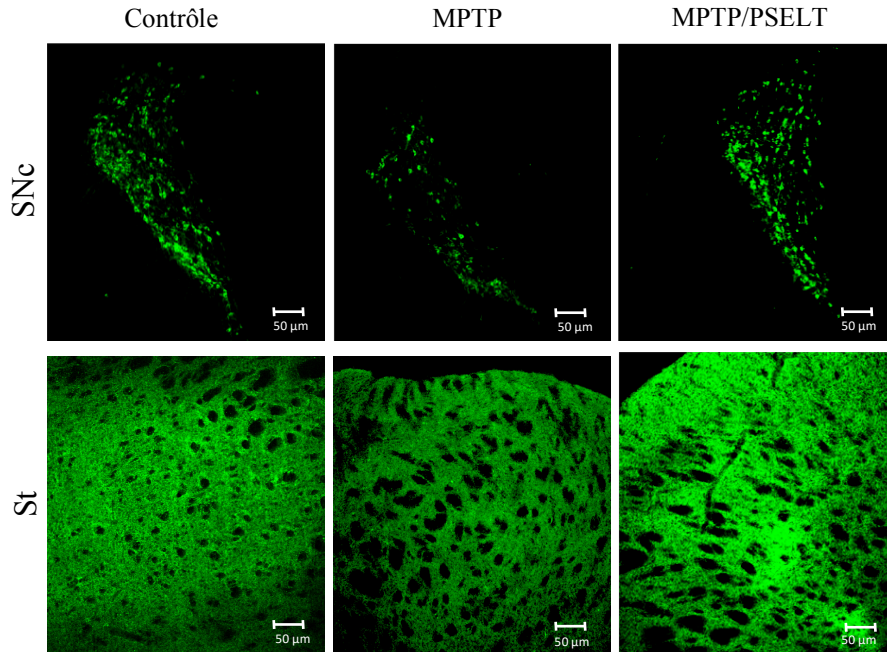


Figure 42. Le peptide PSELT protège le système dopaminergique dans un modèle de la maladie de Parkinson: Les souris ont reçu 4 injections intrapéritonéales de MPTP à 15 mg/kg à 2 h d'intervalle. Ensuite, les souris ont reçu une injection intranasale du peptide PSELT quotidiennement pendant 7 j. L'effet du peptide a été examiné par immunofluorescence en utilisant un anticorps anti-TH pour marquer les neurones et les fibres dopaminergiques de la substance noire (SNc) et du striatum (St), respectivement.

6. Effet du PSELT sur le taux de la TH dans le striatum de souris traitées par le MPTP

Afin de confirmer et quantifier l'effet protecteur du PSELT dans la voie nigro-striée, nous avons examiné l'expression de la TH dans le striatum des différents groupes d'animaux par la technique de western blot (**Figure 43**). L'analyse des résultats obtenus a montré une baisse du taux de la TH chez le groupe traité par le MPTP par rapport aux groupes contrôle et PSELT. Le taux de TH est moins affecté chez le groupe MPTP/PSELT par rapport au groupe MPTP seul (**Figure 43 A et B**). Le PSELT protège ainsi les neurones dopaminergiques contre la dégénérescence induite par le MPTP comme indiqué par l'augmentation du taux de la TH.

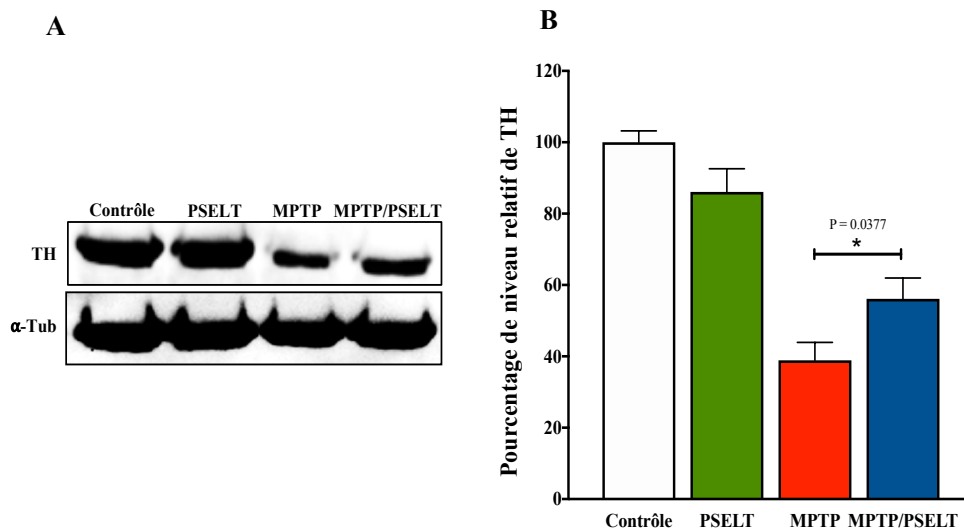


Figure 43. Mesure des variations de l'expression de la TH dans le striatum: Les cerveaux d'animaux traités ou non par le MPTP en présence ou en absence de PSELT ont été étudiés. (A) Les protéines extraites du striatum des différents groupes ont été analysées par western blot en utilisant les anticorps indiqués. (B) La quantification du western blot a montré une diminution de l'expression de la TH chez les souris traitées par le MPTP qui est partiellement reversée chez les souris traitées par le MPTP et le PSELT. * $p < 0,05$ (n=10). (Student's *t*-test).

7. Effet du peptide PSELT sur les niveaux de caspase 3 dans le modèle de la maladie de Parkinson chez la souris

Une augmentation de l'expression des gènes liés à la régulation de la mort cellulaire programmée est observée chez les patients atteints de la MP, parmi lesquels la caspase-3 (Hartmann et al., 2000). L'analyse immunohistochimique des cerveaux des souris traitées par le MPTP en présence ou non du peptide PSELT administré par voie intranasale, a révélé une baisse d'expression de la protéine caspase 3 en présence du peptide PSELT au niveau de la substance noire (**Figure 44A**) et du striatum (**Figure 44B**).

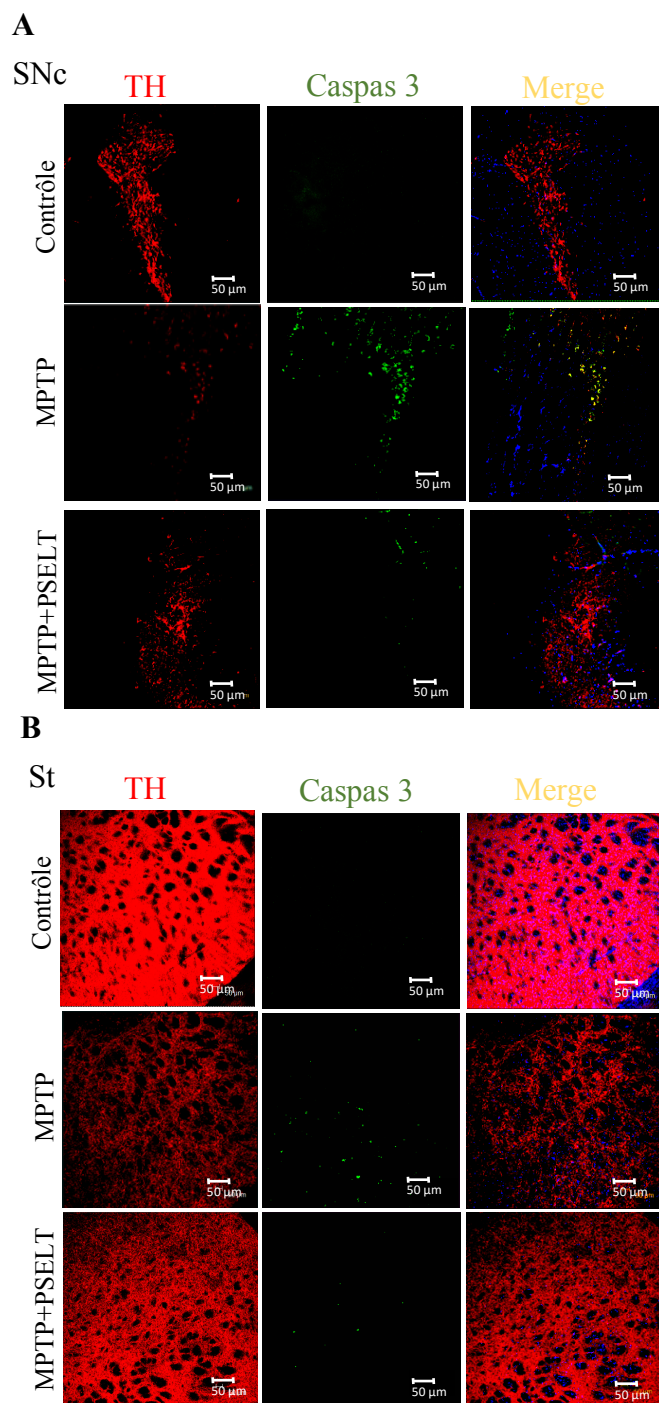


Figure 44. Effet du peptide PSELT sur l'expression de la caspase 3 dans la substance noire et le striatum de souris, analysée par immunohistofluorescence: Les souris ont reçu 4 injections intrapéritonéales de MPTP à 15 mg/kg à 2 h d'intervalle, Ensuite, les souris ont reçu 1 injection intranasale du peptide PSELT quotidiennement pendant 7 j (A) L'immunoréactivité TH et caspase 3 a été analysée dans la substance noire (SNc). (B) L'immunoréactivité TH et caspase 3 a été analysée dans le striatum (St).

8. Effet du PSELT sur les niveaux de dopamine dans le striatum

La perte des neurones dopaminergiques de la SNc dans le modèle MPTP provoque une diminution importante du niveau de DA dans le striatum (Forno et al., 1986; Seniuk et al., 1990). Dans notre étude, nous avons dosé le taux de la DA striatal à l'aide d'un kit ELISA commercial, dans le cerveau de souris traitées ou non par le MPTP en présence et en absence de PSELT. Même s'il existe des variations intra-groupes importantes, le peptide PSELT semble être efficace pour maintenir des niveaux plus élevés de DA dans le striatum des animaux traités par rapport aux animaux contrôles. (**Figure 45**)

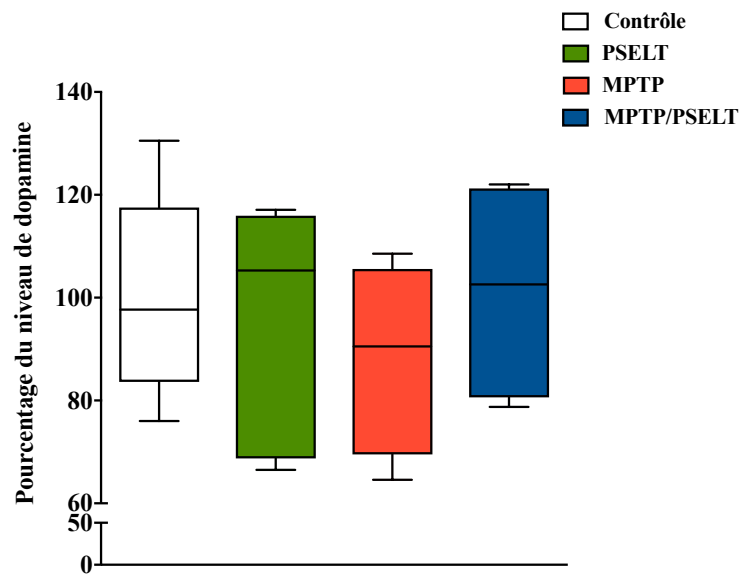


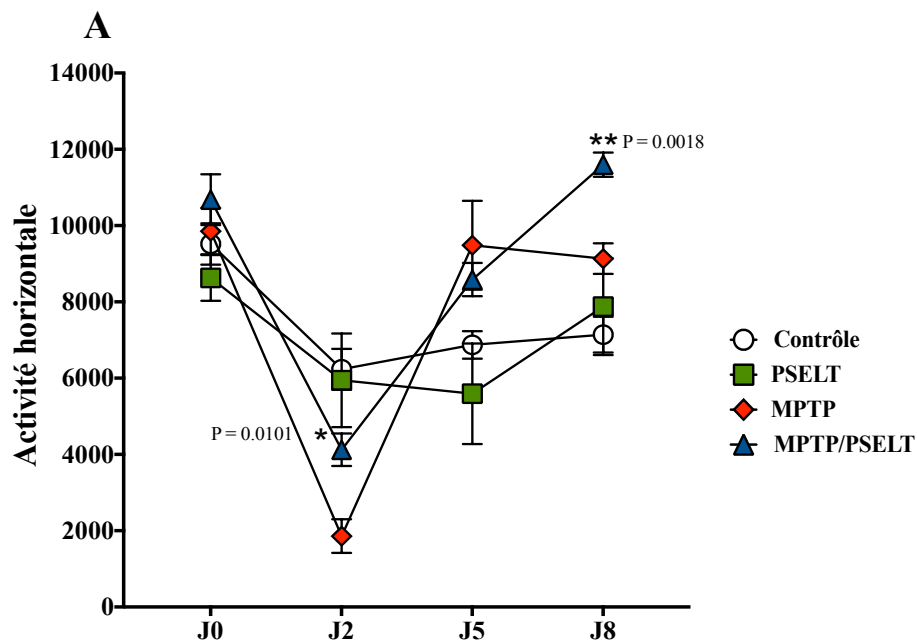
Figure 45. Le peptide PSELT améliore le niveau de la dopamine dans le striatum: les souris des groupes MPTP et MPTP/PSELT ont reçu 4 injections i.p. de 15 mg/kg de MPTP à 2 h d'intervalle et les groupes contrôle et PSELT ont reçu 4 injections i.p. de solution saline de 100 μ l à J1. Les souris du groupe MPTP/PSELT et le groupe PSELT ont reçu 1 injection i.n. de 30 μ g/10 μ l de PSELT (5 μ l/narine), les souris contrôles et celles du groupe MPTP ont reçu 5 μ l de solution saline par narine quotidiennement pendant 7 j. Nous avons dosé la dopamine à l'aide d'un kit Elisa dans les échantillons de striatum des différents groupes (n=5).

9. Évaluation de l'effet du PSELT *in vivo* par actimétrie: Protocole expérimental n° = 1

Nous avons réalisé des tests de comportement permettant d'évaluer d'éventuels déficits moteurs et leur amélioration suite au traitement. En utilisant des souris mâles C57BL/6j de 12 semaines, nous avons commencé par le test d'actimétrie qui permet d'évaluer l'activité locomotrice totale, nous permettant d'analyser simultanément l'activité horizontale, l'activité verticale, la distance totale et le temps d'immobilité. L'activité locomotrice totale de chaque souris a été enregistrée pendant 30 min sur trois périodes de 10 min.

a. Activité horizontale

Les résultats globaux de l'activité horizontale de 0 à 30 min pendant les jours d'analyse ont montré qu'il n'y a pas de différence significative entre les 4 groupes à J0 (**Figure 46 A et B**). Les deux groupes contrôle et PSELT ont montré une légère baisse non significative d'activité horizontale à J2 qui est restée constante jusqu'à J8. Ce résultat peut s'expliquer par le phénomène d'habituation souvent observé chez les animaux contrôles (**Figure 46 A, C, D et E**), (Leussis et Bolivar, 2006). Cependant, nous avons observé une forte diminution de l'activité motrice à J2 pour le groupe traité par le MPTP (**Figure 46 A et C**), alors que le groupe MPTP/PSELT a montré une activité supérieure par rapport au groupe MPTP seul, avec une différence statistiquement significative (* $P=0,0101$), (**Figure 46A et C**). L'activité horizontale des souris traitées par le MPTP a augmenté à J5 et J8, en accord avec des études précédentes (Sedelis et al., 2000) montrant une augmentation de l'activité horizontale après quelques jours de traitement. Cette augmentation d'activité s'explique par des phénomènes de compensation connus chez les modèles rongeurs de la MP qui vont masquer les symptômes moteurs (Bezard et al., 2000, Domenger et al., 2012). Ce rétablissement de l'activité motrice est plus important chez le groupe MPTP/PSELT avec une différence significative (** $P=0,0018$) par rapport au groupe MPTP seul à J8. L'analyse des résultats obtenus montrent ainsi un effet protecteur du PSELT contre la toxicité induite par le MPTP visible à J2 et J8.



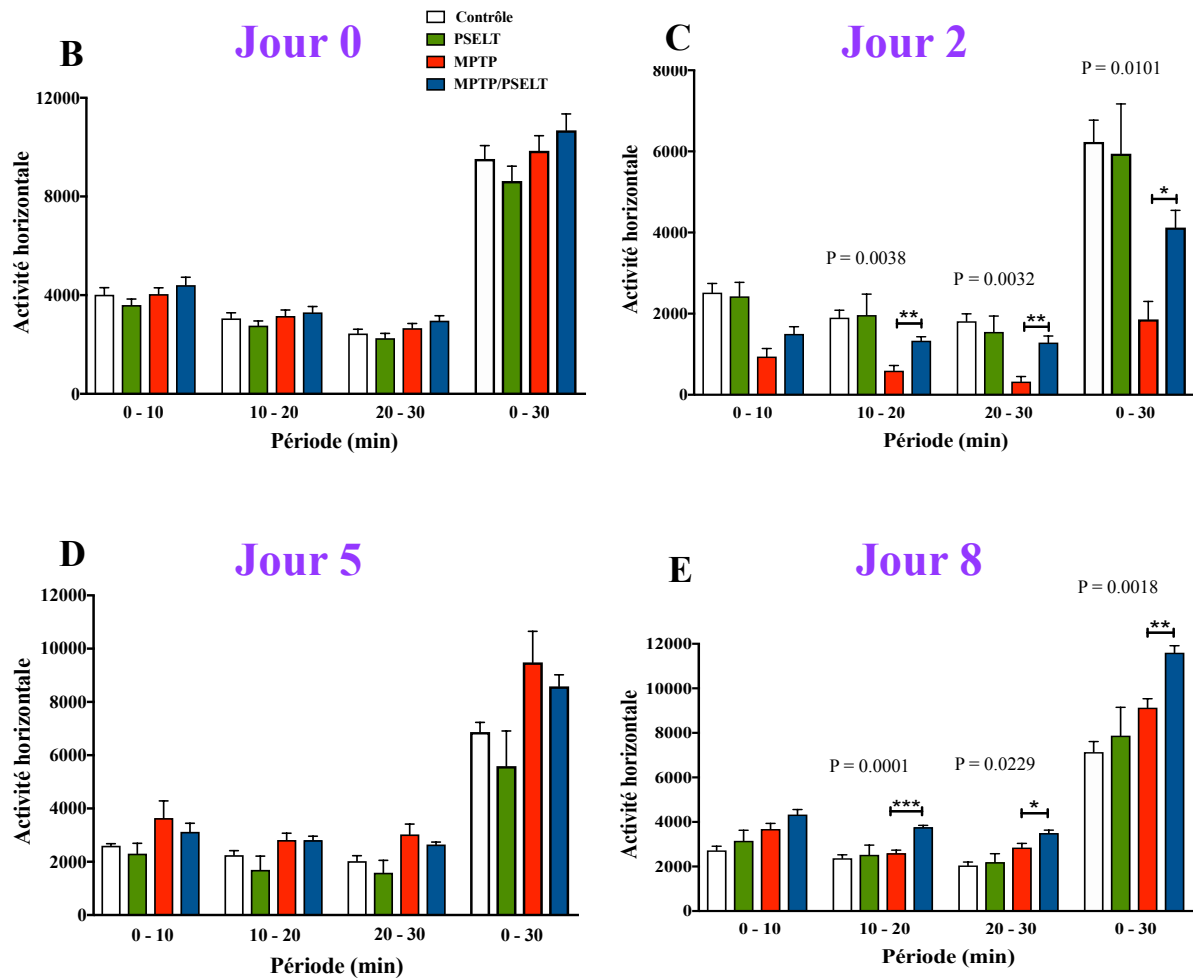
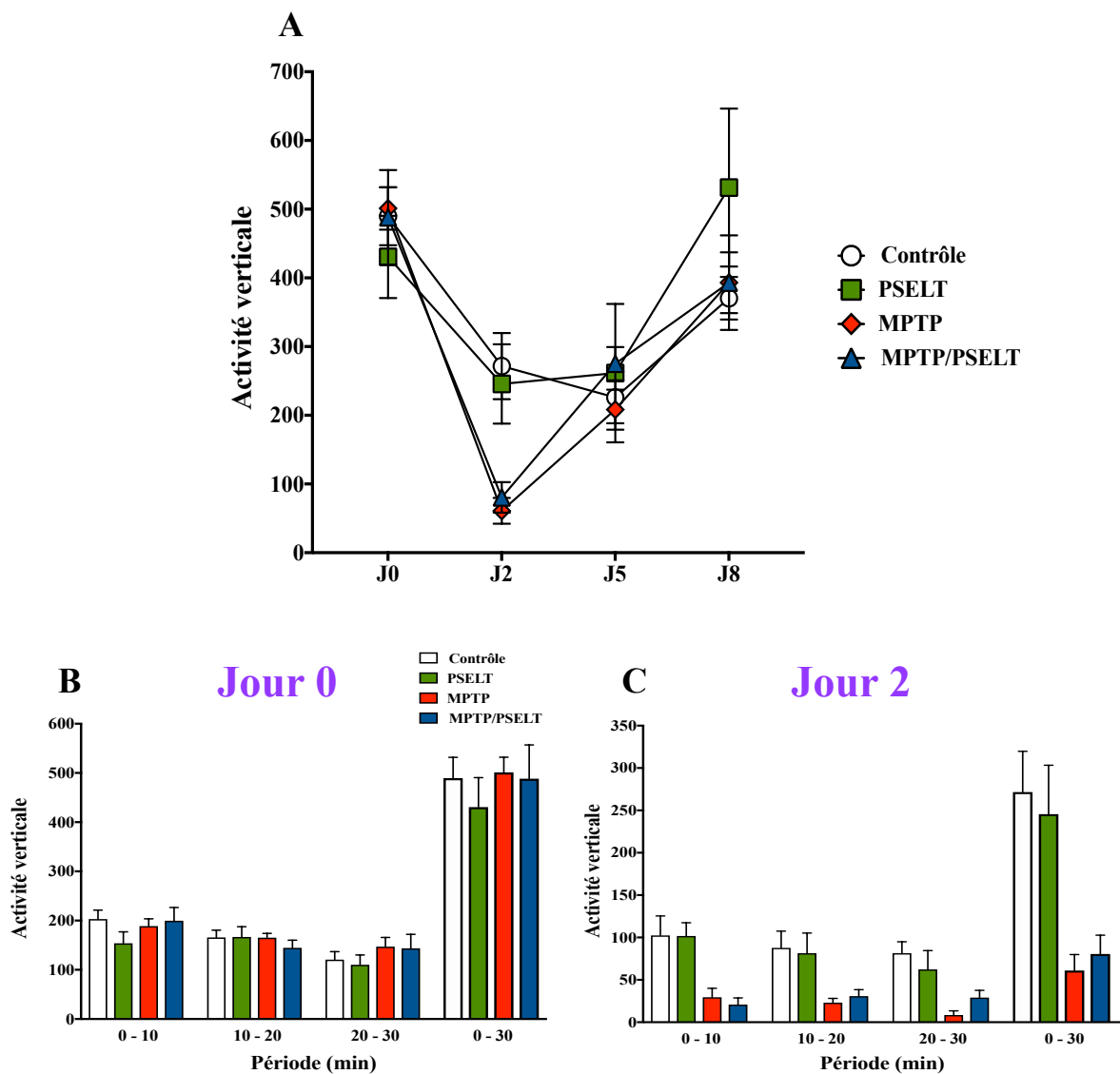


Figure 46. Effet du PSELT sur l'activité horizontale dans un modèle de la MP chez la souris: les souris des groupes MPTP et MPTP/PSELT ont reçu 4 injections i.p de 15 mg/kg de MPTP à 7h intervalle, et les groupes contrôle et PSELT ont reçu 4 injections i.p. de solution saline de 100 μ l à J1. Les souris des groupes MPTP/PSELT et PSELT seul ont reçu une injection i.n. de 30 μ g/10 μ l de peptide PSELT (5 μ l/narine); les souris des groupes contrôle et du groupe MPTP ont reçu 10 μ l de solution saline par voie i.n. quotidiennement pendant 7 j. L'activité horizontale a été mesurée à l'aide d'un analyseur VersaMax (actimétrie) au jour 0 (J0) avant injection, au jour 2 (J2), jour 5 (J5) et jour 8 (J8) après l'injection. Les souris ont été placées dans l'actimètre et leur activité a été enregistrée automatiquement pendant 30 min (A). Les résultats globaux de 0 à 30 min pour chaque jour sont présentés dans le (A). Nous avons aussi présenté les données par jour de traitement: (B) jour 0, (C) jour 2, (D) jour 5 et (E) jour 8. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM de cinq souris par groupe. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (Student's *t*-test.)

b. Activité verticale

Le test d'actimétrie nous a permis d'évaluer également l'activité verticale (le redressement). Les résultats globaux de l'activité verticale de 0 à 30 min de tous les jours étudiés est représentée dans la figure 47A. L'analyse des données obtenues à J0 a montré l'absence de différence d'activité entre les 4 groupes d'animaux (Figure 47 A et B). À J2 après le traitement,

nous avons observé une diminution de l'activité verticale chez tous les groupes, et cette diminution est très importante chez les groupes MPTP et MPTP/PSELT de façon plus ou moins identique par rapport aux groupes contrôle et PSELT (**Figure 47 A,C**). Ce résultat est en accord avec des résultats obtenus dans d'autres études (Stefanova et al., 2003). Une augmentation de l'activité verticale a été observée chez tous les groupes à partir de J5 (**Figure 47 A, D, E**). Ainsi, le PSELT n'a pas montré d'effet significatif sur l'activité verticale dans ces conditions expérimentales.



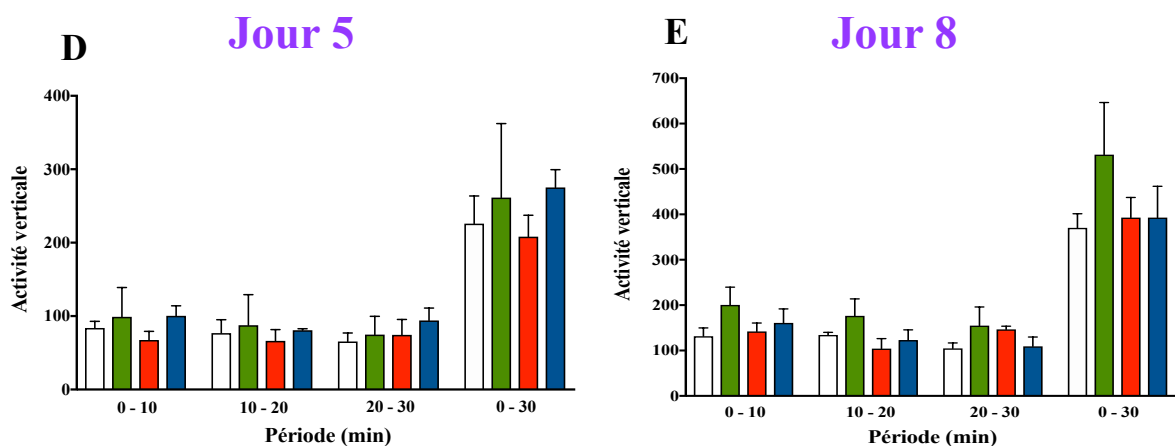


Figure 47. Effet du PSELT sur l'activité verticale dans un modèle de la MP chez la souris: Les souris des groupes MPTP et MPTP/PSELT ont reçu 4 injections i.p. de 15mg/kg de MPTP à 2h d'intervalle et les groupes contrôles et PSELT ont reçu 4 injections i.p. de solution saline à J1. Les souris des groupes MPTP/PSELT et PSELT ont reçu 1 injection i.n. de 30µg/10µl de peptide PSELT (5 µl/narine), les souris contrôles et celles du groupe MPTP ont reçu 10 µl de solution saline par voie i.n. quotidiennement pendant 7 j. L'activité verticale a été mesurée à l'aide d'un analyseur VersaMax (actimétrie) au jour 0 (J0) avant les injections, au jour 2 (J2), au jour 5 (J5) et au jour 8 (J8) après l'injection. Les souris ont été placées dans l'actimètre et leur activité a été enregistrée automatiquement pendant 30 min. Nous avons présenté les résultats globaux des enregistrements entre 0 et 30 min pour chaque jour (A). Nous avons aussi présenté les données par période de 10 min, pour chaque jour : J0 (B), J2 (C), J5 (D) et J8 (E). Les résultats sont exprimés en moyennes±SEM pour chaque groupe de cinq souris.

c. Distance totale

Nous avons aussi évalué la distance totale parcourue par les animaux à l'aide de l'actimètre. Les résultats de 0 à 30 min mesurés aux jours étudiés sont présentés dans la figure 48A. Au jour 0, nous avons observé qu'il n'y a pas de différence significative entre les 4 groupes (Figure 48 A et B). Une diminution de la distance totale parcourue par les animaux a été observée chez tous les groupes à J2 (Figure 48 A et C). Cette baisse est très importante chez le groupe MPTP par rapport aux autres groupes, avec une différence statistiquement significative entre le groupe MPTP et MPTP/PSELT (*P=0.0144) (Figure 48 A et C). La distance traversée est restée plus ou moins stable chez les groupes contrôle et PSELT jusqu'à J8 (Figure 48 A, D et E). Une augmentation de la distance totale parcourue a été observée chez les deux groupes traités par le MPTP à partir de J5 (Figure 48 A et D), avec une augmentation très significative chez le groupe MPTP/PSELT (**P=0,0080) à J8 (Figure 48 A et E). Le traitement par le peptide PSELT améliore ainsi de façon significative la motricité chez les animaux traités par le MPTP.

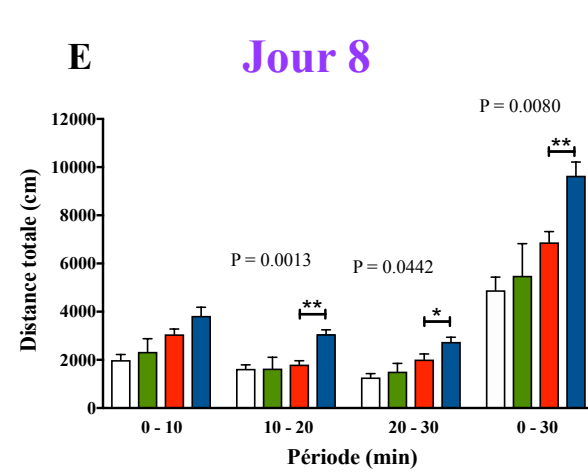
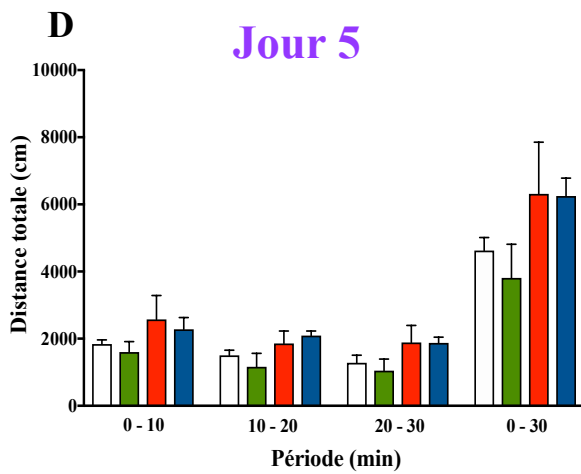
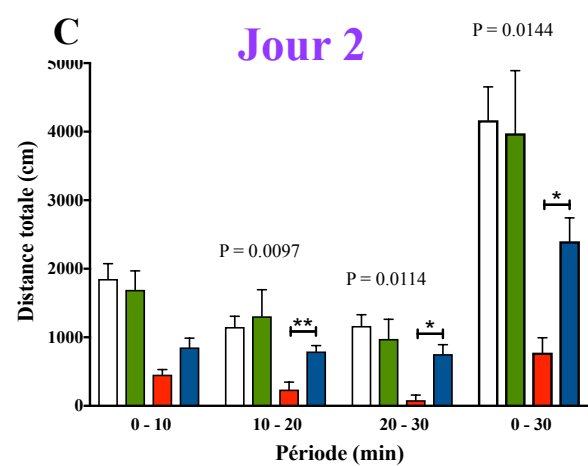
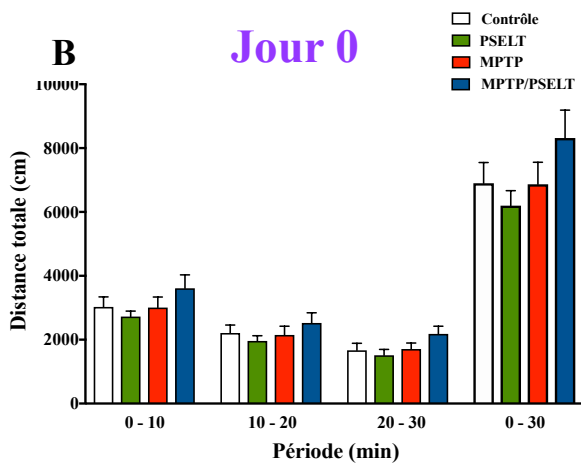
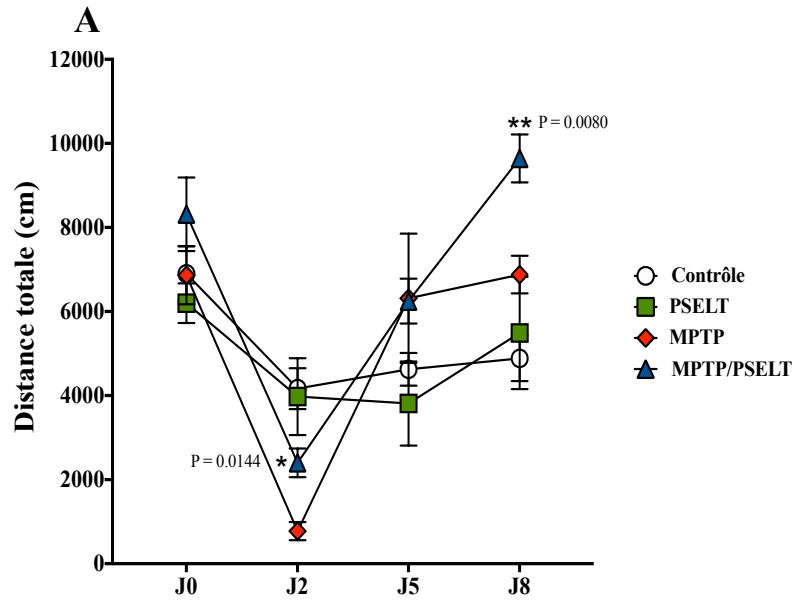


Figure 48. Effet du PSELT sur la distance totale dans un modèle de la MP chez la souris: Les souris des groupes MPTP et MPTP/PSELT ont reçu 4 injections i.p. de 15 mg/kg de MPTP à 2 h d'intervalle et les groupes contrôles et PSELT ont reçu 4 injections i.p. de solution saline à J1. Les souris des groupes MPTP/PSELT et PSELT ont reçu 1 injection i.n. de 30 µg/10 µl de peptide PSELT (5 µl/narine), les souris contrôles et celles du groupe MPTP ont reçu 10 µl de solution saline par voie i.n. quotidiennement pendant 7 j. La distance totale a été mesurée à l'aide d'un analyseur VersaMax (actimétrie) au jour 0 (J0) avant les injections, au jour 2 (J2), au jour 5 (J5) et au jour 8 (J8) après l'injection. Les souris ont été placées dans l'actimètre et leur activité a été enregistrée automatiquement pendant 30 min. Nous avons présenté les résultats globaux des enregistrements entre 0 et 30 min pour chaque jour (A). Nous avons aussi présenté les données par période de 10 min, pour chaque jour: J0 (B), J2 (C), J5 (D) et J8 (E). Les résultats sont exprimés moyennes±SEM pour chaque groupe de cinq souris. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (Student's *t*-test.) .

d. Temps d'immobilité

Nous avons aussi analysé le temps d'immobilité des animaux pendant le test d'actimétrie. Les résultats globaux obtenus de 0 à 30 min tous les jours étudiés ont été représentés dans la **figure 49A**. L'analyse de ces données a montré qu'il n'y a pas de différence significative dans le temps d'immobilité passé par les animaux des 4 groupes dans l'actimètre pendant 30 min, à J0 avant les traitements (**Figure 49 A et B**). Au deuxième jour après les traitements, une légère augmentation de presque 200 sec du temps d'immobilité a été observée chez les groupes contrôle et PSELT (**Figure 49 A et C**). Cette augmentation peut s'expliquer par le phénomène d'habituation observé chez les rongeurs (Leussis et Bolivar, 2006). Chez les groupes MPTP et MPTP/PSELT, nous avons observé une nette augmentation dans le temps d'immobilité, mais cette augmentation est plus importante chez le groupe MPTP (+523 sec) par rapport au groupe MPTP/PSELT (+468 sec), avec une différence statistiquement significative (* $P=0.0427$). Cinq jours après le traitement, nous observons une stabilité chez les groupes contrôle et PSELT sans différence significative entre ces deux groupes jusqu'au jour 8 après les traitements. Cependant, chez le groupe MPTP, une diminution du temps d'immobilité a été observée à J5 (**Figure 49 A et D**), avec une stabilité jusqu'à J8 (**Figure 49 A et E**), alors que chez le groupe MPTP/PSELT une chute du temps d'immobilité à J5 est observée et cette baisse a continué jusqu'à J8, avec une différence statistiquement significative (** $P=0.0042$) entre le groupe MPTP et le groupe MPTP/PSELT (**Figure 49 A et E**). L'analyse de ces résultats montre que les souris traitées par le MPTP en présence de PSELT sont plus actives que les animaux traités uniquement avec du MPTP, indiquant une nette amélioration de l'activité motrice des animaux traités par le PSELT.

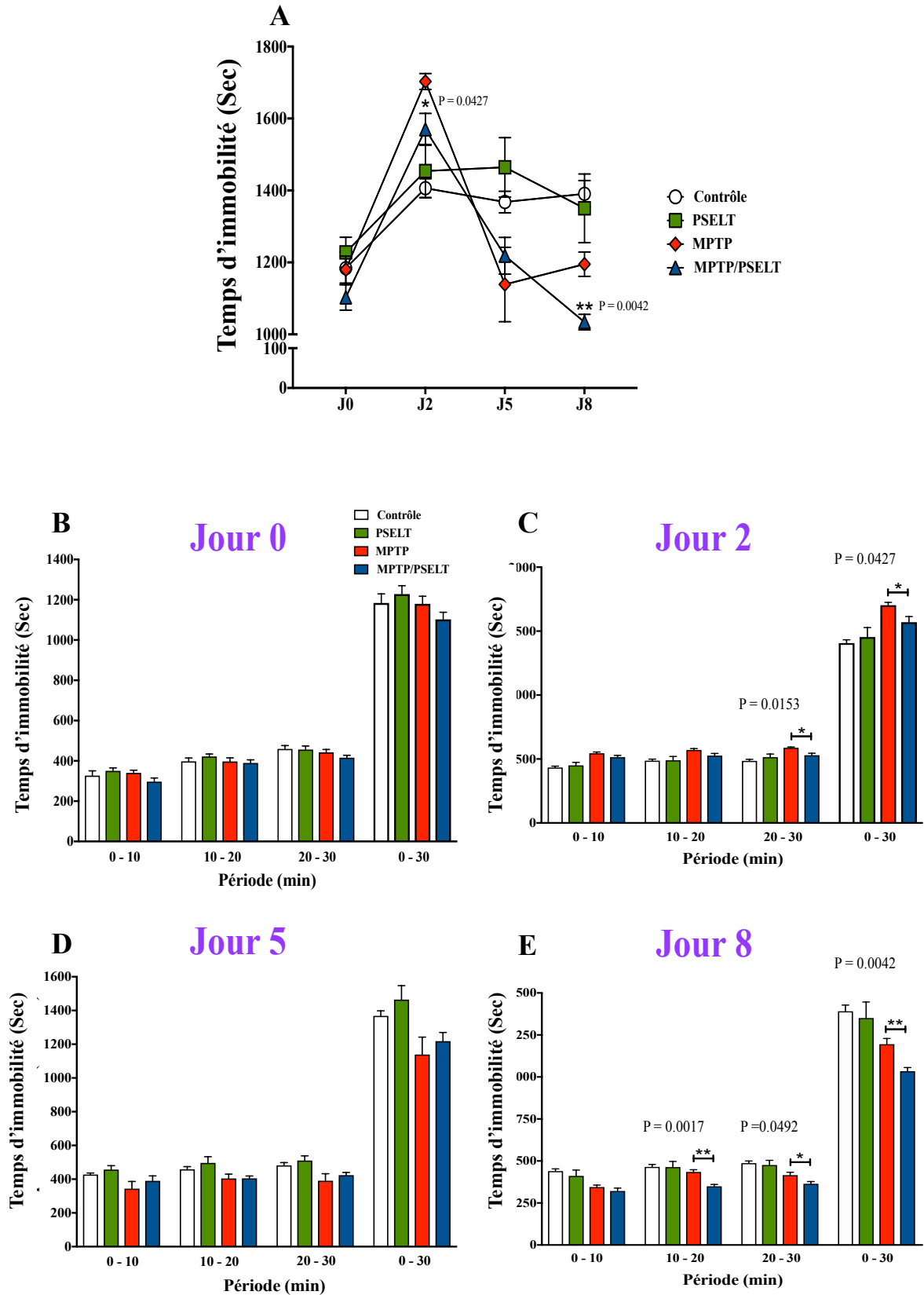


Figure 49. Effet du PSELT sur le temps d'immobilité dans un modèle de la MP chez la souris: Les souris des groupes MPTP et MPTP/PSELT ont reçu 4 injections i.p. de 15 mg/kg de MPTP à 2 h d'intervalle et les groupes contrôle et PSELT ont reçu 4 injections i.p. de solution saline à J1. Les souris des groupes MPTP/PSELT et PSELT ont reçu 1 injection i.n. de 30 µg/10 µl de peptide PSELT (5 µl/narine), les souris contrôles et celles du groupe MPTP ont reçu 10 µl de solution saline par voie i.n. quotidiennement pendant 7 j. Le temps d'immobilité

a été mesurée à l'aide d'un analyseur VersaMax (actimétrie) au jour 0 (J0) avant les injections, au jour 2 (J2), au jour 5 (J5) et au jour 8 (J8) après l'injection. Les souris ont été placées dans l'actimètre et leur activité a été enregistrée automatiquement pendant 30 min. Nous avons présenté les résultats globaux des enregistrements entre 0 et 30 min pour chaque jour (A). Nous avons aussi présenté les données par période de 10 min pour chaque jour : J0 (B), J2 (Fig C), J5 (D) et J8 (E). Les résultats sont exprimés moyennes±SEM pour chaque groupe de cinq souris. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (Student's *t*-test)

10. Évaluation de l'effet du PSELT par actimétrie dans le modèle de la MP chez la souris: protocole expérimental n° = 2

Nous avons utilisé dans cette étude un deuxième protocole d'administration du MPTP pour renforcer nos résultats obtenus *in vivo*. L'activité motrice des souris a été analysée par l'actimètre qui comme précédemment nous a permis d'évaluer dans une pièce isolée l'activité locomotrice totale, regroupant l'activité horizontale, l'activité verticale, la distance totale et le temps d'immobilité. L'activité locomotrice totale de chaque souris a été enregistrée pendant 30 min sur trois périodes de 10 min.

a. Activité horizontale

Les résultats globaux de l'activité horizontale de 0 à 30 min de tous les jours étudiés ont montré qu'il n'y a pas de différence entre les 4 groupes au jour 0 (**Figure 50 A et B**). A J2, nous avons observé une légère diminution de l'activité horizontale chez les groupes contrôle, PSELT et MPTP/PSELT, qui est restée plus ou moins constante jusqu'à J7 (**Figure 50 A, C-G**). Une forte diminution de l'activité horizontale a été observée à J2 chez le groupe MPTP avec une différence statistiquement significative (** $P=0.0063$) par rapport au groupe MPTP/PSELT (**Figure 50 A et C**). Une augmentation d'activité a été observée à partir de J3 jusqu'à J7 chez le groupe MPTP (**Figure 50 A, D-G**). L'analyse des résultats obtenus montre que l'effet du MPTP n'est visible que le jour 2 avant qu'il y ait probablement un phénomène de compensation connu chez la souris qui masque les symptômes moteurs (Bezard et al., 2000, Domenger et al., 2012). Néanmoins, l'effet observé à J2 montre clairement que le PSELT est capable de protéger les souris contre la neurotoxicité exercée par le MPTP.

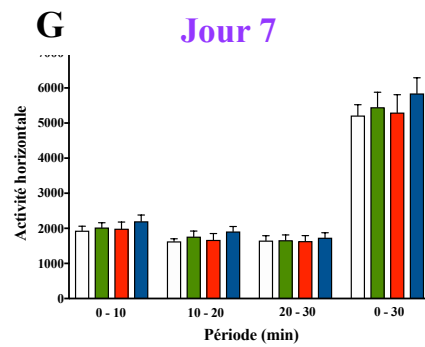
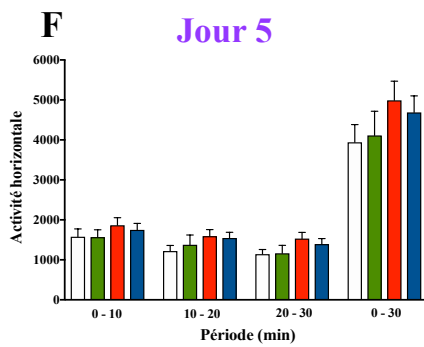
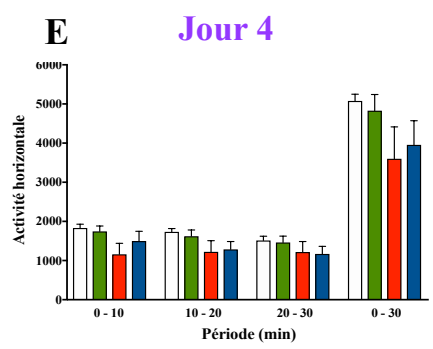
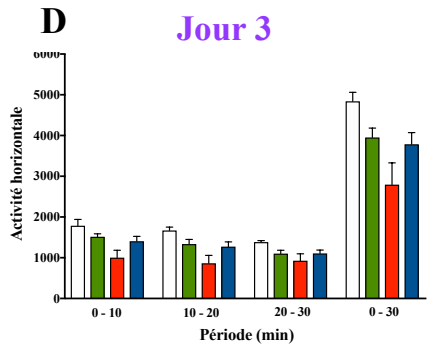
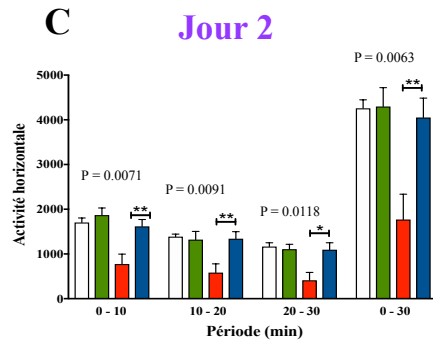
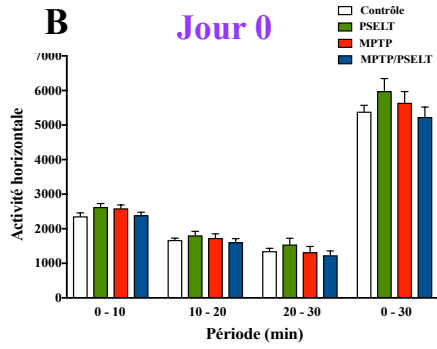
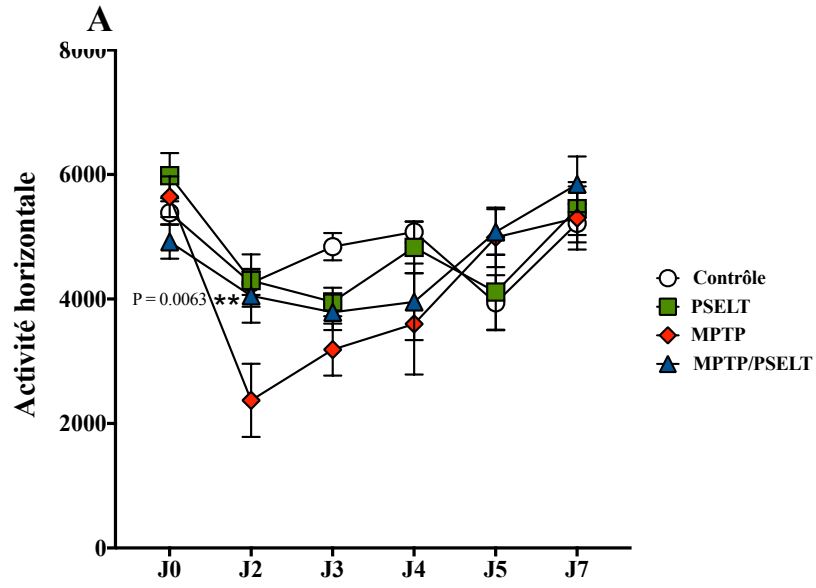


Figure 50. Effet du PSELT sur l'activité horizontale dans un modèle de la MP chez la souris: Les souris des groupes MPTP et MPTP/PSELT ont reçu 4 injections i.p. de 30 mg/kg de MPTP et les groupes contrôle et PSELT ont reçu 1 injections i.p. de solution saline quotidiennement pendant 5 j. Une injection i.n. de 30µg/10µl de peptide PSELT (5 µl/narine) est également réalisée quotidiennement pendant 5 j chez les souris du groupe MPTP/PSELT et du groupe PSELT. L'activité horizontale a été mesurée à l'aide d'un analyseur VersaMax (actimètre) au jour 0 (J0) avant injection et au jour 2 (J2), au jour 3 (J3), au jour 4 (J4), au jour 5 (J5), et au jour 7 (J7) après l'injection. Les souris ont été placées dans l'actimètre et leur activité a été enregistrée automatiquement pendant 30 min. Nous avons présenté les résultats globaux des enregistrements entre 0 et 30 min pour chaque jour (A). Nous avons aussi présenté les données par période de 10 min. Les graphes représentent l'activité horizontale enregistrée chaque jour étudié: J0 (B), J2 (C), J3 (D), J4 (E), J5 (F) et J7 (G). Les résultats sont exprimés en moyennes±SEM pour chaque groupe constitué de 12 souris. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.(Student's t -test).

b. Activité verticale

Le test d'actimétrie nous a permis aussi d'évaluer l'effet du PSELT sur l'activité verticale (le redressement). Les résultats globaux de l'activité verticale enregistrée entre 0 et 30 min de tous les jours étudiés ont été illustrés dans la figure 51A. L'analyse des données obtenues à J0 a montré l'absence de différence de l'activité verticale entre les 4 groupes d'animaux (Figure 51 A et B). A J2 après le traitement, nous avons observé une légère diminution de l'activité verticale chez tous les groupes; cette diminution étant très importante chez les groupes MPTP (Figure 51 A et C). Ce résultat est en accord avec les observations réalisées dans d'autres études (Stefanova et al., 2003). Le groupe MPTP/PSELT a montré une sensibilité remarquablement plus faible au MPTP à J2, avec une différence statistiquement significative (** $P=0,0072$) par rapport au groupe traité uniquement par le MPTP (Figure 51 A et C). Les groupes contrôle et PSELT ont montré une stabilité plus ou moins importante de l'activité verticale à partir de J3 jusqu'à J5 (Figure 51 A, D-F). Une augmentation de l'activité verticale a été observée chez les deux groupes traités par le MPTP à partir de J3 jusqu'à J7 (Figure 51 A, D-G). Ainsi, les résultats de l'analyse de l'activité verticale indiquent également un effet protecteur du PSELT contre le traitement MPTP.

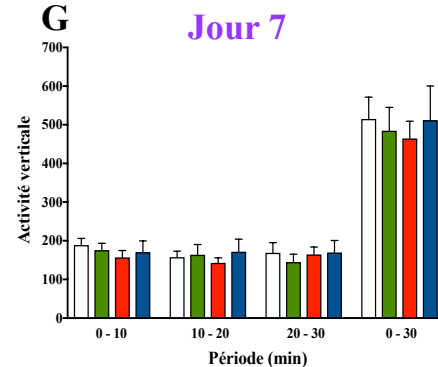
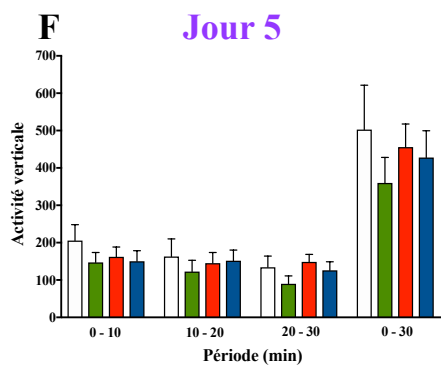
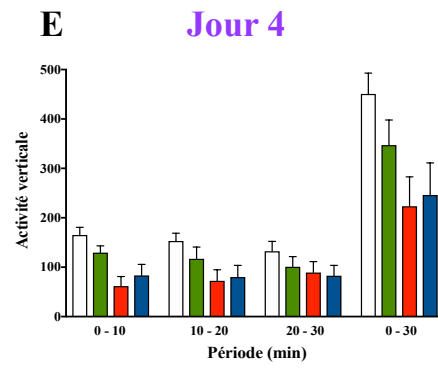
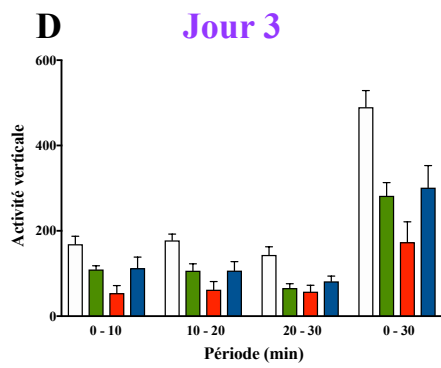
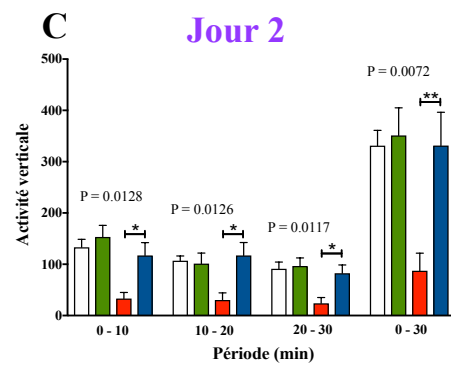
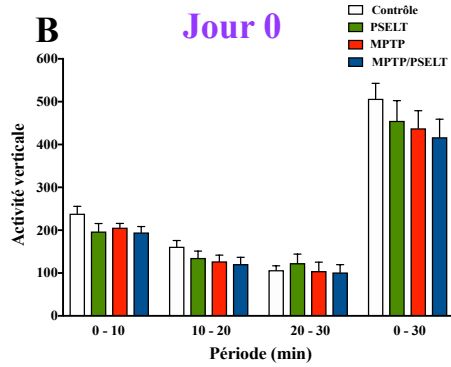
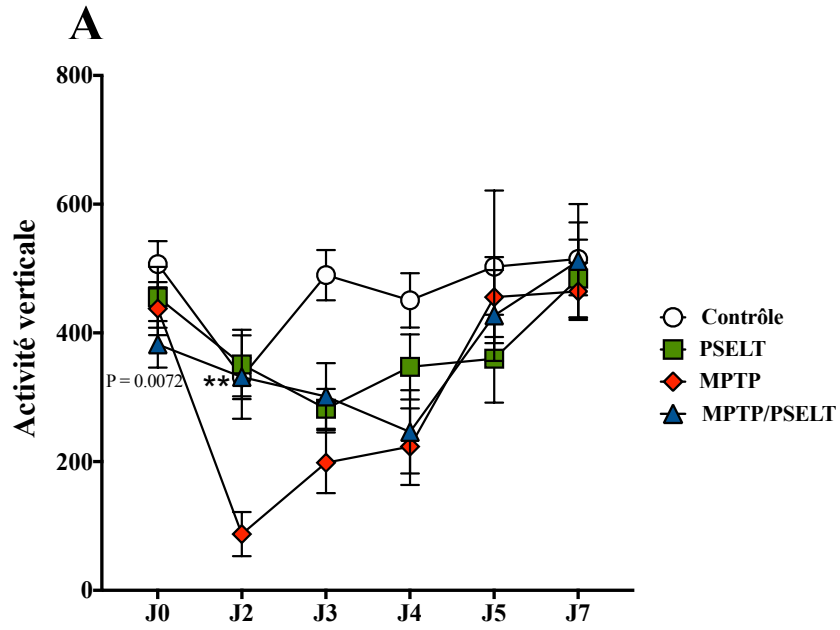
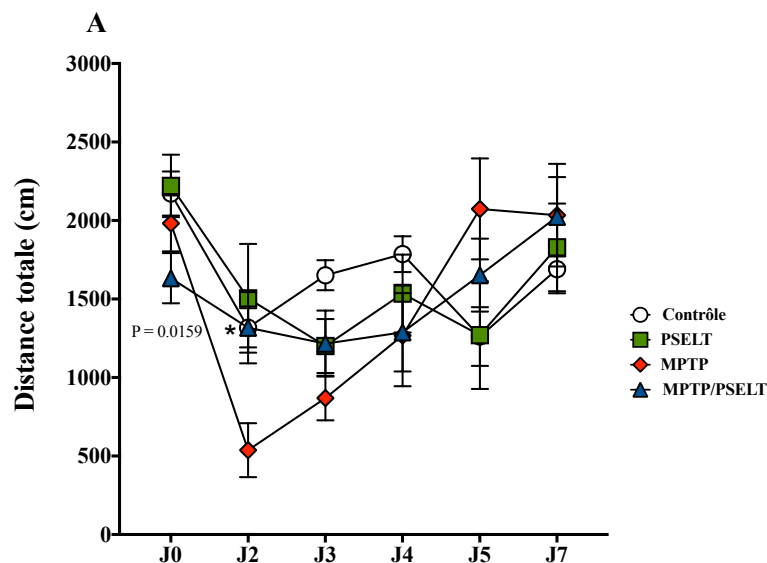


Figure 51. Effet du PSELT sur l'activité verticale dans un modèle de la MP chez la souris: Les souris des groupes MPTP et MPTP/PSELT ont reçu 4 injections i.p. de 30 mg/kg de MPTP et les groupes contrôle et PSELT ont reçu 1 injections i.p. de solution saline quotidiennement pendant 5j. Une injection i.n. de 30 µg/10 µl de peptide PSELT (5 µl/narine) est également réalisée quotidiennement pendant 5 j chez les souris du groupe MPTP/PSELT et le groupe PSELT. L'activité verticale a été mesurée à l'aide d'un analyseur VersaMax (actimètre) au jour 0 (J0) avant injection et au jour 2 (J2), au jour 3 (J3), au jour 4 (J4), au jour 5 (J5), et au jour 7 (J7) après l'injection. Les souris ont été placées dans l'actimètre et leur activité a été enregistrée automatiquement pendant 30 min. Nous avons présenté les résultats globaux des enregistrements entre 0 et 30 min pour chaque jour (A). Nous avons aussi présenté les données par période de 10 min, la première période est de 0 à 10 min. Les graphes représentent l'activité horizontale enregistrée chaque jour étudié: jours, J0 (B), J2 (C), J3 (D), J4 (Fig E), J5 (F) et J7 (G). Les résultats sont exprimés en moyennes ±SEM pour chaque groupe constitué de 12 souris. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (Student's *t*-test).

c. Distance totale

Nous avons aussi évalué la distance totale parcourue par les souris grâce au test d'actimétrie. Les résultats obtenus entre 0 et 30 min de tous les jours étudiés sont présentés dans la figure A. Le jour 0 avant les traitements, nous avons observé qu'il n'y a pas de différence significative entre les quatre groupes. Une diminution de la distance totale traversée par les animaux a été remarquée chez tous les groupes à J2 (Figure 52 A et C); cette baisse étant plus importante chez le groupe MPTP par rapport aux autres groupes, avec une différence statistiquement significative entre les groupes MPTP et MPTP/PSELT (* $P=0.0159$) (Figure 52 A et C). Une augmentation de la distance totale parcourue a été observée chez les groupes MPTP et MPTP/PSELT à partir de J3 jusqu'à J7, dernier jour du test de comportement (Figure 52 A, D-G), comme observé auparavant. Ces résultats confirment les données précédentes montrant que le traitement par le peptide PSELT améliore de façon significative la motricité des animaux altérée par le traitement MPTP.



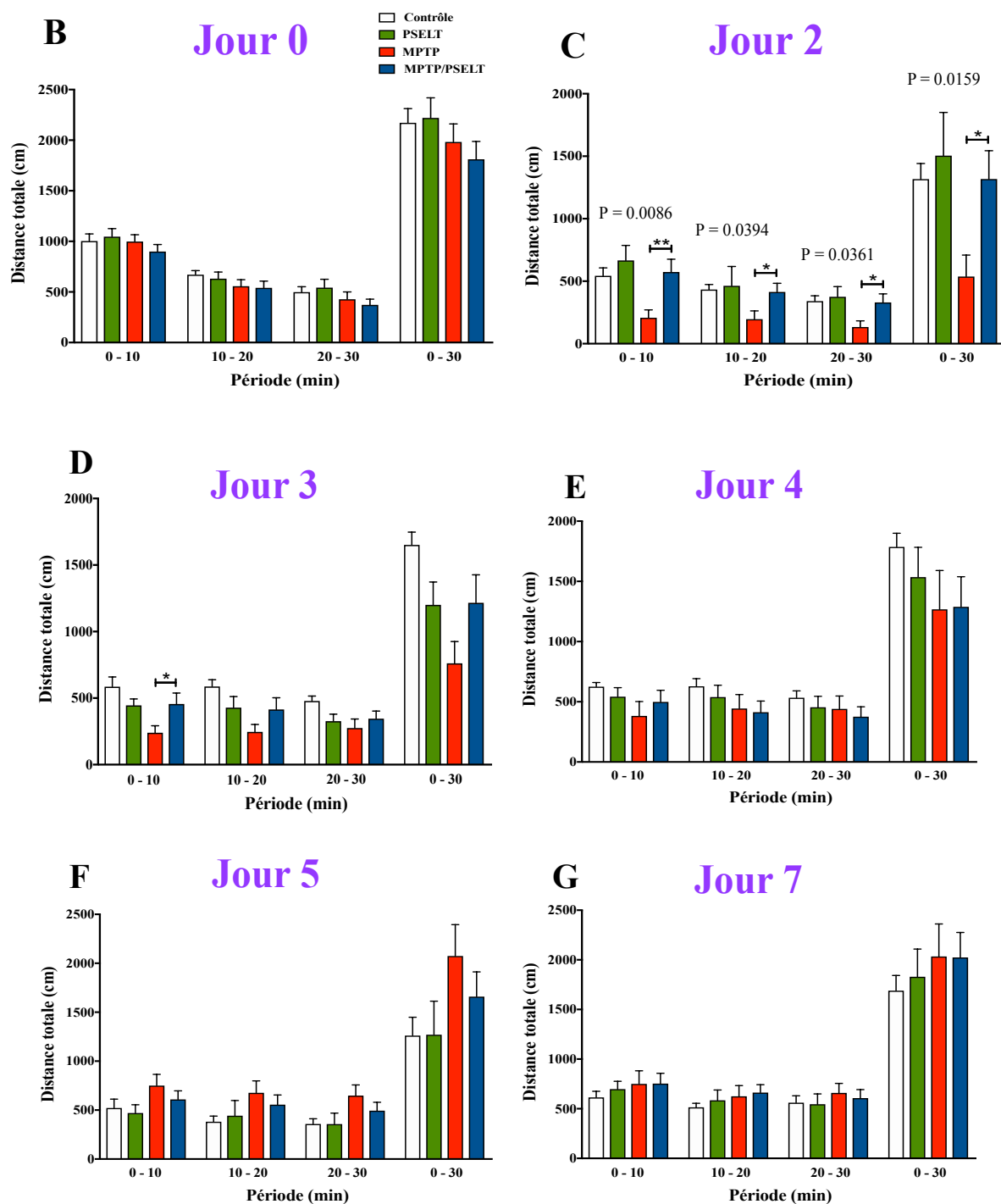
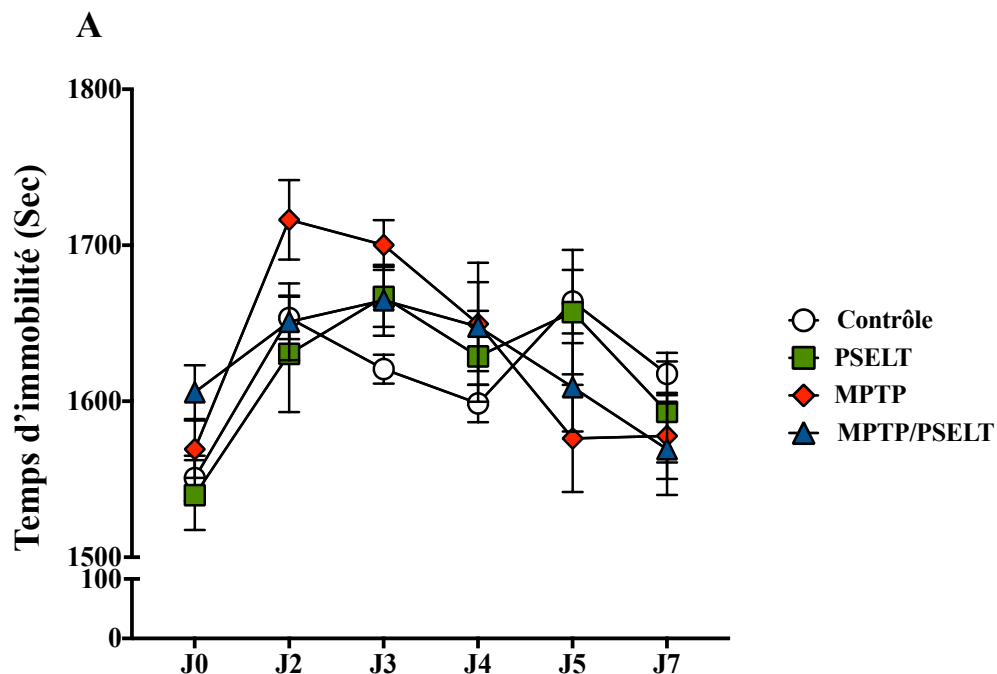


Figure 52. Effet du PSELT sur la distance totale dans un modèle de la MP chez la souris: Les souris des groupes MPTP et MPTP/PSELT ont reçu 4 injections i.p. de 30 mg/kg de MPTP et les groupes contrôle et PSELT ont reçu 1 injection i.p. de solution saline quotidiennement pendant 5j. Une injection i.n. de 30 µg/10 µl de peptide PSELT (5 µl/narine) est également réalisée quotidiennement pendant 5 j chez les souris du groupe MPTP/PSELT et du groupe PSELT. La distance totale a été mesurée à l'aide d'un analyseur VersaMax (actimètre) au jour 0 (J0) avant injection et au jour 2 (J2), au jour 3 (J3), au jour 4 (J4), au jour 5 (J5), et au jour 7 (J7) après l'injection. Les souris ont été placées dans l'actimètre et leur activité a été enregistrée automatiquement pendant 30 min. Nous avons présenté les résultats globaux des enregistrements entre 0 et 30 min pour chaque jour étudié (**Fig A**). Nous avons aussi présenté les données par période de 10 min. Les graphes représentent l'activité horizontale enregistrée

chaque jour étudié : jours J0 (B), J2 (C), J3 (D), J4 (E), J5 (F) et J7 (G). Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM pour chaque groupe constitué de 12 souris. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (Student's t -test).

d. Temps d'immobilité

En utilisant ce deuxième protocole d'administration du MPTP, nous nous sommes aussi intéressés à l'analyse du temps d'immobilité des animaux durant les 30 min dans l'actimètre. Les résultats globaux obtenus entre 0 et 30 min aux jours étudiés sont présentés dans la figure X A. Nous n'avons observé aucune différence significative dans le temps d'immobilité passé par les animaux des 4 groupes dans l'actimètre à J0 avant les traitements (Figure 53 A et B). Au deuxième jour après les traitements, une légère augmentation dans le temps d'immobilité a été observé chez les groupes contrôle, PSELT et MPTP/PSELT de façon presque identique. A J2, le groupe MPTP a montré une augmentation plus importante du temps d'immobilité avec notamment une différence significative (* $P=0.0260$) par rapport au groupe MPTP/PSELT observé uniquement lors des 10 premières minutes du test (Figure 53C). Une diminution du temps d'immobilité plus ou moins importante a été observée chez le groupe MPTP et MPTP/PSELT jusqu'à J7 (Figure 53 A et C-G).



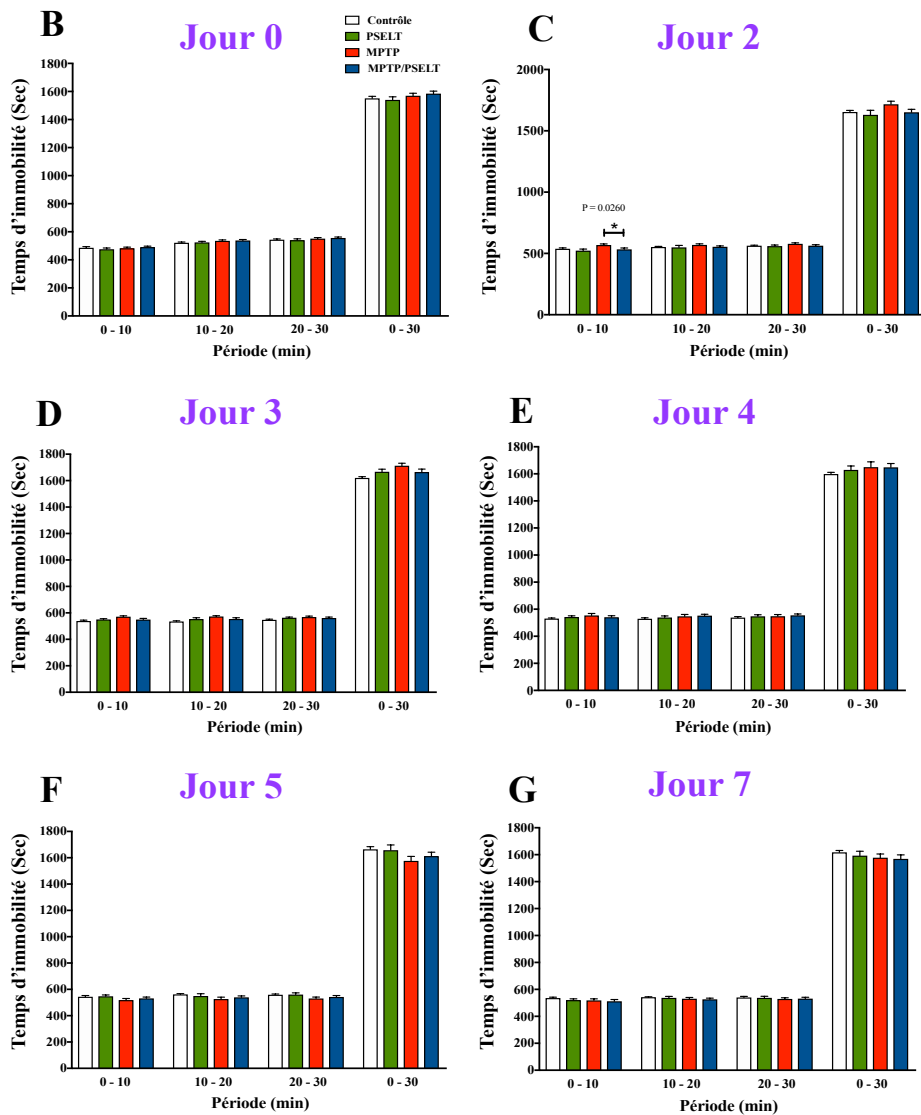


Figure 53. Effet du PSELT sur le temps d'immobilité dans un modèle de la MP chez la souris: Les souris des groupes MPTP et MPTP/PSELT ont reçu 4 injections i.p. de 30 mg/kg de MPTP et les groupes contrôle et PSELT ont reçu 1 injection i.p. de solution saline quotidiennement pendant 5j. Une injection i.n. de 30 µg/10 µl de peptide PSELT (5 µl/narine) est également réalisée quotidiennement pendant 5 j chez les souris du groupe MPTP/PSELT et du groupe PSELT. Le temps d'immobilité a été mesurée à l'aide d'un analyseur VersaMax (actimètre) au jour 0 (J0) avant injection et au jour 2 (J2), au jour 3 (J3), au jour 4 (J4), au jour 5 (J5), et au jour 7 (J7) après l'injection. Les souris ont été placées dans l'actimètre et leur activité a été enregistrée automatiquement pendant 30 min. Nous avons présenté les résultats globaux des enregistrements entre 0 et 30 min pour chaque jour étudié (A). Nous avons aussi présenté les données par période de 10 min. Les graphes représentent l'activité horizontale enregistrée chaque jour étudié : J0 (B), J2 (C), J3 (D), J4 (E), J5 (F) et J7 (G). Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM pour chaque groupe constitué de 12 souris. * $p < 0,05$. (Student's *t*-test).

11. Évaluation de l'effet de PSELT sur la coordination motrice.

Dans cette étude, nous avons fait appel à un autre type de test de comportement, le rotarod qui est souvent utilisé pour l'évaluation de la coordination motrice, de l'équilibre et de la fatigue chez les rongeurs. Il constitue un moyen idéal pour étudier les lésions du SNC, les effets de différentes pathologies et substances pharmacologiques sur l'activité motrice. Le test rotarod consiste à placer les animaux sur un cylindre rotatif pendant 4 min et à mesurer le temps avant la chute des animaux. Les résultats des analyses du temps en secondes passé sur le rotarod par les animaux à chaque jour étudié sont présentés dans la **figure 54**. Au jour 0, nous avons observé qu'il n'y a pas de différence significative entre les 4 groupes de traitement (**Figure 54**). Une forte diminution du temps passé par les animaux dans le rotarod a été observée uniquement chez le groupe MPTP par rapport aux autres groupes le jour 2 après les traitements. Une augmentation du temps passé par les animaux sur le cylindre a été observée chez tous les groupes à partir de J3 jusqu'à J7, due au phénomène d'habituation chez les contrôles et au phénomène de compensation connue chez les groupes traités par le MPTP. Pour tous les jours étudiés, nous avons observé que les animaux du groupe traité uniquement par le MPTP restent moins de temps sur le cylindre par rapport aux animaux du groupe traité par le PSELT et le MPTP/PSELT (**Figure 54**), même si les différences ne sont pas statistiquement significatives.

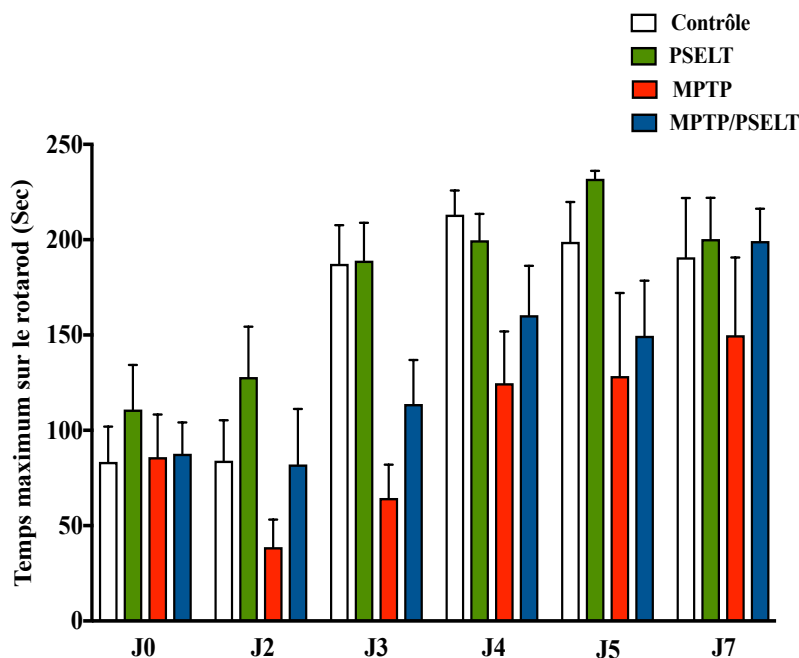


Figure 54. Effet du PSELT sur les troubles de la marche et de l'équilibre: Les souris des groupes MPTP et MPTP/PSELT ont reçu 4 injections i.p. de 30 mg/kg de MPTP et les groupes contrôle et PSELT ont reçu 1 injection i.p. de solution saline quotidiennement pendant 5 j. Une injection i.n. de 30 µg/10 µl de peptide PSELT (5 µl/narine) est également réalisée quotidiennement pendant 5 j chez les souris du groupe MPTP/PSELT et le groupe PSELT. Le temps passé sur le cylindre est mesuré pour chaque souris quotidiennement pendant 7 j. Les résultats sont exprimés en moyennes±SEM pour chaque groupe constitué de 12 souris.

DISCUSSION

Malgré des progrès sensibles dans le traitement de la MP et de la prise en charge des patients, les approches thérapeutiques actuellement disponibles sont axées sur le traitement des symptômes de la maladie et restent sans effet sur la progression de la neurodégénérescence dopaminergique. De plus, l'efficacité des traitements disponibles est limitée dans le temps à cause de la mise en place de mécanismes de résistance à la thérapie mais aussi à cause de la dégradation de l'état du patient due à l'évolution de la maladie. Ainsi, de nouvelles stratégies de prise en charge de la MP basée sur la neuroprotection sont nécessaires et doivent être développées. Nous allons d'abord en quelques paragraphes résumer l'état de l'art dans ce domaine avant de mettre en exergue les résultats de mon projet de thèse.

Plusieurs pistes thérapeutiques actuellement à l'étude sont basées sur des approches de neuroprotection soit par thérapie cellulaire, soit par thérapie génique soit encore par des thérapies moléculaires ciblées. Dans le domaine de la thérapie cellulaire, la greffe de plusieurs types cellulaires plus ou moins différenciés en neurones dopaminergiques est fortement envisagée, et des études au moins chez l'animal sont actuellement en cours. Nous pouvons citer quelques exemples intéressants d'études de thérapies cellulaires prometteuses mais dont l'issue reste actuellement encore inconnue. Des études précliniques utilisant les cellules neuroectodermiques tapissant la couche interne de la rétine qui sont riches en dopamine ont été rapportées. Ces cellules peuvent être isolées à partir de la rétine post-mortem de l'œil humain et leur transplantation chez des rats traités par la 6-OHDA et chez des singes traités par le MPTP entraîne une nette amélioration motrice (Farag et al., 2009). Des essais cliniques de transplantation de cellules humaines post-mortem (10-20 semaines de gestation) dans le putamen de patients atteints de la MP ont permis d'améliorer l'activité motrice de ces patients pendant un an après le traitement, avec une diminution ensuite. Le taux de dopamine mesuré à 6 mois a aussi été amélioré (Yin et al., 2012). Ainsi, ces cellules qui ont la caractéristique de cellules neurales progénitrices et qui peuvent être différenciées en neurones dopaminergiques pourraient améliorer le traitement de la MP. Toutefois, dans un autre essai clinique de phase II, la mort d'un patient suite à une inflammation cérébrale a entraîné l'arrêt de toute expérimentation (Farad et al., 2009).

Un autre type cellulaire qui a donné de bons résultats en thérapie cellulaire, au moins chez l'animal, est celui des cellules mésencéphaliques fœtales. Des essais précliniques sur des primates non-humains de greffe bilatérale de cellules mésencéphaliques fœtales dans le noyau caudé ont fourni des résultats encourageants, notamment en ce qui concerne la motricité de ces

animaux (Bakay et al., 1985). Chez des patients parkinsoniens, la transplantation de neurones dopaminergiques embryonnaires a amélioré la condition des cas sévères rencontrés chez les personnes âgées mais n'a pas eu d'effet chez les jeunes (Freed et al., 2001). Cependant, d'autres essais cliniques ont rapporté des résultats mitigés avec apparition de dyskinésies dans plus de 50% des cas (Olanow et al., 2003). Au cours des dernières années, de nombreux patients ont été greffés avec ce type de cellules, avec parfois des résultats encourageants mais de nombreux obstacles restent à surmonter afin de développer une thérapie cellulaire fiable pour la MP. Parmi ces obstacles, la question éthique liée à l'utilisation de tissus fœtaux humains reste posée, avec la difficulté d'obtenir suffisamment de tissus fœtaux et de standardiser les cellules du donneur (Arenas et al., 2010).

Afin de pallier à ces difficultés, les recherches modernes dans le domaine s'orientent vers l'utilisation de cellules souches qui peuvent être embryonnaires, mésenchymateuses ou neurales. Ces cellules qui ont la capacité de s'autorenouveler et de se différencier ont ouvert de grands espoirs pour de nombreuses applications thérapeutiques notamment dans le cas de la MP. Plusieurs tentatives de greffe de ces cellules différenciées ou non ont été réalisées mais ont rencontré des problèmes d'apparition de tumeurs ou de disparition de greffon à long terme (Arenas et al., 2010).

Des études récentes utilisant des greffes, chez le primate traité par le MPTP, de cellules souches pluripotentes induites dérivées de patients ou de sujets sains et reprogrammées en neurones dopaminergiques ont fourni d'excellents résultats en termes d'intégration des cellules greffées, de récupération motrice et d'absence de tumeurs, démontrant ainsi le potentiel thérapeutique de ces cellules souches pour la MP (Kikuchi et al., 2017).

Un autre enjeu majeur de la recherche sur le traitement de la MP est de réussir à stimuler une expression dopaminergique locale continue, capable d'induire des effets moteurs bénéfiques tout en évitant les effets indésirables de la dopathérapie sur d'autres structures cérébrales. Cet objectif pourrait être atteint à travers le développement d'une thérapie génique dopaminergique. Celle-ci est fondée sur l'apport par expression génique soit d'enzymes de biosynthèse de la dopamine soit de facteurs neurotrophiques neuroprotecteurs capables de stimuler la production du neurotransmetteur. Certaines compagnies pharmaceutiques ont développé des vecteurs de type LentiVector® capables d'exprimer 3 enzymes impliquées dans la chaîne de biosynthèse de la dopamine, à savoir la TH, la cyclohydrolase 1 et la L-Dopa décarboxylase. L'administration locale de ce vecteur dans le striatum chez le rongeur et le singe a démontré un bénéfice clinique au niveau de la motricité (Jarraya et al., 2009). Des essais

cliniques ont suivi et ont montré l'efficacité de ce traitement après administration du vecteur dans le putamen de patients atteints de la MP, avec une production locale continue de dopamine (Palfi et al., 2014). Ces études cliniques sont actuellement poursuivies pour déterminer la dose optimale de vecteur à administrer et pour améliorer la production de dopamine. Il faut noter que d'autres études ont ciblé d'autres enzymes telle que la glutamate décarboxylase (GAD) responsable de la production du GABA. Le GABA contrôle négativement l'activité du NST et participe ainsi au contrôle de l'activité motrice. Un essai multicentrique utilisant un AAV-GAD chez des patients atteints de la MP avancée a montré que ce traitement entraîne une amélioration significative pendant les mois suivants le traitement (LeWitt et al., 2011).

De nombreux facteurs neurotrophiques exercent une activité protectrice sur les neurones dopaminergiques conduisant au développement de thérapies géniques basée sur l'expression de certains facteurs neurotrophiques. Un de ces facteurs, le *glial-derived neurotrophic factor* (GDNF) exerce un puissant effet trophique sur les neurones dopaminergiques. Des études pré-cliniques ont d'ailleurs démontré la capacité du GDNF à limiter la perte neuronale dans la voie nigro-striée (Su X1, Kells AP, Huang EJ, Lee HS, Hadaczek P, Beyer J, Bringas J, Pivrotto P, Penticuff J, Eberling J, Federoff HJ, Forsayeth J, Bankiewicz KS. Safety evaluation of AAV2-GDNF gene transfer into the dopaminergic nigrostriatal pathway in aged and parkinsonian rhesus monkeys. *Hum Gene Ther.* 2009; 20:1627-40). Cependant, un tel traitement a entraîné une chute du poids corporel, ce qui rend difficile son utilisation chez les patients parkinsoniens.

Ainsi, même si les résultats de ces différents traitements novateurs et originaux sont encourageants, il n'existe toujours aucun traitement capable d'arrêter ou de ralentir la progression de la MP. D'autant que les symptômes de la maladie sont handicapants et s'aggravent dans la plupart des cas au cours du temps en dépit des traitements. Par conséquent, les chercheurs doivent continuer à explorer d'autres approches thérapeutiques pour tenter de soigner cette maladie évolutive.

Dans ce contexte, le travail qui a été réalisé au cours de ma thèse a été consacré à l'étude des effets bénéfiques dans un modèle de la MP chez la souris, d'un peptide dérivé de la SelT puisque cette sélénoprotéine a montré une action protectrice pour les neurones dopaminergiques et leurs terminaisons *in vivo* et *in vitro* (Boukhar et al., 2016a). En effet, nous avons observé dans cette étude antérieure que l'apport de la SelT grâce à un vecteur d'expression protégeait les cellules de neuroblastome de la neurotoxicité du MPP⁺, et qu'inversement la réduction de l'expression de la SelT par l'intermédiaire de siRNA augmentait la vulnérabilité de ces cellules à la neurotoxine. A côté de ces résultats obtenus en culture cellulaire, nous avons observé que les

neurones et les fibres dopaminergiques de souris dont le gène de la SelT a été invalidé dans le SNC sont plus vulnérables après un traitement par le MPTP, entraînant une neurodégénérescence accrue, une diminution des taux de TH active et une chute de la dopamine dans le striatum (Boukhar et al., 2016a). Ces résultats montraient clairement que la SelT pouvait conférer un effet neuroprotecteur dans la voie nigro-striée. Cet effet protecteur de la SelT semble également s'exercer au cours du développement puisque les souris dont le gène de la SelT est invalidé dans le cerveau montrent une hyperactivité qui pourrait être en relation avec le système dopaminergique (Castex et al., 2016).

L'existence de la barrière hématoencéphalique excluait l'utilisation d'une SelT recombinante qui serait rapidement dégradée et qui ne parviendrait pas à la voie nigro-striée. Nous avons donc choisi d'utiliser le peptide PSELT de 10 acides aminés, qui renferme le site actif de la SelT à savoir le motif CVSU, U étant l'acide aminé Sec. Nous avons pris le pari que ce petit peptide pourrait récapituler l'effet de la SelT observé *in vitro* et *in vivo* dans nos études antérieures. Nous avons donc tenté de tirer profit de nos résultats antérieurs afin de développer une nouvelle approche thérapeutique potentiellement applicable aux patients parkinsoniens. Nous sommes confortés dans cette idée par le fait que la SelT est aussi impliquée dans le contrôle de l'homéostasie calcique (Grumolato et al., 2008) et dans la régulation de la réponse au stress oxydant et à l'accumulation de protéines mal repliées (Boukhar et al., 2016a, b; Hamieh et al., 2017), des processus cruciaux pour la survie cellulaire notamment des neurones dopaminergiques où ces mécanismes jouent un rôle clé qui les placent au centre de la physiopathologie de la MP (Obeso et al., 2017). En effet, les connaissances sur la physiopathologie de la MP ont beaucoup progressé ces dernières années grâce notamment à l'identification de mutations géniques responsables de formes héréditaires de la maladie. L'étude des mécanismes cellulaires associés à ces altérations génétiques a permis d'identifier le rôle d'un certain nombre de protéines pathogéniques dans l'apparition et la progression de cas familiaux mais également sporadiques de la maladie (Bonifati, 2007 ; Dawson et Dawson, 2010). Ainsi, les protéines synucléine, DJ-1, LRRK2 et la parkine semblent être des acteurs majeurs responsables de la pathogenèse de la MP (Nalls et al., 2011), conduisant à la neurodégénérescence aussi bien dans les formes familiales que dans les formes non familiales de la MP (Schiesling et al., 2008). Il est intéressant de noter que toutes ces protéines sans exception sont reliées au stress oxydant (Bonifati, 2007 ; Dawson et Dawson, 2010 ; Dias et al., 2013), ce qui laisse penser qu'un traitement pouvant remédier à ce stress pourrait être très utile.

La SelT qui possède une puissante activité réductrice comme montré auparavant (Boukhzar et al., 2016a) pourrait constituer un tel traitement.

Nous avons donc envisagé d'utiliser le peptide PSELT en tant qu'analogue de la SelT qui permettrait d'atténuer le stress oxydant et les réactions délétères qui en découlent comme le stress du RE et l'apoptose, dans des modèles précliniques de la MP chez la souris. Nous avons d'abord testé les deux formes oxydée et réduite de ce peptide *in vitro*, et il s'est avéré que seul PSELT dans sa forme réduite est capable de protéger les cellules de neuroblastome SY5Y, modèle cellulaire largement utilisé pour mimer la dégénérescence des neurones dopaminergiques *in vitro*. En revanche, la forme oxydée était totalement dépourvue d'effet. Nous n'avons pas d'explication exacte pour cette différence de réponse aux 2 formes de PSELT, mais il est possible que ces cellules soient incapables de convertir la forme oxydée en forme réduite active dans les conditions de fort stress oxydant causé par le traitement par le MPP⁺. En tous cas, le PSELT semble agir en diminuant le stress oxydant comme indiqué par l'incubation de ces cellules avec la sonde DCFDA qui interagit avec plusieurs types de radicaux libres cellulaires. De plus, le PSELT est également capable d'inhiber l'activité de la caspase-3, favorisant ainsi la survie des cellules de neuroblastome. Le site d'action du peptide n'est pas encore connu mais nos expériences utilisant le PSELT-dansyl fluorescent indiquent que le PSELT est capable de traverser la membrane plasmique et probablement agir au niveau intracellulaire pour réduire les effets du stress oxydant. Des expériences sont en cours afin de comprendre davantage le mécanisme d'action du PSELT qui reste à élucider. En effet, la SelT est une protéine du RE qui doit exercer son activité en régulant la formation de ponts disulfures dans cet organe via son site catalytique réducteur. Il est possible que le PSELT soit capable, aux fortes doses utilisées, de remplir cette fonction dans tout l'espace intracellulaire, palliant ainsi au déficit en SelT et même probablement aux effets redox d'autres sélénoprotéines connues pour être affectées dans les conditions de la MP chez l'animal et chez l'Homme. A l'appui de cette hypothèse, il a été montré que la neurotoxine roténone réduit l'expression globale de GPx1 et les taux de glutathion dans la lignée de cellules hippocampiques HT22 (Panee et al., 2007). D'autre part, il a été montré que l'oxydation de la dopamine en dopamine-quinone entraîne une réduction de l'activité de la GPx4 due à la modification des résidus de Sec par le pouvoir électrophile de la quinone (Hauser et al., 2013). D'ailleurs, la neurotoxicité de la méthamphétamine qui provoque une oxydation de dopamine aboutit également à la réduction des GPx 1 et 4 (Barayuga et al., 2013). De plus, plusieurs études menées *in vivo* sur

différents modèles de la MP ont conclu au rôle essentiel de certaines sélénoprotéines dans la neuroprotection. Ainsi, il a été montré que les souris déficientes en GPx1 ont une sensibilité accrue aux neurotoxines affectant les neurones dopaminergiques (Klivenyi et al., 2000) et qu'à l'inverse la surexpression de cette sélénoprotéine protège ces neurones dans les modèles de la MP (Ridet et al., 2006). Enfin, une étude récente a rapporté les variations de l'expression génique de 24 sélénoprotéines dans différentes régions du cerveau dans un modèle de la MP provoquée par injection prolongée de MPTP. Les résultats de cette étude montrent que l'expression des sélénoprotéines dépend des régions du cerveau et que la plupart des sélénoprotéines montrent une diminution de leur expression dans la SNc (Zhang et al., 2016). Il n'est donc pas exclu que le PSELT puisse être un puissant substitut à la défaillance de plusieurs sélénoprotéines normalement impliquées dans la neuroprotection, en exerçant différents effets réducteurs qui assurent le maintien de l'intégrité cellulaire. Cette hypothèse reste bien sûr à confirmer.

Les résultats obtenus *in vitro* avec le PSELT nous ont conduits à tester sa capacité *in vivo* à protéger les neurones et les fibres dopaminergiques, à maintenir les taux de dopamine et à préserver une motricité optimale dans le modèle MPTP. Même si ce modèle n'est pas le plus approprié pour les études fonctionnelles sur la motricité, nous l'avons privilégié pour plusieurs raisons. D'une part, ce modèle très accessible permet d'obtenir une dégénérescence en un temps relativement court compatible avec le déroulement de la thèse. D'autre part, le modèle souris permettra la comparaison des effets qui pourraient être observés chez des souris invalidées pour la SelT, ce qui est prévu dans la suite de ce travail. Il s'est alors posé la question du mode d'administration le plus efficace pour délivrer ce peptide au niveau central. La voie non invasive intranasale a récemment reçu beaucoup d'intérêt pour l'administration de protéines et de peptides puisqu'elle présente plusieurs avantages : *i)* la muqueuse nasale est constituée de microvillosités qui augmentent la surface d'absorption, *ii)* La nature hautement vascularisée de l'épithélium nasal constitué d'un endothélium dont la membrane basale est très perméable facilite et accélère l'absorption des molécules, et *iii)* cette voie d'administration évite la dégradation au niveau gastrointestinal ou dans la circulation hépatique. Même si elle présente aussi quelques désavantages comme la clearance rapide des substances dans la cavité nasale ou la limitation de la quantité de principe actif à administrer (Ibraheem et al., 2014), la voie intranasale est de plus en plus utilisée pour administrer des peptides mais également des protéines thérapeutiques au niveau du cerveau pour traiter différentes pathologies neurologiques chez des modèles animaux. Ainsi, une étude a montré que l'administration

intranasale de l'*epidermal growth factor* (EGF) protège contre les lésions cérébrales chez les nouveaux-nés (Scafidi et al., 2014). Une autre étude a montré que l'administration intranasale de l'*insulin growth factor* (IGF) réverse le phénotype observé dans des souris modèles de la maladie de Huntington (Lopes et al., 2014). Un dernier exemple est fourni par l'administration intranasale d'un analogue du neuropeptide PACAP qui réduit l'atrophie musculaire spinale (Polanco et al., 2016). Ces exemples parmi d'autres montrent que la voie intranasale d'administration de principes actifs est un moyen potentiellement efficace pour le traitement de pathologies d'origine centrale.

Quelques heures après administration par cette voie, nous avons pu localiser le PSELT dans la SNc et le striatum de souris, montrant que ce peptide peut avoir accès aux structures cérébrales affectées dans la MP. De plus, le PSELT est capable de réduire la neurodégénérescence induite par le MPTP chez la souris, un effet qui est accompagné par une réduction du nombre de cellules caspase 3-positives comme observé *in vitro*. Ceci s'est traduit par une augmentation significative de l'expression de la TH observée par immunohistochimie et western blot, et une tendance à la hausse du taux de dopamine chez les animaux traités par le PSELT après le MPTP en comparaison aux animaux traités par le MPTP seul, même si ce dernier effet n'est pas significatif entre les deux groupes d'animaux. Ceci peut être dû à une variabilité importante de la réponse chez les différents animaux. L'augmentation du nombre d'animaux pourra aider à résoudre ce problème. Il est possible aussi que les phénomènes de compensation observés également au niveau de la récupération fonctionnelle motrice (voir ci-dessous) soient aussi à l'origine de cet effet variable sur les taux de dopamine. D'autres expériences notamment de mesure de la dopamine à différents temps de traitement pourraient aider à répondre à cette question.

Afin d'évaluer l'efficacité du traitement par le PSELT sur la motricité des souris après administration du MPTP, nous avons utilisé deux protocoles différents afin de valider les résultats obtenus. Dans un premier protocole, nous avons administré le MPTP en début d'expérience et nous avons analysé le comportement moteur des animaux à différents jours post-traitement en présence ou en absence du PSELT. Ce premier protocole a permis de montrer que le PSELT pouvait protéger les souris contre l'effet du MPTP comme montré par la mesure de certains paramètres de mobilité à J2 après le début des traitements. En effet, le traitement quotidien par le peptide améliore les performances de motricité tôt au cours du traitement, mais cet effet se dissipe les jours suivants car tous les animaux des différents groupes ont tendance à récupérer des effets du MPTP sur la courte période de l'expérimentation. Ce phénomène bien

connu de compensation peut être dû à différents mécanismes de plasticité du système dopaminergique qui se mettent en action suite à l'administration du MPTP et qui peuvent masquer les symptômes causés par la neurodégénération (Bezard et al, 2000 ; Domenger et al., 2012). Ce phénomène est également décrit chez les patients parkinsoniens qui ne montrent des symptômes moteurs qu'après la perte d'environ 70% du système dopaminergique nigro-strié. En effet, la MP a une longue évolution présymptomatique pendant laquelle des phénomènes de compensation se mettent en place, qui s'expliqueraient par des ajustements du système nigrostriatal dont le mécanisme reste peu connu (Blesa et al., 2017).

Afin de renforcer les résultats obtenus et tenter d'éviter ce phénomène de compensation rapide, nous avons utilisé un deuxième protocole où le MPTP est administré quotidiennement tout au long de l'expérience en même temps que le PSELT. Ce mode opératoire a pour but de prolonger l'effet observé du peptide, contrairement au protocole précédent où les effets de compensation apparaissaient dans les jours suivants l'injection initiale de MPTP. Ce deuxième protocole a permis d'observer systématiquement un effet bénéfique du PSELT sur différents paramètres de motricité des animaux à J2, et des effets moindres non significatifs aux jours suivants de l'expérience, indiquant que la compensation est moins importante dans ces conditions. Ainsi, les résultats des deux expériences de mesure de l'activité motrice vont dans le même sens et montrent clairement que le peptide SelT est capable de réverser les effets du MPTP observés dans ce modèle de la MP. Ceci est en accord avec les effets du PSELT sur la neurodégénérescence et sur les taux de la protéine TH que nous avons observés au niveau de la voie nigro-striée après traitement par le MPTP.

CONCLUSION
&
PERSPECTIVES

Les travaux de notre équipe ont mis en évidence pour la première fois le rôle essentiel de la SelT dans la protection des neurones dopaminergiques. De plus, nous avons montré que la SelT est très abondante dans le caudate putamen chez des patients atteints de la MP (Boukhar et al., 2016), indiquant que cette sélénoprotéine pourrait jouer un rôle essentiel en s'opposant à la neurodégénérescence. Des études antérieures avaient montré que certaines sélénoprotéines très importantes telles que les GPx1 et 4 ou la SelP sont également altérées dans la SNc, les axones dystrophiques du striatum et dans le cortex de patients atteints de la MP et peuvent même colocaliser avec les corps de Lewy (Power et al., 2009; Bellinger et al., 2011, 2012). Ces données indiquent que la SelT et probablement quelques autres sélénoprotéines sont impliquées dans la protection contre le stress oxydant responsable de la neurodégénérescence observée lors de la MP. Les résultats obtenus lors de ce travail de thèse confortent cette hypothèse puisque le PSELT dérivé d'une de ces sélénoprotéines, la SelT, est capable de conférer une protection aux neurones dopaminergiques *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de la MP. Le fait que ce peptide seul exerce un tel effet suggère que le mécanisme d'action pourrait être très large permettant à ce peptide de se substituer probablement à plusieurs sélénoprotéines qui doivent agir de concert pour assurer la survie des neurones dopaminergiques. Nous nous attacherons à caractériser ce mécanisme d'action en réalisant des études transcriptomiques et protéomiques qui permettront d'identifier les cibles affectées. Nous réaliserons aussi des études immunohistochimiques en microscopie électronique qui permettront de localiser le site d'action du peptide *in vivo*.

Les données obtenues sur la réduction de la neurodégénérescence et le rétablissement de la motricité par le PSELT chez la souris traitée par le MPTP suggèrent que ce peptide pourrait avoir une application en clinique chez les patients parkinsoniens. Des recherches doivent par conséquent être entreprises pour valider ce concept chez des modèles proches de l'homme comme par exemple le singe. Notre équipe a pris des contacts dans ce sens avec des spécialistes afin d'envisager un tel projet.

Un autre objectif est de réduire la taille de PSELT et de le modifier avec l'aide des chimistes du laboratoire afin de le stabiliser davantage pour en augmenter l'efficacité et la biodisponibilité et permettre ainsi un transfert vers la clinique. A plus long terme, nous chercherons avec l'aide des galénistes de notre Unité à encapsuler le PSELT ou une forme plus courte compatible avec le passage de la BHE pour le protéger de la dégradation enzymatique après une administration par voie orale, ce qui représentera un avantage certain pour une thérapie avec ce peptide (Morishita et al., 2006). Le fait que le PSELT puisse traverser la membrane plasmique, au moins

dans des cellules en culture comme nous l'avons montré dans ce travail de thèse, peut représenter un avantage dans cette direction.

En conclusion, nous avons identifié pour la première fois un peptide dérivé de la SelT qui présente des propriétés neuroprotectrices permettant une réduction du déficit moteur dans un modèle de la MP. Ce travail de thèse ouvre donc la voie au développement d'une nouvelle thérapie de la MP. D'autres études précliniques sont encore nécessaires pour mener ce projet vers la clinique et répondre à un besoin thérapeutique pour cette maladie malheureusement encore incurable.

RÉFÉRENCES

-A-

- Abbas N., Lücking C. B., Ricard S., Dürr A., Bonifati V., De Michele G., Bouley S., Vaughan J. R., Gasser, T., Marconi R., Broussolle E., Brefel-Courbon C., Harhangi B. S., Oostra B. A., Fabrizio E., Böhme G. A., Pradier L., Wood N. W., Filla A., Meco G., Deneffe P., Agid Y. & Brice, A., A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease, *Hum. Mot. Genet.*, 1999, 8, 567-574.
- Abedi PM, Delaville C, De Deurwaerdère P, Benjelloun W, Benazzouz A. Intrapallidal administration of 6-hydroxydopamine mimics in large part the electrophysiological and behavioral consequences of major dopamine depletion in the rat. *Neuroscience* 236: 289–97, 2013.
- Akbaraly NT, Arnaud J, Hininger-Favier I, Gourlet V, Roussel AM, Berr C (2005) Selenium and mortality in the elderly: results from the EVA study. *Clin Chem* 51:2117-2123.
- Akbaraly NT, Hininger-Favier I, Carriere I, Arnaud J, Gourlet V, Roussel AM, Berr C (2007) Plasma selenium over time and cognitive decline in the elderly. *Epidemiology* 18:52-58.
- Alberio T, Lopiano L, Fasano M (2012) Cellular models to investigate biochemical pathways in Parkinson's disease. *FEBS J* 2012 279:1146-1155.
- Allmang C, Wurth L, Krol A (2009) The selenium to selenoprotein pathway in eukaryotes: more molecular partners than anticipated. *Biochim Biophys Acta* 1790:1415–1423.
- Amantana A, Vorachek WR, Butler JA, Costa ND, Whanger PD (2002) Effect of copper, zinc and cadmium on the promoter of selenoprotein W in glial and myoblast cells. *J Inorg Biochem* 91:356-362.
- Ambani LM, Van Woert MH, Murphy S (1975) Brain peroxidase and catalase in Parkinson disease. *Arch Neurol* 32:114–118.
- Anaes, “Rapport D'Étape : Évaluation De La Stimulation Cérébrale Profonde Idiopathique Juin 2002,” 2002.
- Angelova EA, Atanassova PA, Chalakova NT, Dimitrov BD (2008) Associations between serum selenium and total plasma homocysteine during the acute phase of ischaemic stroke. *Eur Neurol* 60:298-303.

- Anouar Y, Lihrmann I, Falluel-Morel A, Boulhzar L. Selenoprotein T is a key player in ER proteostasis, neuroprotection and endocrine homeostasis. *Free Rad Biol Med* (in press).
- Anthony PM, diederich NJ, Balling R. Parkinson's disease mouse models in translational research. *Mamm Genome* 22: 401–19, 2011.
- Arenas E (2010) Towards stem cells replacement therapies in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 396:152-156.
- Ariga H, Takahashi-Niki K, Kato I, Maita H, Niki T, Iguchi-Ariga S.M. Neuroprotective function on DJ-1 in Parkinson's disease. *Oxid Med Cell Longev* 2013: 68392, 2013.
- Arner ES, Holmgren A (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 267:6102-6109.

-B-

- Bakay RA, Fiandaca MS, Barrow DL, Schiff A, Collins DC (1985) Preliminary report on the use of fetal tissue transplantation to correct MPTP-induced Parkinson-like syndrome in primates. *Appl Neurophysiol* 48:358-361.
- Barayuga SM, Pang X, Andres MA, Panee J, Bellinger FP (2013) Methamphetamine decreases levels of glutathione peroxidases 1 and 4 in SH-SY5Y neuronal cells: protective effects of selenium. *Neurotoxicology* 37:240-246.
- Barone P, Bravi D, Bermejo-Pareja F, Marconi R, Kulisevsky J, Malagù S, Weiser R, Rost N (1999) Pergolide monotherapy in the treatment of early PD: a randomized, controlled study. Pergolide Monotherapy Study Group *Neurology* 53:573-579.
- Barouki, R (2006) Ageing free radicals and cellular stress. *Médecine Sci. MS* 22:266–272.
- Barrington JW, Lindsay P, James D, Smith S, Roberts A (1996) Selenium deficiency and miscarriage: a possible link? *Br J Obstet Gynaecol* 103:130-132.
- Barrington JW, Taylor M, Smith S, Bowen-Simpkins P (1997) Selenium and recurrent miscarriage. *J Obstet Gynaecol* 17:199-200.
- Bashan N, Kovsan J, Kachko I, Ovadia H, Rudich A (2009). Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiol Rev* 89:27–71.
- Bastide MF, Meissner WG, Picconi B, Fasano S, Fernagut PO, Feyder M, Francardo V, Alcacer C, Ding Y, Brambilla R, Fisone G, Jon Stoessl A, Bourdenx M, Engeln M, Navailles S, De Deurwaerdère P, Ko WK, Simola N, Morelli M, Groc L, Rodriguez MC, Gurevich EV,

- Quik M, Morari M, Mellone M, Gardoni F, Tronci E, Guehl D, Tison F, Crossman AR, Kang UJ, Steece-Collier K, Fox S, Carta M, Angela Cenci M, Bézard E (2015) Pathophysiology of L-dopa-induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 132:96-168.
- Bates JM, St Germain DL, Galton VA (1999) Expression profiles of the three iodothyronine deiodinases, D1, D2, and D3, in the developing rat. *Endocrinology* 140:844-851.
 - Baum MK, Shor-Posner G, Lai S, Zhang G, Lai H, Fletcher MA, Sauberlich H, Page JB (1997) High risk of HIV-related mortality is associated with selenium deficiency. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 15:370-374.
 - Behne D, Kyriakopoulos A, Meinhold H, Köhrle J (1990) Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 173:1143–1149.
 - Beilstein MA, Vendeland SC, Barofsky E, Jensen ON, Whanger PD (1996) Selenoprotein W of rat muscle binds glutathione and an unknown small molecular weight moiety. *J Inorg Biochem* 61:117-124.
 - Belal, S., Zaiem, A., Gouider-khouja, N., Ben-djebara, M., Daghfous R., et al. (2008) Mise au point sur les stratégies de prise en charge de la maladie de Parkinson Apokinon et expertise clinique, *RMNSCI.net*, vol.3.
 - Bellinger FP, Bellinger MT, Seale LA, Takemoto AS, Aman AV, Miki T, Manning-Bog AB, Berry MJ, White LR, Ross GW (2011) Glutathione peroxidase 4 is associated with neuromelanin in Substantia Nigra and dystrophic axons in putamen of Parkinson's brain. *Mol Neurodegener* 6:8.
 - Bellinger FP, He QP, Bellinger MT, Lin Y, Raman AV, White LR, Berry MJ (2008) Association of selenoprotein p with Alzheimer's pathology in human cortex. *J Alzheimers Dis* 15:465-472.
 - Bellinger FP, Raman AV, Reeves MA, Berry MJ (2009) Regulation and function of selenoproteins in human disease. *Biochem J* 422:11–22.
 - Bellinger FP, Raman AV, Rueli RH, Bellinger MT, Dewing AS (2012) Changes in Selenoprotein P in substantia nigra and Putamen in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 2:115–126.

- Belujon P, Bezard E, Taupignon A, Bioulac B, Benazzouz A (2007). Noradrenergic modulation of subthalamic nucleus activity: behavioral and electrophysiological evidence in intact and 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J Neurosci* 27: 9595- 606.
- Benabid AL, Chabardès S, Seigneuret E (2005) Deep-brain stimulation in Parkinson's disease: long-term efficacy and safety - What happened this year? *Curr Opin Neurol* 18:623-30.
- Bensadoun JC, Mirochnitchenko O, Inouye M, Aebischer P, Zurn AD (1998) Attenuation of 6-OHDA-induced neurotoxicity in glutathione peroxidase transgenic mice. *Eur J Neurosci* 10:3231-3236.
- Berr C, Balansard B, Arnaud J, Roussel AM, Alperovitch A (2000) Cognitive decline is associated with systemic oxidative stress: the EVA study. *Etude du Vieillissement Arteriel. J Am Geriatr Soc* 48:1285-1291.
- Berry MJ, Banu L, Chen YY, Mandel SJ, Kieffer JD, Harney JW, Larsen PR (1991) Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. *Nature* 353:273-276.
- Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2:326-332.
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 3: 1301–06, 2000.
- Bezard E, Dovero S, Imbert C, Boraud T, Gross CE (2000) Spontaneous long-term compensatory dopaminergic sprouting in MPTP-treated mice. *Synapse* 38:363-368.
- Bezard E, Jaber M, Gonon F, Boireau A, Bloch B, Gross CE (2000) Adaptive changes in the nigrostriatal pathway in response to increased 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurodegeneration in the mouse. *Eur J Neurosci* 12:2892-900.
- Bharath S, Hsu M, Kaur D, Rajagopalan S, Andersen JK. Glutathione, iron and Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol* 64: 1037–48, 2002.
- Bhat NR, Zhang P (1999) Hydrogen Peroxide Activation of Multiple Mitogen-Activated Protein Kinases in an Oligodendrocyte Cell Line. *J Neurochem* 72:112–119.

- Bjelakovic G, Nikolova D, Simonetti RG, Gluud C (2004) Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 364:1219-1228.
- Blackinton J, Kumaran R, van der Brug MP, Ahmad R, Olson L, Galter D, Lees A, Bandopadhyay R, Cookson MR (2009) Post-transcriptional regulation of mRNA associated with DJ-1 in sporadic Parkinson disease. *Neurosci Lett* 452:8-11.
- Blesa J, Trigo-Damas I, Dileone M, Del Rey NL, Hernandez LF, Obeso JA (2017) Compensatory mechanisms in Parkinson's disease: Circuits adaptations and role in disease modification. *Exp Neurol* 298:148-161.
- Bloem BR. Postural instability in Parkinson's disease. *Clin Neurol Neurosurg* 94 Suppl: S41–5, 1992.
- Bonifati V. LRRK2 low-penetrance mutations (Gly2019Ser) and risk alleles (Gly2385Arg)-linking familial and sporadic Parkinson's disease, *Neurochem Res* 32: 1700–08, 2007.
- Boukhar L, Hamieh A, Cartier D, Tanguy Y, Alsharif I, Castex M, Arabo A, Hajji SE, Bonnet J-J, Errami M, Falluel-Morel A, Chagraoui A, Lihrmann I and Anouar Y (2016) Selenoprotein T Exerts an Essential Oxidoreductase Activity That Protects Dopaminergic Neurons in Mouse Models of Parkinson's Disease. *Antioxid Redox Signal* 24:557–574.
- Boukhar L, Tanguy Y, Abid H, Castex M, Hamieh A, Alsharif I, Cartier D, Prevost G, Falluel-Morel A, Lihrmann I, Chagraoui A, Anouar Y (2016) Selenoprotein T: From discovery to functional studies using conditional knockout mice. Eds: D.L. Hatfield et al., *Selenium*, Springer Science, pp 275-286.
- Brigelius-Flohe R, Aumann KD, Blocker H, Gross G, Kiess M, Kloppel KD, Maiorino M, Roveri A, Schuckelt R, Usani F (1994) Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and deduced amino acid sequence. *J Biol Chem* 269:7342-7348.
- Burk RF, Hill KE (2009b) Selenoprotein P-expression, functions, and roles in mammals. *Biochim Biophys Acta* 1790:1441-1447.
- Burton GJ, Jauniaux E (2011) Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 25:287–299.
- Butterfield DA, Hensley K, Cole P, Subramaniam R, Aksenov M, Aksenova M, Bummer PM, Haley BE, Carney JM (1997) Oxidatively induced structural alteration of glutamine synthetase assessed by analysis of spin label incorporation kinetics: relevance to Alzheimer's disease. *J*

Neurochem 68:2451–2457.

-C-

- Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D (2002) IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415:92-96.
- Campa A, Shor-Posner G, Indacochea F, Zhang G, Lai H, Asthana D, Scott GB, Baum MK (1999) Mortality risk in selenium-deficient HIV-positive children. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 20:508-513.
- Castellano S, Gladyshev VN, Guigo R, Berry MJ (2008) SelenoDB 1.0 : a database of selenoprotein genes, proteins and SECIS elements. *Nucleic Acids Res* 36:D332-D338.
- Castex MT, Arabo A, Bénard M, Roy V, Le Joncour V, Prévost G, Bonnet JJ, Anouar Y, Falluel-Morel A. Selenoprotein T Deficiency Leads to Neurodevelopmental Abnormalities and Hyperactive Behavior in Mice. *Mol Neurobiol* 53: 5818–32, 2016
- Castro A, Valdeoriola F, Linazasoro G, Rodriguez-Oroz MC, Stochi F, Marin C, Rodriguez M, Vaamonde J, Jenner P, Alvarez L, Pavon N, Macias R, Luquin MR, Hernandez B, Grandas F, Gimenez-Roldan S, Tolosa E, Obeso JA (2005) Optimization of use of levodopa in Parkinson's disease: role of levodopa-carbidopa-entacapone combination. *Neurologia* 20:180-188.
- Cecarini V, Ding Q, and Keller, JN (2007) Oxidative inactivation of the proteasome in Alzheimer's disease. *Free Radic Res* 41:673–680.
- Cerutti PA (1985) Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 227:375–381.
- Chae HZ, Kang SW, Rhee SG (1999) Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. *Methods Enzymol* 300:219-226.
- Chance B, Sies H, Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59:527–605.
- Charcot JM. Leçons, 1872.
- Cheeseman KH, Slater TF (1993) An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 49: 481–493.
- Chen J, He J, Hamm L, Batuman V, Whelton PK (2002) Serum antioxidant vitamins and blood pressure in the United States population. *Hypertension* 40:810–816.

- Cheng YY, Qian PC (1990) The effect of selenium-fortified table salt in the prevention of Keshan disease on a population of 1.05 million. *Biomed Environ Sci* 3:422-428.
- Chung YW, Jeong D, Noh OJ, Park YH, Kang SI, Lee MG, Lee TH, Yim MB, Kim IY (2009) Antioxidative role of selenoprotein W in oxidant-induced mouse embryonic neuronal cell death. *Mol Cells* 27:609-613.
- Ciesielska A, Joniec I, Kurkowska-Jastrzebska I, Cudna A, Przybyłkowski A, Członkowska A, Członkowski A (2009) The impact of age and gender on the striatal astrocytes activation in murine model of Parkinson's disease. *Inflamm Res* 58:747–53, 2009.
- Coma M, Guix FX, Ill-Raga G, Uribealago I, Alameda F, Valverde MA, Muñoz FJ (2008) Oxidative stress triggers the amyloidogenic pathway in human vascular smooth muscle cells. *Neurobiol Aging* 29:969–980.
- Conrad M, Schneider M, Seiler A, Bornkamm GW (2007) Physiological role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mammals. *Biol Chem* 388:1019-1025.
- Coon MJ, Ding XX, Pernecky SJ, Vaz AD (1992) Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 6:669–673.
- Copeland PR, Fletcher JE, Carlson BA, Hatfield DL, Driscoll DM (2000) A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs. *EMBO J* 19:306-314.
- Cornett CR, Markesbery WR, Ehmann WD (1998) Imbalances of trace elements related to oxidative damage in Alzheimer's disease brain. *Neurotoxicology* 19:339-345.
- Crack PJ, Taylor JM, Flentjar NJ, de HJ, Hertzog P, Iannello RC, Kola I (2001) Increased infarct size and exacerbated apoptosis in the glutathione peroxidase-1 (Gpx-1) knockout mouse brain in response to ischemia/reperfusion injury. *J Neurochem* 78:1389-1399.
- Croteau W, Davey JC, Galton VA, St Germain DL (1996) Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase. A selenoprotein differentially expressed and regulated in human and rat brain and other tissues. *J Clin Invest* 98:405-417.
- Cummings JL. Toward a molecular neuropsychiatry of neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* 54: 147-54, 2003

-D-

- Damier P, Tremblay L, Féger J, Hirsch EC (2000) Développement des dyskinesies provoquées par le traitement de la maladie de Parkinson : rôle de la première exposition à la L-

- Dopa (ou phénomène de priming). *Rev Neurol*, 156:224-235.
- Dauer W, Przedborski S (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889-909.
 - Dawson TM and Dawson VL (2010) The role of parkin in familial and sporadic Parkinson's disease. *Mov Disord* 25: S32–S39.
 - Defe L, Krystkowiak P, Blond S, and Destée A, “Stimulation électrique chronique du pallidum interne et du noyau subthalamique dans la maladie de Parkinson,” *Presse Med.*, vol. 29, no. 27, pp. 5–11, 2013.
 - Defebvre L, Moreau C (2017) Medical and surgical treatment of Parkinson's disease. *Presse Med* 46:218-224
 - DeLeo FR, Quinn MT (1996) Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leukoc Biol* 60:677–691.
 - Delwaide PJ, Sabbatino M, Delwaide C. Some pathophysiological aspects of the parkinsonian rigidity. *J Neural Transm Suppl* 22: 129–39, 1986.
 - Denziak M, Thisse C, Rederstorff M, Hindelang C, Thisse B, Lescure A (2007) Loss of selenoprotein N function causes disruption of muscle architecture in the zebrafish embryo. *Exp Cell Res* 313:156-167.
 - Dias V, Junn E, Mouradian MM. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Parkins Dis* 3: 361–391, 2013
 - Dikiy A, Novoselov SV, Fomenko DE, Sengupta A, Carlson BA, Cerny RL, Ginalski K, Grishin NV, Hatfield DL, Gladyshev VN (2007) SelT, SelW, SelH, and Rdx12: genomics and molecular insights into the functions of selenoproteins of a novel thioredoxin-like family. *Biochemistry* 46:6871-6882.
 - Ding Q, Dimayuga E, Keller JN (2006) Proteasome regulation of oxidative stress in aging and age-related diseases of the CNS. *Antioxid Redox Signal* 8:163–172.
 - Domenger D, Dea D, Theroux L, Moquin L, Gratton A, Poirier J (2012) The MPTP neurotoxic lesion model of Parkinson's disease activates the apolipoprotein E cascade in the mouse brain. *Exp Neurol* 233:513-522.
 - Domenger D, Dea D, Theroux L, Moquin L, Gratton A, Poirier J (2011) The MPTP neurotoxic lesion model of Parkinson's disease activates the apolipoprotein E cascade in the mouse brain.

Exp Neurol 233:513-22.

- Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, Marshall FJ, Ravina BM, Schifitto G, Siderowf A, Tanner CM. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* 68: 384–6, 2007.

- Driscoll DM, Copeland PR (2003) Mechanism and regulation of selenoprotein synthesis. *Annu Rev Nutr* 23:17-40.

- Dumitrescu AM, Liao XH, Abdullah MS, Lado-Abeal J, Majed FA, Moeller LC, Boran G, Schomburg L, Weiss RE, Refetoff S (2005) Mutations in SECISBP2 result in abnormal thyroid hormone metabolism. *Nat Genet* 37:1247-1252.

- Duntas LH, Mantzou E, Koutras DA (2003) Effects of a six month treatment with selenomethionine in patients with autoimmune thyroiditis. *Eur J Endocrinol* 148:389-393.

-E-

- Elbaz A, Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Peterson BJ, Ahlskog JE, Schaid DJ, Rocca WA. Risk tables for parkinsonism and Parkinson's disease. *J Clin Epidemiol* 55: 25–31, 2002.

- Etminan M, FitzGerald JM, Gleave M, Chambers K (2005) Intake of selenium in the prevention of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Causes Control* 16:1125-1131.

-F-

- Fahn S (2006) Levodopa in the treatment of Parkinson's disease (2006) *J Neural Transm* (71):1-15

- Fairweather-Tait SJ, Bao Y, Broadley MR, Collings R, Ford D, Hesketh JE, Hurst R (2011) Selenium in human health and disease. *Antioxid Redox Signal* 14:1337-1383.

- Farag ES, Vinters HV, Bronstein J (2009) Pathologic findings in retinal pigment epithelial cell implantation for Parkinson disease. *Neurology* 73:1095-1102.

- Fernandez HH, Vanagunas A, Odin P, Espay AJ, Hauser RA, Standaert DG, Chatamra K, Benesh J, Pritchett Y, Hass SL, Lenz RA (2013) Levodopa-carbidopa intestinal gel in advanced Parkinson's disease open-label study: interim results. *Parkinsonism Relat Disord* 19:339-345.

- Ferreira A, Ceuterick-de GC, Marks JJ, Goemans N, Schreiber G, Hanefeld F, Fardeau M, Martin JJ, Goebel HH, Richard P, Guicheney P, Bonnemann CG (2004) Desmin-related myopathy with Mallory body-like inclusions is caused by mutations of the selenoprotein N gene. *Ann Neurol* 55:676-686.
- Ferreira A, Quijano-Roy S, Pichereau C, Moghadaszadeh B, Goemans N, Bonnemann C, Jungbluth H, Straub V, Villanova M, Leroy JP, Romero NB, Martin JJ, Muntoni F, Voit T, Estournet B, Richard P, Fardeau M, Guicheney P (2002) Mutations of the selenoprotein N gene, which is implicated in rigid spine muscular dystrophy, cause the classical phenotype of multimincore disease: reassessing the nosology of early-onset myopathies. *Am J Hum Genet* 71:739-749.
- Fesenko EE, Kolesnikov SS, Lyubarsky AL (1985) Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* 313:310–313.
- Finkel T (2000) Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett.* 476:52–54.
- Fisone G, Bezard E. Molecular mechanisms of l-DOPA-induced dyskinesia (2011) *Int Rev Neurobiol* 98:95-122.
- Flanigan KM, Kerr L, Bromberg MB, Leonard C, Tsuruda J, Zhang P, Gonzalez-Gomez I, Cohn R, Campbell KP, Leppert M (2000) Congenital muscular dystrophy with rigid spine syndrome: a clinical, pathological, radiological, and genetic study. *Ann Neurol* 47:152-161.
- Foley P and Riederer P. Influence of neurotoxins and oxidative stress on the onset and progression of Parkinson's disease. *J Neurol* 247 Suppl 2: II82–94, 2000.
- Forno LS, Langston JW, DeLanney LE, Irwin I, Ricaurte GA (1986) Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys. *Ann Neurol* 20:449-455.
- Fourquet S, Guerois R, Biard D, Toledano MB (2010) Activation of NRF2 by nitrosative agents and H₂O₂ involves KEAP1 disulfide formation. *J Biol Chem* 285:8463–8471.
- Fradejas N, Del CS-P, Tranque P, Calvo S (2011) Selenoprotein S expression in reactive astrocytes following brain injury. *Glia* 59:959-972.
- Fradejas N, Pastor MD, Mora-Lee S, Tranque P, Calvo S (2008) SEPS1 gene is activated during astrocyte ischemia and shows prominent antiapoptotic effects. *J Mol Neurosci* 35:259-265.

- Freed Cr, Greene Pe, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JQ, Eidelberg D, Fahn S (2001) Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 344:710-719.
- Friedlander RM (2003) Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med* 348:1365-1375.
- Fujioka S, Wszolek ZK. Update on genetics of parkinsonism. *Neurodegener Dis* 10: 257–60, 2012.

-G-

- Gandhi S, Abramov AY (2012) Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev* 2012:428010.
- Gao S, Jin Y, Hall KS, Liang C, Unverzagt FW, Ji R, Murrell JR, Cao J, Shen J, Ma F, Matesan J, Ying B, Cheng Y, Bian J, Li P, Hendrie HC (2007) Selenium level and cognitive function in rural elderly Chinese. *Am J Epidemiol* 165:955-965.
- Gartner R, Gasnier BC, Dietrich JW, Krebs B, Angstwurm MW (2002) Selenium supplementation in patients with autoimmune thyroiditis decreases thyroid peroxidase antibodies concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1687-1691.
- Gasdaska PY, Gasdaska JR, Cochran S, Powis G (1995) Cloning and sequencing of a human thioredoxin reductase. *FEBS Lett* 373:5-9.
- Gateff D, "Les thérapies cellulaires dans le cadre de la maladie de Parkinson," 2009.
- Gelpi C, Sontheimer EJ, Rodriguez-Sanchez JL (1992) Autoantibodies against a serine tRNA-protein complex implicated in cotranslational selenocysteine insertion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:9739-9743.
- Ghosh A, Kanthasamy A, Joseph J, Anantharam V, Srivastava P, Dranka BP, Kalyanaraman B, Kanthasamy AG (2012) Anti-inflammatory and neuroprotective effects of an orally active apocynin derivative in pre-clinical models of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation* 9:241.
- Gilbert HF (1990) Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 63:69-172.
- Glatte E, Thomassen Y, Thoresen SO, Haldorsen T, Lund-Larsen PG, Theodorsen L, Aaseth J (1989) Prediagnostic serum selenium in a case-control study of thyroid cancer. *Int J Epidemiol* 18:45-49.

- Goldberg MS, Pisani A, Haburcak M, Vortherms TA, Kitada T, Costa C, Tong Y, Martella G, Tschertter A, Martins A, Bernardi G, Roth BL, Pothos EN, Calabresi P, Shen J. Nigrostriatal Dopaminergic Deficits and Hypokinesia Caused by Inactivation of the Familial Parkinsonism-Linked Gene DJ-1. *Neuron* 45: 489–96, 2005.
- Goldman SM. Environmental toxins and Parkinson's disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 54: 145–64, 2014.
- Goswami A, Dikshit P, Mishra A, Mulherkar S, Nukina N, Jana NR (2006) Oxidative stress promotes mutant huntingtin aggregation and mutant huntingtin-dependent cell death by mimicking proteasomal malfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 342:184–190.
- Gowers WR. An Address on Neurology and Therapeutics: Delivered before the Medical Society of London. *Br Med J* 1: 781–2, 1893.
- Greenamyre JT, Betarbet R, Sherer TB. The rotenone model of Parkinson's disease: genes, environment and mitochondria. *Parkinsonism Relat Disord* 9 Suppl 2: S59–64, 2003.
- Greenamyre JT, Cannon JR, Drolet R, Mastroberardino PG. Lessons from the rotenone model of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci* 31: 141–2, 2010.
- Gromer S, Johansson L, Bauer H, Arscott LD, Rauch S, Ballou DP, Williams CH Jr, Schirmer RH, Arnér ES (2003) Active sites of thioredoxin reductases: why selenoproteins? *Proc Natl Acad Sci USA* 100:12618–12623.
- Grumolato L, Ghzili H, Montero-Hadjadje M, Gasman S, Lesage J, Tanguy Y, Galas L, Ait-Ali D, Leprince J, Guerineau NC, Elkahloun AG, Fournier A, Vieau D, Vaudry H, Anouar Y (2008) Selenoprotein T is a PACAP-regulated gene involved in intracellular Ca²⁺ mobilization and neuroendocrine secretion. *FASEB J* 22:1756-1768.
- Gubellini P and Kachidian P. Animal models of Parkinson's disease: An updated overview. *Rev Neurol (Paris)* 171: 750–61, 2015.
- Gubellini P, Picconi B, Di Filippo M, Calabresi P. Downstream mechanisms triggered by mitochondrial dysfunction in the basal ganglia: from experimental models to neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1802: 151–61, 2009.
- Guimaraes MJ, Peterson D, Vicari A, Cocks BG, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Ferrick DA, Kastelein RA, Bazan JF, Zlotnik A (1996) Identification of a novel selD homolog from eukaryotes, bacteria, and archaea: is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism? *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:15086-15091.

-H-

- Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, Charlier C, Chapelle JP (2007) Oxidative stress. *Rev. Médicale Liège* 62:628–638.
- Halliwell B (1995) How to characterize an antioxidant: an update. *Biochem Soc Symp* 61:73–101.
- Halliwell B (2006) Proteasomal dysfunction: a common feature of neurodegenerative diseases? Implications for the environmental origins of neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal* 8:2007–2019.
- Halliwell B, Gutteridge J (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine* (Oxford University Press).
- Hamieh A, Cartier D, Abid H, Calas A, Burel C, Bucharles C, Jehan C, Grumolato L, Landry M, Lerouge P, Anouar Y, Lihrmann I (2017) Selenoprotein T is a novel OST subunit that regulates UPR signaling and hormone secretion. *EMBO Rep.* 18:1935-1946.
- Hamieh, 2017
- Hamza T.H. and Payami H. The heritability of risk and age at onset of Parkinson's disease after accounting for known genetic risk factors. *J Hum Genet* 55: 241–3, 2010.
- Hauser DN, Dukes AA, Mortimer AD, Hastings TG (2013) Dopamine quinone modifies and decreases the abundance of the mitochondrial selenoprotein glutathione peroxidase 4. *Free Radic Biol Med* 65:419-427.
- Hawkes CH. Parkinson's disease and aging: same or different process? *Mov Disord* 1: 47–53, 2008.
- Hill KE, McCollum GW, Boeglin ME, Burk RF (1997) Thioredoxin reductase activity is decreased by selenium deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 234:293-295.
- Holmgren A (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* 264:13963-13966.
- Huang C, Zhang Z, Ding M, Li J, Ye J, Leonard SS, Shen HM, Butterworth L, Lu Y, Costa M, et al. (2000) Vanadate Induces p53 Transactivation through Hydrogen Peroxide and Causes Apoptosis. *J Biol Chem* 275:32516–32522.

-I-

- Ibraheem D, Elaissari A, Fessi H (2014) Administration strategies for proteins and peptides. *Int J Pharm* 477:578-589.

-J-

- Jacobs ET, Jiang R, Alberts DS, Greenberg ER, Gunter EW, Karagas MR, Lanza E, Ratnasinghe L, Reid ME, Schatzkin A, Smith-Warner SA, Wallace K, Martinez ME (2004) Selenium and colorectal adenoma: results of a pooled analysis. *J Natl Cancer Inst* 96:1669-1675.
- Jakupoglu C, Przemeck GK, Schneider M, Moreno SG, Mayr N, Hatzopoulos AK, de Angelis MH, Wurst W, Bornkamm GW, Brielmeier M, Conrad M (2005) Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development. *Mol Cell Biol* 25:1980-1988.
- Jarraya B, Boulet S, Ralph GS, Jan C, Bonvento G, Azzouz M, Miskin JE, Shin M, Delzescaux T, Drouot X, Hérard AS, Day DM, Brouillet E, Kingsman SM, Hantraye P, Mitrophanous KA, Mazarakis ND, Palfi S (2009) Dopamine gene therapy for Parkinson's disease in a nonhuman primate without associated dyskinesia. *Sci transl Med* 1:2ra4.
- Javoy-Agid F, Ruberg M, Taquet H, Studler JM, Garbarg M, Llorens C, Schwartz JC, Grouselle D, Lloyd KG, Raisman R, Agid Y. Biochemical neuroanatomy of the human substantia nigra (pars compacta) in normal and Parkinsonian subjects. *Adv Neurol* 35: 151–63, 1982.
- Jayaraman L, Murthy KG, Zhu C, Curran T, Xanthoudakis S, Prives C (1997) Identification of redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p53. *Genes Dev* 11:558-570.
- Jiang T, Sun Q, Chen S. Oxidative stress: A major pathogenesis and potential therapeutic target of antioxidative agents in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol.* 2016 Dec;147:1-19. doi: 10.1016/j.pneurobio.2016.07.005. Epub 2016 Oct 18. Review. PubMed PMID: 27769868.
- Johansson L, Gafvelin G, Arnér ES (2005) Selenocysteine in proteins-properties and biotechnological use. *Biochim Biophys Acta* 1726:1–13.
- Juryneć MJ, Xia R, Mackrill JJ, Gunther D, Crawford T, Flanigan KM, Abramson JJ, Howard MT, Grunwald DJ (2008) Selenoprotein N is required for ryanodine receptor calcium release channel activity in human and zebrafish muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:12485-12490.

-K-

- Kalmar B, Novoselov S, Gray A, Cheetham ME, Margulis B, Greensmith L (2008) Late stage treatment with arimocloamol delays disease progression and prevents protein aggregation in the

SOD1 mouse model of ALS. *J Neurochem* 107:339-350.

- Katoh S, Mitsui Y, Kitani K, Suzuki T (1999) Hyperoxia induces the neuronal differentiated phenotype of PC12 cells via a sustained activity of mitogen-activated protein kinase induced by Bcl-2. *Biochem J* 338:465–470.

- Katzenschlager R, Evans A, Manson A, Patsalos PN, Ratnaraj N, Watt H, Timmermann L, Van der Giessen R, Lees AJ (2004) Mucuna pruriens in Parkinson's disease: a double blind clinical and pharmacological study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75:1672-1677.

- Kikuchi T, Morizane A, Doi D, Magotani H, Onoe H, Hayashi T, Mizuma H, Takara S, Takahashi R, Inoue H, Morita S, Yamamoto M, Okita K, Nakagawa, M, Parmar M, Takahashi J (2017) Human iPS cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model. *Nature* 548:592-596.

- Kim H, Jhoo W, Shin E, Bing G (2000) Selenium deficiency potentiates methamphetamine-induced nigral neuronal loss; comparison with MPTP model. *Brain Res* 862:247-252.

- Kim HC, Jhoo WK, Choi DY, Im DH, Shin EJ, Suh JH, Floyd RA, Bing G (1999) Protection of methamphetamine nigrostriatal toxicity by dietary selenium. *Brain Res* 851:76-86.

- Kim HY, Fomenko DE, Yoon YE, Gladyshev VN (2006) Catalytic advantages provided by selenocysteine in methionine-S-sulfoxide reductases. *Biochemistry* 45:13697-13704.

- Kim RH, Smith PD, Aleyasin H, Hayley S, Mount MP, Pownall S, Wakeham A, AJ. You-Ten, Kalia SK, Horne P, Westaway D, Lozano AM, Anisman H, Park DS and Mak TW. Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 5215–20, 2005.

- Kim YJ, Chai YG, Ryu JC (2005) Selenoprotein W as molecular target of methylmercury in human neuronal cells is down-regulated by GSH depletion. *Biochem Biophys Res Commun* 330:1095-1102.

- Kinzy SA, Caban K, Copeland PR (2005) Characterization of the SECIS binding protein 2 complex required for the co-translational insertion of selenocysteine in mammals. *Nucleic Acids Res* 33:5172-5180.

- Kiremidjian-Schumacher L, Roy M, Glickman R, Schneider K, Rothstein S, Cooper J, Hochster H, Kim M, Newman R (2000) Selenium and immunocompetence in patients with head and neck cancer. *Biol Trace Elem Res* 73:97-111.

- Kiremidjian-Schumacher L, Roy M, Wishe HI, Cohen MW, Stotzky G (1994) Supplementation with selenium and human immune cell functions. II. Effect on cytotoxic lymphocytes and natural killer cells. *Biol Trace Elem Res* 41:115-127.
- Kish SJ, Shannak K, Hornykiewicz O. Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. *N Engl J Med* 318: 876–80, 1988.
- Kitada, T, Asakawa, S, Hattori, N, Matsumine, H, Yamamura, Y, Minoshima, S, Yokochi, M, Mizuno, Y, Shimizu, N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392: 605–8, 1998.
- Kitada, Youren Tong, Clement A. Gautier and Jie Shen. Absence of nigral degeneration in aged parkin/DJ-1/PINK1 triple knockout mice. *J Neurochem* 111: 696–702, 2009.
- Klivenyi P, Andreassen OA, Ferrante RJ, Dedeoglu A, Mueller G, Lancelot E, Bogdanov M, Andersen JK, Jiang D, Beal MF (2000) Mice deficient in cellular glutathione peroxidase show increased vulnerability to malonate, 3-nitropropionic acid, and 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *J Neurosci* 20:1-7.
- Korotkov KV, Kumaraswamy E, Zhou Y, Hatfield DL, Gladyshev VN (2001) Association between the 15-kDa selenoprotein and UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase in the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Biol Chem* 276:15330-15336.
- Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigo R, Gladyshev VN (2003) Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 300:1439-1443.
- Kryukov GV, Kryukov VM, Gladyshev VN (1999) New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements. *J Biol Chem* 274:33888-33897.

-L-

- Labunskyy VM, Ferguson AD, Fomenko DE, Chelliah Y, Hatfield DL, Gladyshev VN (2005) A novel cysteine-rich domain of Sep15 mediates the interaction with UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase. *J Biol Chem* 280:37839-37845.
- Labunskyy VM, Hatfield DL, Gladyshev VN (2007) The Sep15 protein family: roles in disulfide bond formation and quality control in the endoplasmic reticulum. *IUBMB Life* 59:1-5.

- Le W, Sayana P, Jankovic J. Animal models of Parkinson's disease: a gateway to therapeutics? *Neurotherapeutics* 11: 92–110, 2014.
- Leprince J, Gandolfo P, Thoumas JL, Patte C, Fauchère JL, Vaudry H, Tonon MC (1998) Structure-activity relationships of a series of analogues of the octadecaneuropeptide ODN on calcium mobilization in rat astrocytes. *J Med Chem* 41:4433-4438.
- Leussis MP, Bolivar VJ (2006) Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. *Neurosci Biobehav Rev* 30:1045-1064.
- LeWitt PA, Rezai AR, Leehey MA, Ojemann SG, Flaherty AW, Eskandar EN, Kostyk SK, Thomas K, Sarkar A, Siddiqui MS, Tatter SB, Schwalb JM, Poston KL, Henderson M, Kurlan RM, Richard IH, Van Meter L, Sapan CV, Doring MJ, Kaplitt Mg, Feigin A (2011) AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomized trial. *Lancet Neurol* 10:309-319.
- Li J, O W, Li W, Jiang Z-G, Ghanbari HA (2013) Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Int J Mol Sci* 14:24438–24475.
- Lindenau J, Noack H, Asayama K, Wolf G (1998) Enhanced cellular glutathione peroxidase immunoreactivity in activated astrocytes and in microglia during excitotoxin induced neurodegeneration. *Glia* 24:252-256.
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev* 4:118–126.
- Lopes C, Ribeiro M, Duarte AI, Humbert S, Saudou F, Pereira de Almeida L, Hayden M, Rego AC (2014) IGF-1 intranasal administration rescues Huntington's disease phenotypes in YAC128 mice. *Mol Neurobiol* 49:1126-1142.
- Lovell MA, Xie C, Gabbita SP, Markesbery WR (2000) Decreased thioredoxin and increased thioredoxin reductase levels in Alzheimer's disease brain. *Free Radic Biol Med* 28:418-427.
- Low SC, Harney JW, Berry MJ (1995) Cloning and functional characterization of human selenophosphate synthetase, an essential component of selenoprotein synthesis. *J Biol Chem* 270:21659-21664.
- Lu J, Holmgren A (2014) The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic. Biol. Med* 66:75–87.

- Lunec J, Holloway KA, Cooke MS, Faux S, Griffiths HR, Evans MD (2002) Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: redox regulation of DNA repair in vivo? *Free Radic Biol Med* 33:875–885.
- Maiorino M, Scapin M, Ursini F, Biasolo M, Bosello V, Flohe L (2003) Distinct promoters determine alternative transcription of gpx-4 into phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase variants. *J Biol Chem* 278:34286-34290.

-M-

- Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M (2008) Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *FEBS J* 275:3959-3970.
- Mariotti M, Ridge PG, Zhang Y, Lobanov AV, Pringle TH, Guigo R, Hatfield DL, Gladyshev VN (2012) Composition and evolution of the vertebrate and mammalian selenoproteomes. *PLoS One* 7:e33066.
- Marklund SL, Westman NG, Lundgren E, Roos G (1982) Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res* 42:1955-1961.
- Marlatt MW, Lucassen PJ, Perry G, Smith MA, Zhu X (2008) Alzheimer's disease: cerebrovascular dysfunction, oxidative stress, and advanced clinical therapies. *J Alzheimers Dis JAD* 15:199–210.
- McDowell FH, Lee JE (1970) Levodopa, Parkinson's disease, and hypotension. *Ann Intern Med* 72:751-752.
- Mendes AF, Caramona MM, Carvalho AP, Lopes MC (2003) Hydrogen peroxide mediates interleukin-1 β -induced AP-1 activation in articular chondrocytes: implications for the regulation of iNOS expression. *Cell Biol Toxicol* 19:203–214.
- Meredith GE, Kang UJ. Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem. *Mov Disord* 21: 1595–606, 2006.
- Mitomi Y, Nomura T, Kurosawa M, Nukina N, Furukawa Y (2012) Post-aggregation oxidation of mutant huntingtin controls the interactions between aggregates. *J Biol Chem* 287:34764–34775.
- Miyama A, Saito Y, Yamanaka K, Hayashi K, Hamakubo T, Noguchi N (2011) Oxidation of DJ-1 induced by 6-hydroxydopamine decreasing intracellular glutathione. *PLoS One* 6:e27883.

- Morishita M, Peppas NA (2006) Is the oral route possible for peptide and protein drug delivery? *Drug Discov Today* 11:905-910.
- Moskovitz J, Bar-Noy S, Williams WM, Requena J, Berlett BS, Stadtman ER (2001) Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12920-12925.
- Moskovitz J, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Jursky F, Weissbach H, Brot N (1996) Chromosomal localization of the mammalian peptide-methionine sulfoxide reductase gene and its differential expression in various tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3205-3208.
- Moustafa ME and Antar HA (2012) A bioinformatics approach to characterize mammalian selenoprotein T. *Biochem Genet* 50:736–747.
- Muller WE, Pedigo NW (1994) Brain aging: a risk factor of neurodegenerative disorders and a target for therapeutic intervention. *Life Sci* 55:1975–1976.

-N-

- Nalls MA, Plagnol V, Hernandez DG, Sharma M, Sheerin UM, Saad M, Simón-Sánchez J, Schulte C, Lesage S, Sveinbjörnsdóttir S, Stefánsson K, Martinez M, Hardy J, Heutink P, Brice A, Gasser T, Singleton AB, Wood NW (2011) Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet* 377:641-649.
- Negro R, Greco G, Mangieri T, Pezzarossa A, Dazzi D, Hassan H (2007) The influence of selenium supplementation on postpartum thyroid status in pregnant women with thyroid peroxidase autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1263-1268.
- Nguyen A, Chen P, Cai H (2004) Role of CaMKII in hydrogen peroxide activation of ERK1/2, p38 MAPK, HSP27 and actin reorganization in endothelial cells. *FEBS Lett* 572:307–313.
- Niizuma K, Endo H, Chan PH (2009) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival. *J Neurochem* 109 Suppl 1:133-138.
- Nilsson D, Nyholm D (2001) Aquilonius SM. Duodenal levodopa infusion in Parkinson's disease--long-term experience. *Acta Neurol Scand* 104:343-348.
- Novoselov SV, Kryukov GV, Xu XM, Carlson BA, Hatfield DL, Gladyshev VN (2007) Selenoprotein H is a nucleolar thioredoxin-like protein with a unique expression pattern. *J Biol Chem* 282:11960-11968.

-O-

- Oberley LW (2001) Anticancer therapy by overexpression of superoxide dismutase. *Antioxid Redox Signal* 3:461-472.
- Obeso JA, Stamelou M, Goetz CG, Poewe W, Lang AE, Weintraub D, Burn D, Halliday GM, Bezard E, Przedborski S, Lehericy S, Brooks DJ, Rothwell JC, Hallett M, DeLong MR, Marras C, Tanner CM, Ross GW, Langston JW, Klein C, Bonifati V, Jankovic J, Lozano AM, Deuschl G, Bergman H, Tolosa E, Rodriguez-Violante M, Fahn S, Postuma RB, Berg D, Marek K, Standaert DG, Surmeier DJ, Olanow CW, Kordower JH, Calabresi P, Schapira AHV, Stoessl AJ (2017) Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsi. *Mov Disord* 32:1264-1310.
- Ohira A, Honda O, Gauntt CD, Yamamoto M, Hori K, Masutani H, Yodoi J, Honda Y (1994) Oxidative stress induces adult T cell leukemia derived factor/thioredoxin in the rat retina. *Lab Invest* 70:279-285.
- Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, Stoessl AJ, Sossi V, Brin MF, Shannon KM, Nauert GM, Perl DP, Godbold J, Freeman TB (2003) A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 54:403-414.
- Olanow CW, Kieburtz K, Odin P, Espay AJ, Standaert DG, Fernandez HH, Vanaganas A, Othman AA, Widnell KL, Robieson WZ, Pritchett Y, Chatamra K, Benesh J, Lenz RA, Antonini A (2014) LCIG Horizon Study Group. Continuous intrajejunal infusion of levodopa-carbidopa intestinal gel for patients with advanced Parkinson's disease: a randomised, controlled, double-blind, double-dummy study. *Lancet Neurol* 13:141-149.
- Orrell R, de BJ, Marklund S, Bowe F, Hallewell R (1995) A novel SOD mutant and ALS. *Nature* 374:504-505.

-P-

- Palfi S, Gurruchaga JM, Ralph GS, Lepetit H, Lavisse S, Buttery PC, Watts C, Miskin J, Kelleher M, Deeley S, Iwamura H, Lefaucheur JP, Thiriez C, Fenelon G, Lucas C, Brugières P, Gabriel I, Abhay K, Druot X, Tani N, Kas A, Ghaleh B, le Corvoisier P, Dolphin P, Breen DP, Mason S, Guzman NV, Mazarakis ND, Racliffe PA, Harrop R, Kingsman SM, Rasol O, Naylor S, Barker Ran Hantraye P, Remy P, Cesaro P, Mitrophanous KA (2014) Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet* 383:1138-1146.

- Pan-Montojo F, Anichtchik O, Dening Y, Knels L, Pursche S, Jung R, Jackson S, Gille G, Spillantini MG, Reichmann H, Funk RH. Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice. *PLoS One* 5: e8762, 2010.
- Panee J, Liu W, Nakamura K, Berry MJ (2007) The responses of HT22 cells to the blockade of mitochondrial complexes and potential protective effect of selenium supplementation. *Int. J Biol sci* 3:335-341.
- Pawlak K, Domaniewski T, Mysliwiec M, Pawlak D (2009) The kynurenines are associated with oxidative stress, inflammation and the prevalence of cardiovascular disease in patients with end-stage renal disease. *Atherosclerosis* 204:309-314.
- Peretz A, Neve J, Desmedt J, Duchateau J, Dramaix M, Famaey JP (1991) Lymphocyte response is enhanced by supplementation of elderly subjects with selenium-enriched yeast. *Am J Clin Nutr* 53:1323-1328.
- Peretz C, Segev H, Rozani V, Gurevich T, El-Ad B, Tsamir J, Giladi N (2016). Comparison of Selegiline and Rasagiline Therapies in Parkinson Disease: A Real-life Study. *Clin Neuropharmacol* 39:227-231.
- Perfeito R, Cunha-Oliveira T, Rego AC (2013) Reprint of: revisiting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson disease-resemblance to the effect of amphetamine drugs of abuse. *Free Radic Biol med* 62:186–201.
- Petit N, Lescure A, Rederstorff M, Krol A, Moghadaszadeh B, Wewer UM, Guicheney P (2003) Selenoprotein N: an endoplasmic reticulum glycoprotein with an early developmental expression pattern. *Hum Mol Genet* 12:1045-1053.
- Pillai R, Uyehara-Lock JH, Bellinger FP (2014) Selenium and selenoprotein function in brain disorders. *IUBMB Life* 66:229-239.
- Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K, Defraigne JO (2002) Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutr Clin Métabolisme* 16:233–239.
- Pires AO, Teixeira FG, Mendes-Pinheiro B, Serra SC, Sousa N, Salgado AJ (2017) Old and new challenges in Parkinson's disease therapeutics. *Prog Neurobiol* 156:69-89.
- Pitts MW, Reeves MA, Hashimoto AC, Ogawa A, Kremer P, Seale LA, Berry MJ (2013) Deletion of selenoprotein M leads to obesity without cognitive deficits. *J Biol Chem* 288:26121-26134.

- Polanco MJ, Parodi S, Piol D, Stack C, Chivet M, Contestabile A, Miranda HC, Lievens PM-J, Espinoza S, Jochum T, Rocchi A, Grunseich C, Gainetdinov RR, Cato ACB, Lieberman AP, la Spada AR, Sambataro , Fishbeck KH, Gozes I, Pennuto M (2016) Adenylyl cyclase activating pypeptide reduces phosphorylation and toxicity of the polyglutamine- expanded androgen receptor in spinobulbar muscular atrophy. *Sci Transl Med* 8:370ra181.
- Pollak P, Fraix V, Krack P, Moro E, Mendes A, Charbades S, Koudsiei A, and Benabid A (2002) “Treatment results: Parkinson’s disease.,” *Mov Disord*, 2002.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276: 2045–7, 1997.
- Power JH, Blunbergs PC (2009) Cellular glutathione peroxidase in human brain: Cellular distribution, and its potential role in the degradation of Lewy bodies in Parkinson’s disease and dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol* 117:63-73.
- Powers SK, Ji LL, Kavazis AN, Jackson MJ (2011) Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. *Compr Physiol* 1:941–969.
- Prevost G, Arabo A, Jian L, Quelennec E, Cartier D, Hassan S, Falluel-Morel A, Tanguy Y, Gargani S, Lihrmann I, Kerr-Conte J, Lefebvre H, Pattou F and Anouar Y (2013) The PACAP-regulated gene selenoprotein T is abundantly expressed in mouse and human β -cells and its targeted inactivation impairs glucose tolerance. *Endocrinology* 154:3796–3806.

-R-

- Ramsay RR, Singer TP. Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. *J Biol Chem* 261: 7585-7, 1986.
- Rangasamy T, Williams MA, Bauer S, Trush MA, Emo J, Georas SN, Biswal S (2010) Nuclear erythroid 2 p45-related factor 2 inhibits the maturation of murine dendritic cells by ragweed extract. *Am J Respir Cell Mol Biol* 43:76–285.
- Rangel-Barajas C, Coronel I, Florán B (2015) Dopamine Receptors and Neurodegeneration. *Aging Dis* 6:349-368.

- Rapoport RM, Murad F (1983) Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res* 52:352–357.
- Rascol O, Brooks DJ, Korczyn AD, De Deyn PP, Clarke CE, Lang AE (2000) A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. *N Engl J Med* 342:1484-1891.
- Rayman MP (2005) Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proc Nutr Soc* 64:527-542.
- Rayman MP, Bode P, Redman CW (2003) Low selenium status is associated with the occurrence of the pregnancy disease preeclampsia in women from the United Kingdom. *Am J Obstet Gynecol* 189:1343-1349.
- Rayman MP, Infante HG, Sargent M (2008) Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. *Br J Nutr* 100:238-253.
- Reed JR, Backes WL (2012) Formation of P450 · P450 complexes and their effect on P450 function. *Pharmacol Ther* 133:299–310.
- Reeves MA, Bellinger FP, Berry MJ (2010) The neuroprotective functions of selenoprotein M and its role in cytosolic calcium regulation. *Antioxid Redox Signal* 12:809-818.
- Richardson DR. More roles for selenoprotein P: local selenium storage and recycling protein in the brain. *Biochem J* 386: e5–7, 2005.
- Ridet JL, Bensadoun JC, Deglon N, Aebischer P, Zurn AD (2006) Lentivirus-mediated expression of glutathione peroxidase: neuroprotection in murine models of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 21:29-34.
- Rigobello MP, Callegaro MT, Barzon E, Benetti M, Bindoli A (1998) Purification of mitochondrial thioredoxin reductase and its involvement in the redox regulation of membrane permeability. *Free Radic Biol Med* 24:370-376.
- Roos RA, Jongen JC, van der Velde EA. Clinical course of patients with idiopathic Parkinson's disease. *Mov Disord* 11: 236-42, 1996.
- Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG (1973) Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179:588-590.
- Rueli RH, Parubrub AC, Dewing AS, Hashimoto AC, Bellinger MT, Weeber EJ, Uyehara-Lock JH, White LR, Berry MJ, Bellinger FP (2015) Increased selenoprotein P in choroid plexus

and cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease brain. *J Alzheimers Dis* 44:379-383.

- Rundlof AK, Arner ES (2004) Regulation of the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase 1 in relation to cellular phenotype, growth, and signaling events. *Antioxid Redox Signal* 6:41-52.

-S-

- Saijoh K, Saito N, Lee MJ, Fujii M, Kobayashi T, Sumino K (1995) Molecular cloning of cDNA encoding a bovine selenoprotein P-like protein containing 12 selenocysteines and a (His-Pro) rich domain insertion, and its regional expression. *Brain Res Mol Brain Res* 30:301-311.

- Saito Y, Hayashi T, Tanaka A, Watanabe Y, Suzuki M, Saito E, Takahashi K (1999) Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Isolation and enzymatic characterization of human selenoprotein p. *J Biol Chem* 274:2866-2871.

- Salazar J, Mena N, Hunot S, Prigent A, Alvarez-Fischer D, Arredondo M, Duyckaerts C, Sazdovitch V, Zhao L, Garrick LM, Nuñez MT, Garrick MD, Raisman-Vozari RH, Irsch EC. Divalent metal transporter 1 (DMT1) contributes to neurodegeneration in animal models of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 18578–83, 2008.

- Salim S (2016) Oxidative Stress and the Central Nervous System. *J Pharmacol Exp Ther*, Epub ahead of print, 2016

- Sarkar S, Raymick J, Imam S (2016) Neuroprotective and Therapeutic Strategies against Parkinson's Disease: Recent Perspectives. *Int J Mol Sci* 8;17 pii: E904. doi: 10.3390/ijms17060904

- Savaskan NE, Borchert A, Brauer AU, Kuhn H (2007) Role for glutathione peroxidase-4 in brain development and neuronal apoptosis: specific induction of enzyme expression in reactive astrocytes following brain injury. *Free Radic Biol Med* 43:191-201.

- Scafidi J, Hammond tR, Scafidi S, Ritter J, Jablonska B, Roncal M, Szigeti-Buck K, Coman D, Huang Y, Mc Carter RJ, Hyder F, Horvath TL, Gallo V (2014) Intranasal epidermal growth factor treatment rescues neonatal brain injury. *Nature* 506:230-234.

- Scharpf M, Schweizer U, Arzberger T, Roggendorf W, Schomburg L, Kohrle J (2007) Neuronal and ependymal expression of selenoprotein P in the human brain. *J Neural Transm* 114:877-884.

- Schiesling C, Kieper N, Seidel K, Krüger R (2008) Review: Familial Parkinson's disease--genetics, clinical phenotype and neuropathology in relation to the common sporadic form of the disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34:255–271
- Schoenmakers E, et al. (2010) Mutations in the selenocysteine insertion sequence-binding protein 2 gene lead to a multisystem selenoprotein deficiency disorder in humans. *J Clin Invest* 120:4220-4235.
- Schrag A, Ben-Shlomo Y, Brown R, Marsden CD, Quinn N. Young-onset Parkinson's disease revisited--clinical features, natural history, and mortality. *Mov Disord* 13: 885–94, 1998.
- Schwarz K, Foltz CM (1958) Factor 3 activity of selenium compounds. *J Biol Chem* 233:245-251.
- Scott R, Macpherson A, Yates RW, Hussain B, Dixon J (1998) The effect of oral selenium supplementation on human sperm motility. *Br J Urol* 82:76-80.
- Sedelis M, Hofele K, Auburger GW, Morgan S, Huston JP, Schwarting RK (2000) MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences. *Behav Genet* 30:171-182.
- Seiler A, Schneider M, Forster H, Roth S, Wirth EK, Culmsee C, Plesnila N, Kremmer E, Radmark O, Wurst W, Bornkamm GW, Schweizer U, Conrad M (2008) Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. *Cell Metab* 8:237-248.
- Seki S, Akiyama K, Watanabe S, Hatsushika M, Ikeda S, Tsutsui K (1991) cDNA and deduced amino acid sequence of a mouse DNA repair enzyme (APEX nuclease) with significant homology to Escherichia coli exonuclease III. *J Biol Chem* 266:20797-20802.
- Semchuk KM, Love EJ, Lee RG. Parkinson's disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals. *Neurology* 42: 1328–35, 1992.
- Sengupta A, Carlson BA, Labunskyy VM, Gladyshev VN, Hatfield DL (2009) Selenoprotein T deficiency alters cell adhesion and elevates selenoprotein W expression in murine fibroblast cells. *Biochem Cell Biol* 87:953-961.
- Seniuk NA, Tatton WG, Greenwood CE (1991) Dose-dependent destruction of the coeruleus-cortical and nigral-striatal projections by MPTP. *Brain Res* 527:7-20.

- Shahar A, Patel KV, Semba RD, Bandinelli S, Shahar DR (2010) Plasma selenium is positively related to performance in neurological tasks assessing coordination and motor speed. *Mov Disord* 25: 1909-1915.
- Shi H, Sui Y, Wang X, Luo Y, Ji L (2005) Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of *Carassius auratus*. *Comp Biochem Physiol Toxicol Pharmacol* CBP 140:115–121.
- Shukla V, Mishra SK, Pant HC (2011) Oxidative stress in neurodegeneration. *Adv Pharmacol Sci* 572634.
- Sies H, Jones D (2007) Oxidative Stress. In *Encyclopedia of Stress (Second Edition)*, G. Fink, ed. (New York: Academic Press), pp. 45–48.
- Sies, H (1985) 1 - Oxidative Stress: Introductory Remarks. In *Oxidative Stress*, H. SIES, ed. (London: Academic Press), pp. 1–8.
- Smith DG, Cappai R, Barnham KJ (2007) The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid beta peptide. *Biochim Biophys Acta* 1768:1976–1990.
- Soerensen J, Jakupoglu C, Beck H, Forster H, Schmidt J, Schmahl W, Schweizer U, Conrad M, Brielmeier M (2008) The role of thioredoxin reductases in brain development. *PLoS One* 3:e1813.
- Spica V, Pekmezović T, Svetel M, Kostić VS. Prevalence of non-motor symptoms in young-onset versus late-onset Parkinson's disease. *J Neurol* 260: 131–7, 2013.
- Stanley BA, Sivakumaran V, Shi S, McDonald I, Lloyd D, Watson WH, Aon MA, Paolocci N (2011) Thioredoxin reductase-2 is essential for keeping low levels of H₂O₂ emission from isolated heart mitochondria. *J Biol Chem* 286:33669–33677.
- Stefanova N, Puschban Z, Fernagut PO, Brouillet E, Tison F, Reindl M, Jellinger KA, Poewe W, Wenning GK (2003) Neuropathological and behavioral changes induced by various treatment paradigms with MPTP and 3-nitropropionic acid in mice: towards a model of striatonigral degeneration (multiple system atrophy). *Acta Neuropathol* 106:157-166.
- Steinbrenner H, Alili L, Bilgic E, Sies H, Brenneisen P (2006) Involvement of selenoprotein P in protection of human astrocytes from oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 40:1513-1523.

- Su X, Kells AP, Huang EJ, Lee HS, Hadaczek P, Beyer J, Bringas J, Pivrotto P, Penticuff J, Eberling J, Federoff HJ, Forsayeth J, Bankiewicz KS (2009) Safety evaluation of AAV2-GDNF gene transfer into the dopaminergic nigrostriatal pathway in aged and parkinsonian rhesus monkeys. *Hum Gene Ther* 20:1627-1640.

- Sun Y, Butler JA, Whanger PD. Glutathione peroxidase activity and selenoprotein W levels in different brain regions of selenium-depleted rats(1). *J Nutr Biochem*. 2001 Feb;12(2):88-94. PubMed PMID: 11182551.

-T-

- Takada Y, Mukhopadhyay A, Kundu GC, Mahabeleshwar GH, Singh S, Aggarwal BB (2003) Hydrogen peroxide activates NF-kappa B through tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I kappa B alpha kinase and Syk protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 278:24233–24241.

- Takebe G, Yarimizu J, Saito Y, Hayashi T, Nakamura H, Yodoi J, Nagasawa S, Takahashi K (2002) A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *J Biol Chem* 277:41254-41258.

- Tamura T, Yamamoto S, Takahata M, Sakaguchi H, Tanaka H, Stadtman TC, Inagaki K (2004) Selenophosphate synthetase genes from lung adenocarcinoma cells: Sps1 for recycling L-selenocysteine and Sps2 for selenite assimilation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16162-16167.

- Tanguy Y, Falluel-Morel A, Arthaud S, Boukhzar L, Manecka DL, Chagraoui A, Prevost G, Elias S, Dorval-Coiffec I, Lesage J, Vieau D, Lihrmann I, Jégou B, Anouar Y (2011) The PACAP-regulated gene selenoprotein T is highly induced in nervous, endocrine, and metabolic tissues during ontogenetic and regenerative processes. *Endocrinology* 152:4322–4335.

- Thobois S, Delamarre-Damier F, Derkinderen P (2005) Treatment of motor dysfunction in Parkinson's disease: an overview. *Clin Neurol Neurosurg* 107:269-281.

- Tirasophon W, Lee K, Callaghan B, Welihinda A, Kaufman RJ (2000) The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response. *Genes Dev* 14:2725-2736.

- Tremblay J, Gerzer R, Hamet P (1988) Cyclic GMP in cell function. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res* 22:319–383.

- Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552:335–344.

-U-

- Ungerstedt U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* 5: 107–10, 1968.

- Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D (2000) Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287:664-666.

- Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan R (2009) Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Curr Neuropharmacol* 7:65–74.

- Uversky VN, Oldfield CJ, Midic U, Xie H, Xue B, Vucetic S, Iakoucheva LM, Obradovic Z, Dunker AK. Unfoldomics of human diseases: linking protein intrinsic disorder with diseases. *BMC Genomics* 10 Suppl 1: S7, 2009
Niccoli & Partridge, 2012.

-V-

- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44–84.

- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160:1–40.

- Van der Brug MP, Blackinton J, Chandran J, Hao LY, Lal A, Mazan-Mameczarz K, Martindale J, Xie C, Ahmad R, Thomas KJ, Beilina A, Gibbs JR, Ding J, Myers AJ, Zhan M, Cai H, Bonini NM, Gorospe P, Cookson MR (2008) RNA binding activity of the recessive parkinsonism protein DJ-1 supports involvement in multiple cellular pathways. *Proc Nat Acad Sci USA* 105:10244-10249.

- Verstraeten A, Theuns J, Van BC. Progress in unraveling the genetic etiology of Parkinson disease in a genomic era. *Trends Genet* 31: 140–9, 2015.

-W-

- Walston J, Xue Q, Semba RD, Ferrucci L, Cappola AR, Ricks M, Guralnik J, Fried LP (2006) Serum antioxidants, inflammation, and total mortality in older women. *Am J Epidemiol* 163:18-26.

- Wardman P, Candeias LP (1996) Fenton chemistry: an introduction. *Radiat Res* 145:523–531.
- Weber GF, Maertens P, Meng XZ, Pippenger CE (1991) Glutathione peroxidase deficiency and childhood seizures. *Lancet* 337:1443-1444.
- Wei WQ, Abnet CC, Qiao YL, Dawsey SM, Dong ZW, Sun XD, Fan JH, Gunter EW, Taylor PR, Mark SD (2004) Prospective study of serum selenium concentrations and esophageal and gastric cardia cancer, heart disease, stroke, and total death. *Am J Clin Nutr* 79:80-85.
- Whanger PD (2009) Selenoprotein expression and function-selenoprotein W. *Biochim Biophys Acta* 1790: 1448–1452.
- Wickremaratchi MM, Ben-Shlomo Y, Morris HR. The effect of onset age on the clinical features of Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 16: 450–6, 2009.
- Wilson SA. A Lecture on acute cerebral lesions at different ages. *Br Med J.* 1: 487–91, 1929.
- Wirth EK, Conrad M, Winterer J, Wozny C, Carlson BA, Roth S, Schmitz D, Bornkamm GW, Coppola V, Tessarollo L, Schomburg L, Köhrle J, Hatfield DL, and Schweizer U (2010) Neuronal selenoprotein expression is required for interneuron development and prevents seizures and neurodegeneration. *FASEB J* 24:844–852.

-X-

- Xiang W, Schlachetzki JCM, Helling S, Bussmann JC, Berlinghof M, Schäffer TE, Marcus K, Winkler J, Klucken J, Becker CM (2013) Oxidative stress-induced posttranslational modifications of alpha-synuclein: specific modification of alpha-synuclein by 4-hydroxy-2-nonenal increases dopaminergic toxicity. *Mol Cell Neurosci* 54:71–83.
- Xu Y, Bradham C, Brenner DA, Czaja MJ (1997) Hydrogen peroxide-induced liver cell necrosis is dependent on AP-1 activation. *Am J Physiol* 273:G795–G803.

-Y-

- Yahr MD, Duvoisin RC, Shear MJ, Barrett RE, Hoehn MM (1969) Treatment of parkinsonism with levodopa. *Arch Neurol* 21:343-354.
- Yamamoto T, Sakaguchi N, Hachiya M, Nakayama F, Yamakawa M, Akashi M (2009) Role of catalase in monocytic differentiation of U937 cells by TPA: hydrogen peroxide as a second messenger. *Leukemia* 23:761–769.
- Ye Y, Shibata Y, Yun C, Ron D, Rapoport TA (2004) A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* 429:841-847.

- Yin F, Tian ZM, Liu SH, Zhao QJ, Wang RM, Shen L, Wieman J, Yan Y (2012) Transplantation of human retinal pigment epithelium cells in the treatment for Parkinson Disease. *CNS Neurosci Ther* 18:1012-1020.
- Yorek MA (2003) The role of oxidative stress in diabetic vascular and neural disease. *Free Radic Res* 37:471–480.
- Yoshinaga N, Murayama T, Nomura Y (2000) Apoptosis induction by a dopaminergic neurotoxin, 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP(+)), and inhibition by epidermal growth factor in GH3 cells. *Biochem Pharmacol* 60:111-120.
- Young IS, Woodside JV (2001) Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 54:176– 186.
- Yu MW, Horng IS, Hsu KH, Chiang YC, Liaw YF, Chen CJ (1999) Plasma selenium levels and risk of hepatocellular carcinoma among men with chronic hepatitis virus infection. *Am J Epidemiol* 150:367-374.
- Yu SY, Zhu YJ, Li WG (1997) Protective role of selenium against hepatitis B virus and primary liver cancer in Qidong. *Biol Trace Elem Res* 56:117-124.

-Z-

- Zecca L, Youdim MBH, Riederer P, Connor JR, Crichton RR (2004) Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 5:863–873.
- Zeegers MP, Goldbohm RA, Bode P, van den Brandt PA (2002) Prediagnostic toenail selenium and risk of bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:1292-1297.
- Zeevalk GD, Razmpour R, Bernard LP (2008) Glutathione and Parkinson’s disease: Is this the elephant in the room? *Biomed Pharmacother* 62:236–249.
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ (2002) Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 33:337–349.
- Zhang J, Zhang Z, Shan A, Xu S (2014) Effects of dietary selenium deficiency or excess on gene expression of selenoprotein N in chicken muscle tissues. *Biol Trace Elem Res* 157:234–241.
- Zhang X, Ye JL, Zhu H, Sun SN, Zheng J, Fan HH, Wu HM, Chen SF, Cheng WH, Zhu JH (2016) Selenotranscriptomic analyses identify signature selenoproteins in brain regions in a mouse model of Parkinson’s disease. *PloSOne* 11:e0163372.

- Zhuo H, Smith AH, Steinmaus C (2004) Selenium and lung cancer: a quantitative analysis of heterogeneity in the current epidemiological literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:771-778.
- Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D (1998) CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 12:982-995.

ANNEXES