UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ

N° attribué par la bibliothèque

Année 2014

N°25

Effets de la roténone sur le système nerveux entérique

THÈSE DE DOCTORAT
Discipline : Biologie
Spécialité : Neurosciences

Présentée
et soutenue publiquement par

Maddalena Tasselli Chevalier

Le 24 janvier 2014, devant le jury ci-dessous

Président

Rapporteurs
Pr Jean.Luc HOUETO, CHU de Poitiers

Pr Bruno BONAZ, CHU de Grenoble

Directeurs de thèse
Pr Pascal DERKINDEREN, Inserm UMR 913 ; CHU de Nantes

Dr Michel NEUNLIST, Inserm UMR 913 ; CHU de Nantes

REMERCIEMENTS

Je remercie les Professeurs Houeto et Bonaz pour avoir accepté de juger ce travail de thèse sans hésitation.

A Michel et Pascal : quand je suis arrivée à Nantes, il y a bientôt 5 ans, je laissais derrière moi une petite unité, une petite expérience dans la science et j'ai lutté de toutes mes forces pour pouvoir vous montrez que je méritais ma place ici, que c'était un honneur pour moi d'y être, et que je ne voulais pas rester une ombre parmi les autres. Probablement que je ne vous laisserais pas une marque, mais tout ce que j'ai fait, je l'ai fait parce que je l'ai vraiment cru et je l'ai fait avec tout mon engagement.
Je vous remercie bien sûr, d'avoir cru en moi pendant tout ce temps et pour m'avoir appris à regarder d'un œil positif le travail accompli.
Merci aussi de ne pas avoir pas jugé mes choix de vie personnelle.

Merci à Jean-Luc, le fantôme du labo!

Je tiens à remercie Bernardò, qui a toujours été de la part des étudiants au labo. Merci pour m'avoir écouté depuis le début et dans mes moments de doutes où j'ai vacillé. Vous avez été un peu comme un « papi », réconfortant et toujours présent dans la science comme dans la vie. Vous allez me manquer.

Tanguy, mon maître, tu m'as accueilli dans ton super projet, dans lequel on a investi toutes nos forces… tout ou presque de ce que je sais faire au labo, je le dois à toi. Merci pour m'avoir soutenu quand j'étais triste ou malade. Je ne l'oublierai pas. Merci pour faire encore partie de ma vie!

Sebasthian, notre vie d'ami ensemble est encore longue. J'ai l'espoir de pouvoir un jour travailler encore à coté de toi, mais pas avec, parce que je ne comprends toujours pas quand tu parles!!! Je n'ai pas besoin de rajouter des mots, tu connais déjà tout. JTM.

Mandy, ma femme, quand tu es partie du labo, j'ai su que c'était le moment aussi pour moi de commencer à faire mes valises. Tu me manques tous les jours, on a partagé 3 ans de vie, 3 ans de gastro, 3 ans de larmes et de rigolades. Tu es une amie pour moi.

Gigino, amica mia! Tu sei stata quella piccola cosa in più che ha totalmente cambiato il mio quotidiano. Con te la mia vita, i miei sabati pomeriggio e le mie serate non sono state più come prima. Ho ritrovato il gusto dell'Italia in tutti i sensi e quel calore che qui, mi è mancato cosi tanto. Infine, grazie per il tuo supporto negli ultimi mesi, che ahimé, sai quanto possano essere difficili. Spero davvero che ci aspetti un futuro come lo desideriamo. E forza al « nostro » Pasquà, 99/100 ! Sei davvero una bellissima persona, ho il dispiacere che non hai potuto vivere qui al fianco della tua amata, perche sennò ci saremmo spaccati tutti insieme!!!

Une petite pensée à mes amis de japonais pour avoir partagé avec moi joie et douleur entre un repas asiatique et un déguisement improvisé! ありがとお

Merci à Marilene qui n'est pas arrivée par hazard dans ma vie ! J'ai hâte de reprendre nos dimanches matin, devant les gâteaux de ton mari (merci à lui aussi).

Je remercie tous les « vieux », les personnes qui sont déjà parties du labo et qui ont emprunté leur chemin depuis quelques temps : Maxime, Charlotte, Justine, Camille. Vous avez fait

partie de ma thèse pour une période plus or moins importante et quand vous êtes partis, la vie au labo n'a plus jamais été la même.
Merci à tous les « nouveaux » pour avoir changé l'air, pour avoir donné un coup d'énergie et de vitalité à mes idées, merci pour votre aide.

Comment oublier les thésards et les ingénieurs? Merci à vous pour avoir partagé le bien et le mal, votre bonne humeur plus ou moins présente et les kg de chocolat et des gâteaux. Merci à Philippe pour avoir partagé la « mise en place de mes manips », avec lequel je partage la même pensée sur la science, merci à tes blagues qui m'ont remonté le moral durant ces 3 longues années! Cela a été vraiment bien de travailler avec toi! Merci à Sab, avec toi j'ai toujours fait des discours plus or moins sérieux, merci, surtout en cette dernière période on partage les mêmes idées, merci à Thom pour le discours du… sur… bah, merci en fait d'être là !!! Merci à Laëtitia pour ta gentillesse et Tiphaine qui vient de prendre juste-juste ma place mais avec laquelle je pourrais déjà partager plein des choses, dommage ne pas pouvoir eu beaucoup plus de temps! Merci à Emilie qui m'a appris qu'on peut devenir chirurgien en 3 heures. Merci à Julie pour tous les moments au labo et en dehors du labo, pour le partage sur la vie et sur le travail. Rappelles-toi tout ce que je t'ai dit !!! Merci pour la bonne humeur de Tony (j'ai bcp changé d'avis sur toi) et l'innocence de Pierre-Etienne !!!
Grazie a te Nicolé, per aver allietato il mio quotidiano e per aver condiviso ogni nostra forma di malattia! Sono contenta che tu abbia proseguito il tuo percorso qui a Nantes e che tu abbia seguito le ragioni del tuo cuore. Siamo partite dallo stesso punto e siamo arrivate alla stessa destinazione, senza mai essere né francesi né italiane. Quel che ci riserverà la vita resta ancora troppo vago per noi e chi lo sa, forse hai davvero ragione tu: meglio restare se stessi. Ti auguro un grande coraggio per gli ultimi anni che mancano per finire e quando nessuno sembrerà capirti pensa che io ti avrei capito con uno sguardo!

Si dice che non bisogna più guardare al passato ma solo concentrarsi sul presente e sul futuro, ma se mi « dimenticassi » di citarvi, sarebbe un pò come se mi tradissi. Amici miei che non vedo mai, Daria, Davide, Elena, Gabry, Laura, Peppe –rigorosamente in ordine alfabetico- fate sempre parte dei miei pensieri. Gli anni spensierati passati assieme mi mancano. Forse ora se tornassi indietro li passerei ancora più intensamente sapendo quanto il mondo del dopo sia duro.
E se ci riunissimo ancora e sempre? Vi voglio bene, grazie per avermi resa quella che sono.

Alla mia piccolina, Margherita e a mia cugina July, mando un pensiero speciale. Siete parte della mia famiglia, più dei legami di sangue.

Grazie alle mie zie e alla mia nonna. Grazie ai miei genitori. Grazie a voi tutti per avermi sostenuto in questi anni soprattutto da un punto di vista economico. Papà le uscite con te la domenica mi mancano tantissimo.

Marco, sei sempre stato presente nei miei pensieri in tutti questi anni. Probabilmente la tua presenza mi accompagnerà fino alla fine. Anche se fisicamente non hai più fatto parte di questo percorso, sono sicura che siamo destinati a restare legati in un modo diverso.
Allora, grazie anche a te per essere ritornato.

A mes deux merveilleux hommes.
Je vous aime plus que tout.

Sempre e comunque, a **me stessa**.

What if, there was only one choice… and all the other ones were wrong?

And there were signs along the way to pay attention to…

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS 9

INTRODUCTION 12

1. LA ROTENONE 13
1.1 Historique 13
1.2 Chimie et action 15
1.2.1 Mécanismes d'action de la roténone 16
1.3 Liens épidémiologiques : roténone, pesticides et MP 20
1.3.1 Etudes cas-témoins 21
1.3.2 Etudes prospectives 22
1.4 Roténone et modèles animaux de MP 22
1.4.1 La roténone chez le rat 22
1.4.2 La roténone chez la souris 26
1.5 Autres toxiques environnementaux et modèles animaux de la MP 27
1.5.1 MPTP 28
1.5.2 Paraquat 31
1.6 Atteintes digestive dans les modèles animaux toxiques de MP 33
1.6.1 MPTP 33
1.6.2 Roténone 34
2. LE SYSTEME NERVEUX ENTERIQUE 37
2.1 Morphologie générale du SNE 37
2.2 Neuromédiateurs du SNE 39
2.3 Activité motrice intrinsèque du SNE : le réflexe péristaltique 42
2.4 Le SNE est connecté au SNC 43
2.5 SNE et barrière épitheliale intestinale 45
2.5.1 Composants de la BEI 45
2.5.2 Fonctions de la BEI 45
2.5.3 Implications du SNE dans la régulation de la perméabilité de la BEI 48
2.6 Atteinte du SNE et de la BEI dans la MP 49
2.7 Conséquences de l'atteinte du SNE dans la MP 50

OBJECTIFS DE LA THESE 52

1. EFFETS DE LA ROTENONE DANS UN MODELE DE CULTURE DE SNE 54

1.1 Matériels et méthodes 54

1.1.1 Culture primaire de SNE d'embryon de rat 54

1.1.2 Immunohistochimie 55

1.1.3 Western blot 55

1.2 Résultats 56

1.2.1 Effets de la roténone sur l'expression de l'alpha-synucléine dans les neurones de culture primaire de SNE 56

2. EFFETS DE LA ROTENONE SUR LE SNE DANS UN MODELE ANIMAL 58

2.1 Effects of oral administration of rotenone on gastrointestinal functions in mice

DISCUSSION 59

PARTICIPATION A DES TRAVAUX TIERS 62

BIBLIOGRAPHIE 63

AVANT-PROPOS

La Maladie de Parkinson (MP) est la deuxième pathologie en terme de fréquence, après la maladie d'Alzheimer (1). Sa prévalence en Europe a été estimée à 1,8% de la population âgée de plus de 65 ans. Le lien avec l'âge est évident puisque la prévalence passe de 0,6% entre 65 et 69 ans à 2,6% entre 85 et 89 ans (2,3). Le diagnostic et le traitement de la MP représentent donc un enjeu de santé publique.

La MP a longtemps été considérée comme une pathologie neurodégénérative relativement spécifique des neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* (SNpc). Cette perte neuronale associée à la présence d'inclusions intracellulaires, appelées corps de Lewy, dans les neurones survivants est la caractéristique anatomopathologique de la maladie. Le déficit en dopamine engendré est à l'origine des signes moteurs cardinaux de la maladie que sont la bradykinésie, l'hypertonie, l'instabilité posturale et le tremblement de repos (4,5).

Il est désormais établi que la MP ne se limite pas à la SNpc ni à ses signes moteurs. Les progrès réalisés en neuropathologie ces 15 dernières années ont permis d'affiner et de mieux préciser l'étendue de l'atteinte extra-nigrale dans la MP. Depuis que Spillantini et collaborateurs (6) ont montré qu'une protéine neuronale, l'alpha-synucléine, était le principal composant des corps de Lewy, l'utilisation d'anticorps dirigés contre cette protéine ou sa forme phosphorylée est devenue la technique de référence pour identifier la pathologie de Lewy en immunohistochimie. L'utilisation de cette technique a permis de montrer que certaines régions du système nerveux central (SNC) étaient touchées aussi sévèrement et aussi précocement que la SNpc. C'est le cas du bulbe olfactif et d'une petite structure du bulbe rachidien, le noyau dorsal moteur du vague qui sont touchés quasi-constamment et précocement par la pathologie de Lewy.

Plusieurs études autopsiques récentes ont montré que la pathologie de Lewy s'étendait au delà du SNC et touchait les systèmes nerveux autonomes périphériques. Parmi ces réseaux neuronaux périphériques, le système nerveux entérique (SNE) a reçu une attention toute particulière et ce pour plusieurs raisons : (i) il a une organisation anatomique et fonctionnelle qui est proche du système nerveux central ce qui lui a valu d'être parfois surnommé le second cerveau (7) (ii) il est touché par le processus pathologique chez la quasi-totalité des patients parkinsoniens (8) (iii) Heiko Braak a suggéré qu'il était une des premières structures atteinte par le processus pathologique, bien avant la SNpc (9) (iiii) enfin, son atteinte serait responsable des troubles digestifs, tels que gastroparésie et constipation, qui sont non seulement fréquents mais particulièrement invalidants au cours de la maladie (10).

Le fait que le bulbe olfactif et le SNE, deux réseaux neuronaux situés à proximité du « monde extérieur », soient touchés précocement et quasi constamment par la pathologie de Lewy a aussi relancé le débat sur l'étiopathogénie et le développement de la maladie. Comme pour la plupart des maladies ou grands syndromes dont l'étiopathogénie est précise est inconnue, il est proposé que la MP résulterait d'une conjonction de facteurs génétiques et environnementaux. L'hypothèse toxique a longtemps tenu la corde, suite à la mise en évidence de syndromes parkinsoniens chez des toxicomanes de la côte ouest des Etats Unis à la fin des années 70 et au début des années 80. Ces syndromes parkinsoniens résultaient d'une contamination accidentelle par un inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire, le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP), qui était produit lors de la synthèse artisanale d'un analogue de la mépéridine (11). Toutefois, la découverte de mutations à l'origine de formes monogéniques de MP depuis la fin des années 90 a permis un retour en force de l'hypothèse génétique dans le développement de la maladie. Elles ont été toutefois contrebalancées par les études récentes qui ont montré la précocité et la fréquence de l'atteinte olfactive et entérique, qui suggèrent qu'un toxique environnemental inhalé et/ou ingéré serait impliqué dans le développement de la MP (12).

Parmi ces toxiques environnementaux, la roténone a fait l'objet d'une attention toute particulière. La **roténone** est une molécule organique naturellement produite par certaines plantes tropicales, qui rentre dans la composition de nombreux pesticides et insecticides et dont l'injection systémique chez le rongeur provoque une pathologie neurodégénérative proche de la MP tant d'un point de vue pathologique que d'un point de vue clinique. Toutefois, si ce pesticide largement utilisé est impliqué dans le développement de la MP, il l'est très probablement par inhalation et/ou ingestion et non pas par passage et diffusion intraveineuse immédiate. Peu de travaux se sont intéressés aux effets de la roténone sur le système olfactif ou sur le SNE. Au cours de ce travail de thèse, je me suis donc intéressée aux effets de la roténone sur le SNE, à la fois *in vitro*, en utilisant un modèle de culture primaire de rat mis en place dans notre laboratoire et *in vivo* en utilisant un modèle animal d'intoxication orale à la roténone.

INTRODUCTION

1. LA ROTENONE

1.1 Historique

La roténone est un dérivé flavonoïde isolé pour la première fois par un botaniste, Emmanuel Geoffroy, en 1895 à partir du *Lonchocarpus nicou,* une papilionacée d'Amérique, qu'il nomma « nicouline ». Le nom actuel, « roténone » est le résultat du travail du chimiste Nagai Nagayoshi qui a isolé cette molécule au Japon en 1902. Le nom « roténone » vient donc du « ろてん», Roten, le nom japonais de la plante *Derris elliptica* Benth complété du suffixe à consonance chimique « one » (13).

La roténone est isolée dans plusieurs espèces végétales qui poussent sur des sols pauvres, généralement acides et en présence d'une atmosphère humide (75% d'humidité minimum):

- *Derris elliptica* Benth, Fabaceae, aujourd'hui *Paraderris elliptica Adema*, appelée Roten au Japon (Figure 1);
- *Lonchocarpus nicou* D.C., Acesinae;
- *Tephrosia vogelii* Hook.f., nommée Bois Poison en Afrique.

Figure 1: Image de la *Derris elliptica* Benth

Plante africaine de laquelle on extrait la roténone

Son principe actif se retrouve dans les racines séchées et moulues de 68 plantes tropicales. Les premiers témoignages d'utilisation de la roténone remontent à plus de 2000 ans. En Malaisie, en Afrique équatoriale et en Amazonie, ses propriétés ichtyotoxiques étaient, et le sont encore, utilisées lors de la pêche traditionnelle à la nivrée. La nivrée consiste à empoisonner toute l'eau d'une section de rivière, à courant lent, en y battant une liane pour en libérer la roténone. La nivrée ne se pratique qu'en saison sèche quand il y a moins d'eau et dans une zone où le courant est lent. Ainsi, le poison se dilue moins et a le temps d'agir permettant la récolte des poissons asphyxiés.

C'est seulement un peu plus tard, à partir des années 1920, que l'on en a fait une poudre insecticide produite à raison de milliers de tonnes par an au Brésil, Pérou, Afrique équatoriale française, Cambodge et en Indonésie néerlandaise.

Les importateurs les plus importants étaient néerlandais et belges avec les Etats-Unis et la France (14).

A partir des années 1945, le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) ou le hexachlorocyclohexane (HCH) puis d'autres molécules insecticides ont remplacé la roténone. Elle est par la suite à nouveau appréciée, grâce aux nouvelles méthodes d'extraction qui permettent la production d'une émulsion complètement soluble dans l'eau. Elle est utilisé comme insecticide et herbicide (15).

1.2 Chimie et mécanismes d'action

Nom IUPAC	1,2,12,12a-tetrahydro-8,9-dimethoxy-2-(1-methylethenyl-(1) benzopyrano (2,4-b) furo (2,3-h) (1)-benzopyran-6 (6H)-one.
Composition	Carbone 70,4 % Hydrogène 5,62 % Oxygène 24,34 %
Formule Brute	$C_{23}H_{22}O_6$
T° Fusion	165-166 °C
T° Ebollition	210-220 °C
Précautions	Toxique et dangereux pour l'environnement
Solubilité	Acétone, trichloréthylène, chloroforme

Tableau 1: Caractéristiques de la roténone

La roténone est un membre de la famille des roténoïdes (Tableau 1 et Figure 2). Sa structure chimique a été établie en 1933 par E.B. La Forge (16). C'est un produit instable qui s'oxyde rapidement en se transformant en déhydroroténone lorsqu'il est exposé à l'air ou à la lumière (17). Ce produit aromatique est absorbé par les voies respiratoires et les voies digestives. Du fait de ses propriétés lipophiliques, il diffuse de façon passive dans l'ensemble de l'organisme (18).

Sa demi-vie dans l'environnement est comprise entre un et trois jours. Elle est principalement destinée à des utilisations phytosanitaires comme insecticide des plantes d'appartement et parfois des jardins potagers, et pour la destruction des ectoparasites d'animaux domestiques.

Sur le plan de la réglementation des produits phytopharmaceutiques dans l'Union européenne, cette substance est interdite à la suite de l'examen relatif à l'inscription à l'annexe I de la directive 91/414/CEE. La décision de la Commission européenne numéro 2008/317/CE du 10 avril 2008 demande à tous les états membres de retirer les autorisations des produits contenant de la roténone à partir de 2008. La France a bénéficié d'un délai supplémentaire jusqu'en 2011, pour des usages spécifiques, en réservant l'emploi de la roténone aux utilisateurs professionnels munis d'un équipement de protection approprié.

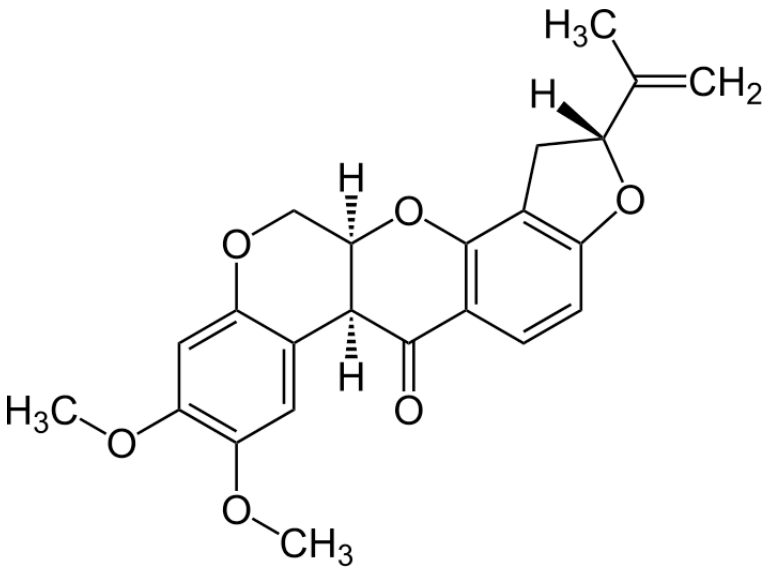


Figure 2: Structure chimique de la roténone

La roténone est un produit aromatique qui s'oxyde en déhydroroténone. Sa formule chimique est $C_{23}H_{22}O_6$.

1.2.1 Mécanismes d'action de la roténone

Depuis plusieurs années, un nombre grandissant d'études tend à démontrer l'importance du dysfonctionnement de la mitochondrie dans développement de certaines maladies neurodégénératives, et notamment dans la maladie de Parkinson (19). La roténone est une molécule largement connue pour être un inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (20). Le complexe I est directement impliqué dans la production de l'énergie cellulaire. Son inhibition provoque une diminution de la production d'ATP par la mitochondrie, mais contribue également à la mise en place d'un ensemble d'effets plus ou moins toxiques pour la cellule. Dans ce chapitre, nous nous proposons de faire un bref rappel sur les mécanismes d'action de la roténone et des principales conséquences que peut avoir la roténone sur la physiologie de la cellule.

Complexe I et neurodégénerescence

Le complexe I ou NADH-ubiquinone oxydoréductase est le premier complexe enzymatique de la chaîne de transport des électrons. Ce complexe est localisé dans la membrane interne de la mitochondrie. Il permet la communication entre l'espace intermembranaire et matriciel de

la mitochondrie. Composé de 43 protéines, le complexe I est le plus grand des trois complexes que compte la chaine respiratoire (21).

Le complexe I oxyde le NADH en $NAD^+ + H^+$ et transfère les électrons à l'ubiquinone (Figure 3). Il transfère ensuite les protons depuis la matrice mitochondriale jusqu'à l'espace intra-membranaire, permettant ainsi de maintenir un gradient électrochimique optimal pour la production d'ATP. Ce flux d'électrons est extrêmement important puisqu'il contribue à la perméabilité mitochondriale, au travers d'un pore Ca^{2+}-dépendant qui gère le passage des protéines d'une taille d'environ 1,5 kDa (22).

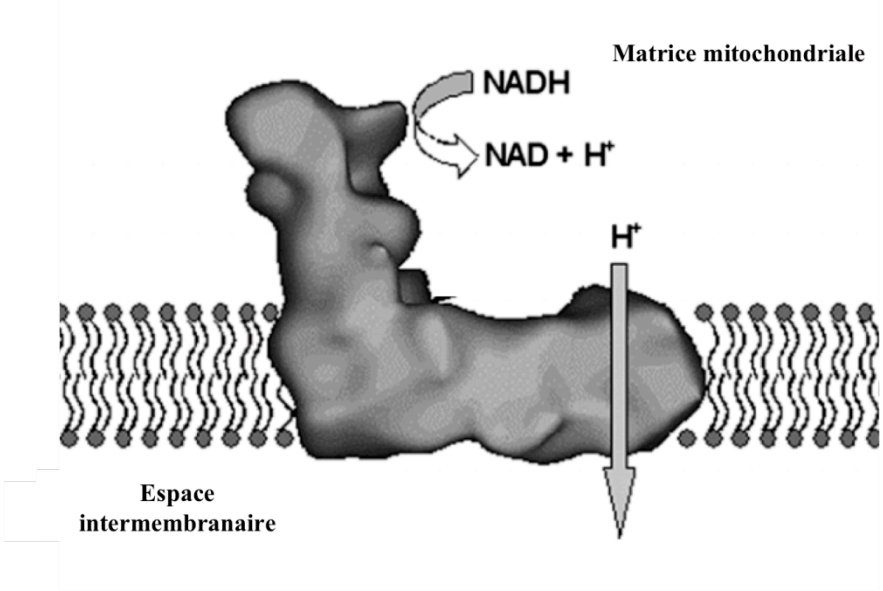


Figure 3: Dessin représentatif du complexe I de la mitochondrie

Structure du complexe I de la chaine respiratoire responsable de l'oxydation du NADH en NAD^+ et H^+ nécessaire à la mise en place du gradient de protons.

D'après Vladimir 2004

Roténone et toxicité

La roténone est un puissant inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire, capable de bloquer en quelques minutes le fonctionnement de la mitochondrie (23,24). La toxicité de la roténone provient notamment de sa capacité à générer du stress oxydatif et plus particulièrement des espèces réactives à l'oxygène *(Reactive Oxygen Species*, ROS) tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou encore les ions superoxyde (O_2^-) (25). Plusieurs mécanismes pourraient expliquer les effets délétères de la roténone (figure 4).

(I) La roténone pourrait se lier à un site spécifique du complexe I qu'il bloquerait directement (26,27). Cette hypothèse a été confirmée grâce à plusieurs études : une exposition

de cellules de neuroblastome humain (lignée SHSY-5Y) à la roténone provoque une mort cellulaire importante (28). Cet effet est bloqué après transfection d'un analogue du complexe I.

(II) La roténone est également capable d'initier un processus d'apoptose (29,30). L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée qui se différencie de la nécrose car il implique une compartimentation du contenu cellulaire en vésicules évitant la contamination des cellules environnantes. Ces processus mettent en jeu l'activation des cystéines protéases, caspases, et l'activation des facteurs mitochondriaux ayant le but de condenser et fragmenter le DNA (31). Il existe deux voies majeures d'induction de l'apoptose par l'activation de la caspase 8 (voie extrinsèque) ou de la caspase 9 (voie intrinsèque). Les deux voies contribuent l'une et l'autre au recrutement de la caspase 3 (effecteur commun) qui active irrémédiablement le processus d'apoptose (32). La roténone serait capable d'activer l'apoptose en activant ces deux voies (33-36).

(III) La sensibilité plus importante des neurones dopaminergiques au stress oxydant peut en partie s'expliquer par leur haute teneur en dopamine. En effet, la dopamine est une molécule facilement oxydable conduisant à la formation de dopaquinones, dérivés métaboliques avec un fort potentiel oxydatif conduisant également à la production de ROS (37). Il a été montré qu'en présence de roténone, le stress oxydant augmente dans des cultures primaires de neurones dopaminergiques (38). De façon remarquable, les neurones dopaminergiques peuvent être protégés contre la toxicité du pesticide en ajoutant de l'alpha-méthyl-p-tyrosine, un composant qui inhibe la production de dopamine (39). Ces données nous indiquent que la roténone peut induire à elle seule une toxicité mais que la présence de dopamine produit un effet synergique rendant les neurones dopaminergiques plus vulnérables.

(IV) La roténone a été identifiée comme déstabilisateur des microtubules (40-42). Un déréglage de l'activité des microtubules conduirait à un dysfonctionnement dans le transport vésiculaire de la dopamine qui aurait pour conséquence son accumulation et la production d'un stress cellulaire (43).

(V) Une des caractéristiques majeures de la MP est la présence dans les neurones survivants d'agrégats protéiques nommés corps de Lewy (44) dont la principale composante est l'alpha-synucléine (6). Ces agrégats ont été retrouvé dans plusieurs modèles animaux toxiques et notamment ceux induits par la roténone (45,46). L'alpha-synucléine est une protéine à la fois présynaptique et nucléaire faisant partie de la famille des synucléines (47,48). C'est une protéine soluble, résistante à la température (49) et qui a la particularité de ne pas avoir de conformation définie à l'état natif. Cette caractéristique signifie qu'une fois

traduite, la protéine adopte une structure aléatoire et difficilement prédictible qui lui permet d'avoir plusieurs états conformationnels quand elle est sous forme de monomères (50). Cet équilibre est largement modifié si les conditions environnementales varient. L'alpha-synucléine possède la capacité intrinsèque à se dimériser ou à s'oligomériser de façon passive et réversible (figure 5). Les petits oligomères restent solubles, alors que les oligomères de plus grand ordre deviennent insolubles et sont le point de départ de la formation des fibrilles. En conditions normales, ces différents états coexistent et forment un équilibre dans la cellule (51,52). Les formes multimériques de l'alpha-synucléine (oligomères, protofibrilles, fibrilles) semblent être des médiateurs majeurs de sa pathogénicité : ils perturberaient le fonctionnement de la membrane plasmique entraînant une mort de la cellule.

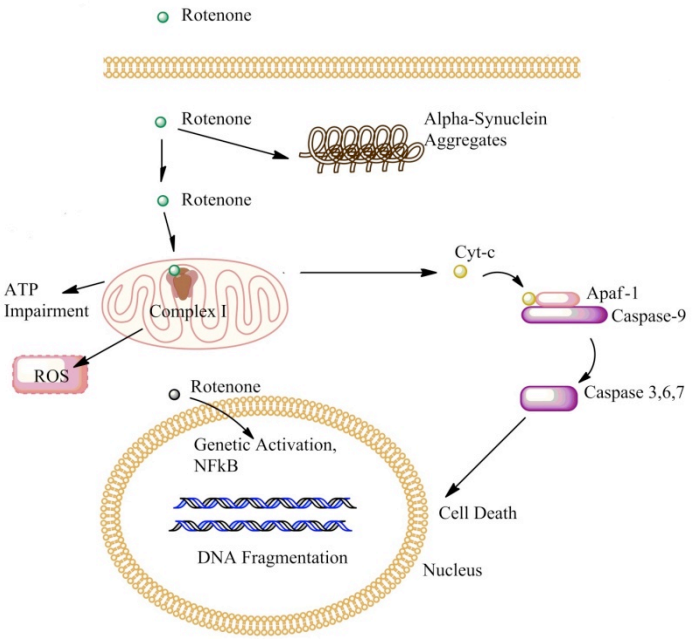


Figure 4: Mécanisme d'action de la roténone

La roténone est une molécule hydrophobe capable de passer la membrane cellulaire des neurones et des astrocytes. Son principal mécanisme d'action consiste en une inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale conduisant à la formation de radicaux libres et à l'activation des voies de l'apoptose. Elle peut aussi faciliter l'agrégation de l'alpha-synucléine, le principal composant des corps de Lewy.

D'apres Ricardo Cabezas

« Neurodegenerative disease chapitre 20 »

De façon remarquable, il a été montré que la roténone pouvait également modifier la conformation de l'alpha-synucléine, en accélérant son processus de fibrillisation (51-57).

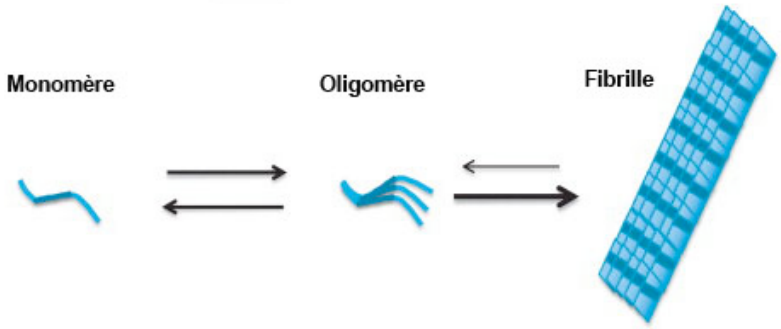


Figure 5: Equilibre entre les différents états conformationnels de l'alpha-synucléine.
Les différentes formes d'alpha-synucléine sont présentes en conditions physiologiques : monomère, oligomère (soluble), fibrille (insoluble) et coexistent en équilibre.

D'après Hansen et al ; TRENDS in Molecular Medicine 2011

1.3 Liens épidémiologiques: roténone, pesticides et MP

Un pesticide est une substance répandue sur une culture pour lutter contre des organismes considérés comme nuisibles. C'est un terme générique qui rassemble les insecticides, les fongicides et les herbicides.

Depuis les années 1980, les enquêtes épidémiologiques ont évoqué l'implication des pesticides dans plusieurs pathologies chez des personnes exposées professionnellement à ces substances, comme des pathologies cancéreuses, des maladies neurologiques, des troubles de la reproduction. Ces enquêtes ont également attiré l'attention sur les effets éventuels d'une exposition même à faible intensité lors de périodes sensibles du développement (*in utero* et pendant l'enfance) ainsi que la survenue des syndromes parkinsoniens chez des chimistes et des héroïnomanes, secondaires à l'exposition au 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) neurotoxique qui inhibe le complexe I mitochondrial et possède une structure proche de celle de l'herbicide paraquat (11).

Des études écologiques ont montré une relation entre le métier d'agriculteur, l'exposition professionnelle aux pesticides ou la consommation d'eau de puits et la fréquence de la MP (58). Dans plusieurs cas, la MP a été attribué à différents pesticides (59-66). Une revue exhaustive de la littérature a analysé et regroupé toutes les études qui ont été effectuées

jusqu'à ce jour pour évaluer les risques de développer la MP après une exposition aux pesticides (67).

1.3.1 Etudes cas-témoins

Pesticides

Dans la majorité des études épidémiologiques réalisées sur les pesticides et la MP, l'exposition aux pesticides a été évaluée de manière rétrospective et le plus souvent en étudiant l'ensemble des pesticides et non un produit en particulier. Sur les 38 études cas-témoins publiées, 19 ont montré un risque plus élevé de MP chez les sujets exposés aux pesticides avec un *odd ratio* (OR) allant de 1.3 à 3.7 (68-86). Les 19 autres études disponibles ne montraient pas d'association (87-106). Bien que la plupart des travaux disponibles aient utilisé une approche dichotomique de l'exposition aux pesticides (exposé/non exposé), certaines études ont évalué la durée d'exposition, la fréquence et la dose cumulée. Une étude cas-témoins réalisée auprès des affiliés de la mutuelle sociale agricole dans laquelle l'exposition aux pesticides a été évaluée en utilisant une procédure en deux étapes (entretiens avec des médecins du travail et expertise au cas par cas) retrouve un risque de MP 1,7 fois plus élevé parmi les participants ayant été exposés professionnellement, avec une augmentation du risque plus importante en fonction du nombre d'années ou du nombre d'heures d'exposition (OR = 2,0 [1,0-3,5] pour les participants exposés plus de 38 ans) (59,107). Une étude cas-témoins récente réalisée dans le cadre de l'*Agricultural Health Study* a analysé l'exposition aux pesticides en regroupant les pesticides suivant des mécanismes toxicologiques impliqués dans la MP (108). Un risque deux fois plus élevé de MP est observé chez les personnes ayant utilisé un pesticide induisant un stress oxydant, et un risque 1,7 fois plus élevé chez celles ayant utilisé un pesticide inhibant le complexe I mitochondrial, dont la roténone.

Herbicides et insecticides

Dix huit études cas-témoins ont analysé plus précisément le lien entre herbicides et MP. Dix études ont montré un risque plus élevé de MP chez les sujets exposés aux herbicides en général et dans certains cas plus spécifiquement au paraquat et à l'acide 2,4-Dichlorophenoxyacetic, avec un OR allant de 1.6 à 5.8 (69,72,75,84,86,107,109,110). Les 8 autres études n'ont pas montré d'association (74,81,83,87,104,105,111,112).

Pour les insecticides, 17 études cas-témoins ont été publiées. Dix sont positives, dont une avec un OR allant de 1.2 à 5.8 (69,70,72,84,95,107,109,110,113), les 8 autres études étant

négatives (74,81,83,86,104,105,111,112).

1.3.2 Etudes prospectives

Cinq études de cohorte ont analysé la relation entre la MP et l'exposition aux pesticides.
(I) Une étude sur 30 ans chez près de 8 000 hommes à Hawaï, retrouve une incidence plus élevée de la MP chez ceux qui ont travaillé dans les plantations pendant plus de 3 ans sans mettre en évidence une relation directe entre l'utilisation du pesticide et le risque de développer la MP (114). (II) En France, l'exposition professionnelle aux pesticides a donné un risque 5,63 fois plus élevé de développer une MP chez les hommes (115), tandis qu'aucune association n'était retrouvée chez les femmes. Cette différence pourrait être expliquée par une faible fréquence de l'utilisation professionnelle de pesticides et/ou une exposition de nature différente chez les femmes. (III) Dans une étude de cohorte américaine ayant inclue plus de 140 000 personnes, une association entre la MP et l'exposition (professionnelle ou non) aux pesticides a été trouvée avec un risque de 1,7 fois plus élevé pour les personnes exposées (116). (IV) Une étude évaluant la présence des pesticides organochlorés dans les sérums des patients récupérés entre les années 1968-1972, a montré une association entre le risque de développer la maladie et la présence de la dieldrine, un insecticide organochloré (117). (V) Un suivi de 5 ans a été mis en place sur des professionnels qui ont demandé une licence pour travailler avec des pesticides restreints. Cette étude a pu montrer qu'il existe une relation entre le risque de développer la MP et la dose cumulative totale des pesticides utilisés (118).

1.4 Roténone et modèles animaux de MP

Afin d'étudier l'étiopathogénie de la MP, de décrypter les mécanismes moléculaires sous-jacents et tenter des approches thérapeutiques, divers modèles animaux de MP ont été proposés. Les modèles animaux par intoxication sont variés et diffèrent notamment selon le mode d'administration: par voie intracérébrale, intraveineuse, intrapéritonéale, par inhalation ou par voie orale. Parmi les toxiques utilisés, la roténone a suscité beaucoup d'intérêt et de critiques ces 15 dernières années.

1.4.1 La roténone chez le rat

Injection stéréotaxique

La roténone a été injectée directement dans le cerveau de rongeurs pour la première fois en 1985 (119). Heikkila a pratiqué une injection stéréotaxique unilatérale de 2 µg de roténone dans le faisceau médian du télencéphale (FMT). Il a pu mettre en évidence une perte importante des neurones dopaminergiques dans la voie nigrostriatale (Tableau 2). Des expériences similaires mais réalisées de façon bilatérale dans la même structure ont montré que les rats présentaient une diminution de l'activité locomotrice associée à une perte significative des neurones dopaminergiques de la SNpc (120). Une injection unilatérale stéréotaxique de roténone (2-12µg) dans la SNpc entraîne une inhibition importante de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire, augmente la production de radicaux libres et provoque une perte des neurones dopaminergiques (121). Des études plus récentes ont montré que les effets de la roténone ne sont pas limités aux neurones dopaminergiques mais s'étendraient à d'autres populations neuronales, comme peut le faire la MP, induisant une perte de neurones sérotoninergiques dans l'hippocampe (122).

Administration		Dosage	Durée	Résultats	Auteurs
Injection Stéréotaxique	Unilatérale FMT	2 µg	21 jours	Lésions des voies dopaminergiques nigrostriatales	Heikkila
	Bilatérale FMT	3 µg/côté	21 jours	Neurodégénération DA, symptômes MP	Alam
	Unilatérale SN	2-12 µg	28-90 jours	MP progressive au niveau neurochimique/ neuropathologique	Saravanan
	Bilatérale SN	12 µg	7-21 jours	Altérations neurotransmetteurs	Santiago

Tableau 2. Etudes réalisées par injection stéréotaxique de roténone chez le rat

D'apres Xiong 2012

Injection intrapéritonéale

En 2004, Alam et *al.* en parallèle avec les injections stéréotaxiques, ont effectué des injections intrapéritonéales de roténone pendant 2 mois, montrant que la roténone par voie générale réduisait la concentration de dopamine dans le striatum, dans le cortex préfrontal et entraînait une perte des neurones dopaminergiques dans la SNpc. Ces résultats ont été par la suite confirmés par plusieurs études dont celle de Cannon (123-125) (tableau 3).

Injection sous-cutanée

L'injection sous-cutanée de roténone chez des rats Lewis à raison de 2-3 mg/kg pendant 28 à 56 jours, grâce à une mini-pompe osmotique entraîne une perte des neurones dopaminergiques de la SNpc accompagnée d'agrégats intraneuronaux (46). Ces résultats n'ont pas été confirmés par le travaux de Fleming, pour lesquels un protocole d'injection similaire entraîne une mortalité élevée sans atteinte de la SN ni signes moteurs spécifiques (126) (tableau 3).

Administration	Dosage	Durée	Résultats	Auteurs
Injection Intrapéritonéale	1.5-2.5 mg/kg	60 jours	Neurodégénération DA, symptômes MP	Alam
	2.75-3 mg/kg	7-20 jours	Neurodégénération DA, agrégats de poly-ubiquitine dans les neurones DA	Cannon
Injection Sous-cutanée	2.5 mg/kg	48 jours	Neurodégénération DA, symptômes MP	Sherer
	2-3.5 mg/kg	21 jours	Symptômes moteurs et perte TH hétérogènes	Fleming

Table 3. Etudes réalisées par injection intrapéritonéale et sous-cutanée de roténone chez le rat

D'apres Xiong 2012

Injection intraveineuse

Les premières expériences utilisant la roténone par voie intraveineuse ont été publiées en 1997 (127). L'injection dans la veine jugulaire de 10-18 mg/kg de roténone pendant 7 à 9 jours entraînait une akinésie et une rigidité chez les rats après 10 jours de traitement.

Cependant l'article qui a réellement « lancé » la roténone comme toxine capable de modéliser la MP a été publié par l'équipe de Greenamyre en 2000 (45). A l'aide d'une mini-pompe osmotique, les auteurs ont injecté de faibles doses de roténone (2-3 mg/kg/jour) pendant 1 à 3 semaines. Ces injections entraînaient une perte des neurones dopaminergiques de la SNpc, d'autant plus marquée que la dose de roténone était élevée et le traitement prolongé, accompagnée de la présence d'inclusions intraneuronales comparables aux corps de Lewy (immunoréactives pour l'alpha-synucléine et l'ubiquitine). Pour ce qui concerne l'aspect moteur, les rats traités avaient des déficits au niveau postural qui rappellent les caractéristiques cliniques de la MP. Des doses plus fortes (plus de 12 mg/kg) testées sur de courtes périodes ont induit une toxicité du système cardiovasculaire et des lésions non spécifiques.

Le groupe d'Etienne Hirsch s'est montré toutefois prudent quant à l'interprétation de ces résultats {Hoglinger:2003tl, Hoglinger:2005jx}. Ils ont montré que l'injection intraveineuse de roténone par voie fémorale (2,5 mg/kg pendant 28 jours) entraîne bien une accumulation d'alpha-synucléine dans les neurones de la substance noire et une perte de ces derniers mais que ces anomalies s'accompagne d'accumulations intraneuronales de protéines tau bien plus important en quantité. Ceci les a amené à conclure que le modèle roténone par voie intraveineuse était plus proche des tauopathies que des synucléinopathies (tableau 4).

Inoculation intranasale

Plus récemment, d'autres modalités d'administration, comme l'administration intranasale, ont été employées, afin de se rapprocher des conditions d'intoxications rencontrées chez l'Homme. L'administration de 2,5 mg/kg de roténone pendant 30 jours n'entraîne pas de troubles moteurs ni pathologiques caractéristiques de la MP (128) (tableau 4) {Rojo:2007kl}.

Administration	Dosage	Durée	Résultats	Auteurs
Injection Intraveineuse	1-12 mg/kg	7-36 jours	Neurodégénération DA, symptômes moteurs, hyper-régulation de l' a-syn	Betarbet
	2.2-2.5 mg/ kg	28 jours	Symptômes moteurs, neurodégénération DA, hyper-phosphorylation de tau	Hoglinger
	2-3.5 mg/kg	21 jours	Symptômes moteurs et perte TH hétérogènes	Fleming
Inoculation Intranasale	2.5 mg/kg	30 jours	Asymptomatique	Rojo

Tableau 4. Etudes réalisées par injection intraveineuse et inoculation intranasale de roténone chez le rat

D'apres Xiong 2012

1.4.2 La roténone chez la souris

Injection intrapéritonéale

L'injection intrapéritonéale de roténone chez la souris à une dose de 10 mg/kg pendant 7 jours, provoque une perte modérée mais significative des neurones dopaminergiques de la SNpc accompagnée de troubles moteurs (129) (tableau 5).

Injection sous-cutanée

Les différents protocoles d'administration de la roténone par voie sous-cutanée se sont révélés décevants. L'injection sous-cutanée de roténone (2.5 à 5 mg/kg pendant 30 à 45 jours) chez des souris d'âge différent (de 2 à 12 mois) entraine des difficultés motrices mais sans perte des neurones dopaminergiques nigrostriataux. Des effets similaires sont obtenus avec des doses plus élevées du pesticide (130) (tableau 5).

Inoculation intranasale

L'inoculation intranasale de la roténone chez la souris (2,5 mg/kg pendant 30 jours) n'entraîne aucune anomalie motrice ni neurodégénérescence (128) (tableau 5).

Administration orale

En voulant se rapprocher des conditions d'administration de la roténone chez l'Homme, Inden et collaborateurs ont évalué les effets de différentes doses de roténone administrée par voie orale, de 0.25 à 30 mg/kg/j sur une période de 28 jours. Seule la dose de 30 mg/kg/j s'est montrée capable d'induire une dégénérescence des neurones dopaminergiques associée à la surexpression de l'alpha-synucléine dans les neurones survivants (131,132) (tableau 5).

Administration	Dosage	Durée	Résultats	Auteurs
Injection Intrapéritonéale	10 mg/kg	7 jours	Faible perte TH dans SN Symptômes moteurs	Corona
Injection Sous-cutanée	5-15 mg/kg	1-21 jours	Pas de toxicité	Thiffault
	2.5-5 mg/kg	30-45 jours	Non caractéristique de MP	Richter
Inoculation Intranasale	2.5 mg/kg	30 jours	Asymptomatique	Rojo
Administration Orale	0.25-30 mg/kg	28 jours	Neurodégénération DA, symptômes moteurs, hyper-régulation de l'a-syn	Inden
	30-100 mg/kg	28-56 jours	Déficits comportementaux, diminution neurones TH, hyper-régulation de l'a-syn	Inden
	2.5-20 mg/kg	7 jours	MP progressive au niveau neurochimique/neuropathologique	Pan-Montojo

Tableau 5. Etudes ayant utilisé la roténone chez la souris

D'apres Xiong 2012

1.5 Autres toxiques environnementaux et modèles animaux de la MP

En dehors de la roténone, d'autres toxiques environnementaux capables d'inhiber le complexe I de la chaîne respiratoire de la mitochondrie ont été utilisés chez l'animal de laboratoire pour modéliser la MP. Il s'agit principalement du MPTP et du paraquat (Figure 6)

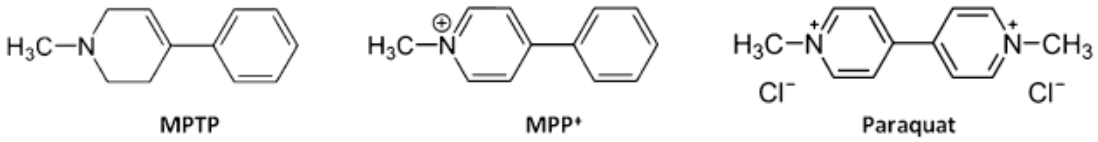


Figure 6: Structure chimique du MPTP, MPP^+ et du paraquat

Cette figure montre les structures chimiques du MPTP et de son métabolite MPP^+ et de l'herbicide paraquat.

1.5.1 MPTP

Le 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) est la seule substance toxique induisant une MP expérimentale qui soit liée à une forme de MP humaine. Cette substance, dérivée de l'héroïne, a été identifiée lors de son administration accidentelle par voie intraveineuse (11). Il en résulte que c'est le modèle le plus largement étudié chez l'animal (133). Il présente une spécificité partielle vis-à-vis des neurones dopaminergiques, cette spécificité est la conséquence directe de son import massif, via le transporteur à la dopamine (134), dans les neurones dopaminergiques et sérotoninergiques. Différents travaux ont permis de mieux comprendre le mécanisme d'action de cette substance et souligner le rôle du stress oxydant dans la destruction des neurones dopaminergiques (figure 7).

Plusieurs étapes peuvent être distinguées :

1. Le MPTP, composé lipophile, injecté par voie intraveineuse, va diffuser de façon passive à travers la barrière hémato-encéphalique, et être capté par un mécanisme encore mal connu par les astrocytes. Il est alors métabolisé en 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP^+) par la monoamine oxydase B (MAO-B) présente dans les astrocytes (135,136). L'administration d'un antagoniste de la MAO-B avant l'injection du MPTP prévient ses effets toxiques ce qui suggère que le MPP^+ est le métabolite actif (119,137).

2. Le MPP^+ est ensuite libéré dans le milieu extracellulaire via les *multi drug resistance proteins* puis recapté et transporté au sein des neurones par le transporteur de la dopamine (134). Ce transporteur est principalement présent dans les neurones dopaminergiques mais aussi dans les neurones sérotoninergiques. L'administration d'un inhibiteur de la recapture de la dopamine prévient de la toxicité du MPP^+. L'affinité de cette toxine pour la neuromélanine pourrait expliquer sa concentration dans cette sous-population de neurones, connue pour être plus affectée dans la MP.

3. Le MPP^+ se concentre au niveau mitochondrial et inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire du transport des électrons, entraînant une diminution rapide des quantités d'adénosine triphosphate (ATP). De plus cette inhibition induit une augmentation de la concentration en espèces réactives à l'oxygène (ROS) qui conduit à une augmentation du stress oxydatif et par conséquent à la mort sélective des neurones dopaminergiques (138,139).

L'injection de MPTP chez les primates non-humains et chez les humains induit un syndrome parkinsonien sévère reproduisant les symptômes moteurs de la maladie (5). Des données récentes suggèrent que le MPTP agirait en deux phases, de façon aiguë en provoquant initialement une perte neuronale importante, suivie d'une phase plus progressive pendant lequel le processus neurodégénératif continue de façon insidieuse (11,140). Divers modèles d'administration ont été développés chez les animaux. Ces différents protocoles induisent tous une perte importante des projections dopaminergiques au niveau du striatum, cependant seul les protocoles d'injection chronique semblent provoquer une pathologie progressive qui a aussi été mise en évidence chez le singe (141). Les altérations induites dans les modèles animaux par le MPTP sont corrigées, pour le moins partiellement, par la L-DOPA (142,143). En dehors de quelques travaux (144,145), la plupart des études réalisées ne mettent pas en évidence de corps de Lewy chez les animaux traités au MPTP (146).

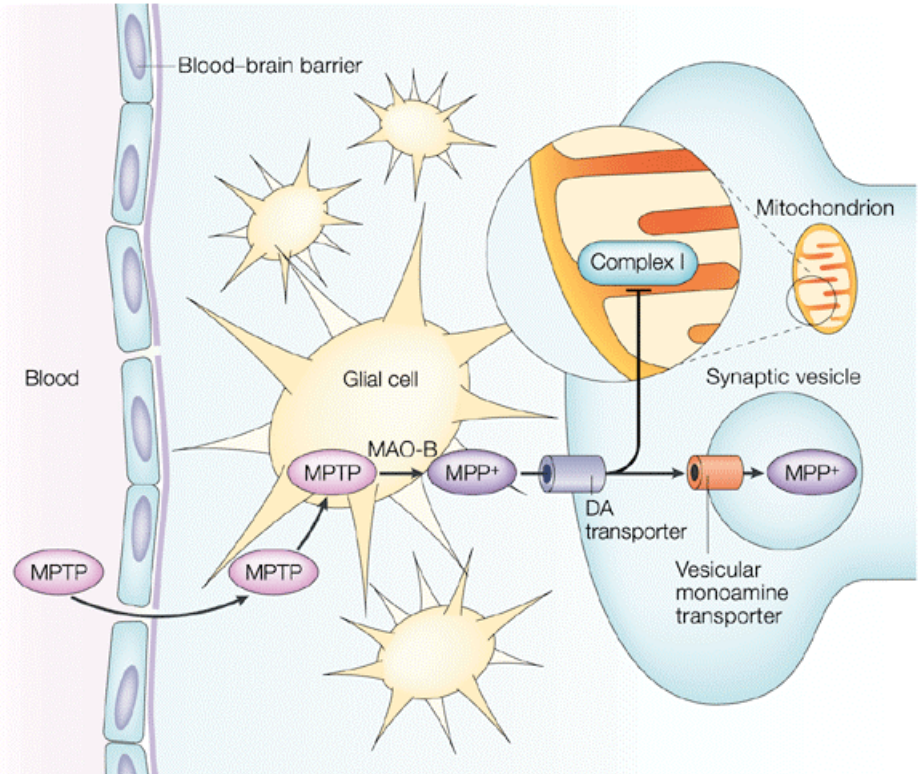


Figure 7: Mécanisme d'action du MPTP

Le MPTP passe à travers la barrière hémato-encéphalique où il est métabolisé en MPP^+ par la MAO-B, puis capté par le transporteur de la dopamine. Il se concentre à l'intérieur de la mitochondrie où il inhibe le complexe I de la chaîne de transport des électrons en diminuant ainsi le flux d'électrons. Il en résulte une augmentation des radicaux libre provoquant un stress oxydant et l'activation du processus de mort cellulaire.

D'après Vila et Przedborski

« Nature Reviews Neuroscience » 2003

Les animaux plus fréquemment traités au MPTP sont les souris, les rats et les singes. Différents protocoles et différentes doses ont été testés dans le but de créer une atteinte de la SNpc tout en évitant les effets négatifs typiques de ce modèle d'intoxication que sont notamment la mort de l'animal par malnutrition et/ou déshydratation.

Une revue sur les modèles d'intoxication au MPTP les plus utilisés nous aide à les classer (147):

Singes

Les injections intrapéritonéales et intramusculaires sont des techniques d'administration simples et sont capables d'induire un syndrome parkinsonien très important (148). Par contre, l'infusion intracarotidienne unilatérale est beaucoup plus difficile à exécuter et induit des symptômes moteurs unilatéraux (149) rendant difficile la faculté, pour l'animal, de manger et de boire. Dans les trois cas, l'administration de L-DOPA est parfois nécessaire pour permettre aux animaux de s'alimenter correctement (148).

Pendant longtemps, les singes ont été traités avec des doses importantes de MPTP (148). Dernièrement, plusieurs études ont mise en place l'utilisation de protocoles à plus faibles doses (0,05 mg/kg pour 2/3 fois par semaine) mais sur des durées de traitement plus importantes (plusieurs semaines ou mois) afin de permettre le développement d'une maladie neurodégénerative plus progressive (141,150,151).

Souris

Après le singe, la souris a été largement utilisée dans le modèle d'intoxication au MPTP pour des raisons tant économiques que techniques (152-154). L'utilisation des souris ne peut tout de même pas se substituer au singe pour plusieurs raisons : (I) les souris se montrent moins sensibles au MPTP et des doses plus importantes sont nécessaires pour pouvoir atteindre un résultat équivalent (II) l'atteinte motrice correspondant au syndrome parkinsonien est peu marqué chez les souris MPTP (III) la perte neuronale nigrostriatale est hétérogène (155).

Rats

Les rats ont une résistance au MPTP et une dégénérescence dopaminergique ne peut être provoquée qu'avec des concentrations très élevées (60 mg/kg) (156,157). Il est proposé que cette résistance au MPTP résulte de la faible concentration en MAOB dans les capillaires cérébraux du rat. Le modèle rat est en revanche utilisé pour des injections stéréotaxiques de MPP^+(156-160).

1.5.2 Paraquat

Le 1,1-diméthyl-4,4-bipyridinium (paraquat) est un herbicide qui a été couramment utilisé et interdit d'usage en 2007 au sein de la communauté européenne (figure 6). Néanmoins, il reste très utilisé dans le reste du monde. Il a commencé à recevoir une attention particulière après la découverte du lien entre le MPTP et le développement de la MP en raison de son analogie

structurelle avec le MPP^+ (figure 6). Toutefois, le mécanisme d'action des deux composés n'est sont pas équivalent (figure 8).

Le paraquat est très peu absorbé par inhalation mais peut être mortel pour l'Homme par ingestion (50 mg/kg). La dangerosité du paraquat est due à ses multiples cibles. Tout d'abord, il ne franchit pas la barrière hémato-encéphalique spontanément mais emprunte un transporteur d'acides aminés. Une fois dans les neurones, il exerce son effet toxique en augmentant le stress oxydatif en formant des radicaux libres (161,162) après un échange d'oxydation-réduction avec la NADPH (163,164). De plus, le paraquat stimulerait l'efflux du glutamate provoquant une excito-toxicité (165). La toxicité du paraquat s'accompagne d'une augmentation de l'expression de l'alpha-synucléine dans le cerveau des souris et de la présence d'agrégats intracellulaires proches des corps de Lewy (166). Le paraquat augmenterait la formation des fibrilles d'alpha-synucléine (53,167) *in vitro* et d'une façon dose-dépéndante (166). L'injection intrapéritonéale de paraquat entraine des difficultés motrices chez la souris (168) ainsi qu'une perte des neurones dopaminergiques (169).

La toxicité du paraquat pour la voie dopaminergique nigro-striée est augmentée par la co-administration du fungicide *manganese ethylenebis dithiocarbamate* (maneb) (166,170) par un mécanisme qui n'est pas très bien connu (171). Une étude, en particulier, nous confirme l'existence de ce synergisme : Thiruchelvam (171) administre par voie intrapéritonéale ces deux toxines seules ou en même temps. Il en conclut que seule l'administration commune des deux toxines permet d'observer une diminution de l'activité motrice et une perte des neurones dopaminergiques de la SNpc.

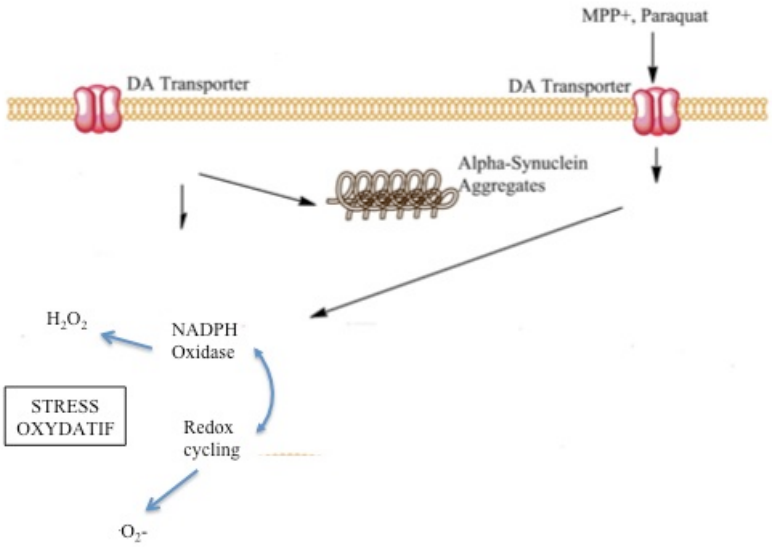


Figure 8: Mécanisme d'action du paraquat

Le paraquat entre dans le système nerveux central en utilisant un transporteur d'acides aminés. Il favorise la formation de radicaux libres par deux mécanismes : activation du cycle redox et activation de l'enzyme NADPH oxydase. De plus, il favorise la formation d'agrégats d'alpha-synucléine.

D'après Vila et Przedborski
« Nature Reviews Neuroscience » 2003

1.6 Atteintes digestives dans les modèles animaux toxiques de MP

Les troubles digestifs sont parmi les manifestations non-motrices les plus invalidantes au cours de la MP. Bien que l'ensemble du tractus digestif puisse être touché, les troubles de la vidange gastrique, à l'origine de nausées et d'une réduction des prises alimentaires ainsi que la constipation sont les plus fréquents {Pfeiffer:2003ti}. Il est classiquement proposé que ces troubles résultent de l'atteinte du SNE par le processus pathologique au cours de la maladie. Pour pouvoir confirmer cette hypothèse, les modèles animaux représenteraient l'outil le plus intéressant. Pourtant, peu d'études se sont intéressées à l'analyse des fonctions digestives et du SNE dans les modèles animaux de MP. Dans ce chapitre, nous proposons une synthèse des modèles qui ont tenté de reproduire le plus fidèlement possible, les troubles digestifs retrouvés chez l'Homme au cours de la MP, et tout particulièrement les modèles qui ont utilisé le MPTP et la roténone.

1.6.1 MPTP

Plusieurs études se sont intéressées ces dernières années aux effets du MPTP sur le tube digestif et le SNE et les résultats sont globalement concordants. La première étude, publiée en 2007 par Anderson *et al.* a montré une perte de 40% des neurones dopaminergiques dans le plexus myentérique de souris traitées par injection intrapéritonéale aigüe de MPTP (60 mg/kg) (172) sans mettre en évidence de changement dans la densité des neurones cholinergiques et nitrergiques. Cette perte des neurones dopaminergiques s'accompagnait de modifications électrophysiologiques et fonctionnelles, à savoir une accélération transitoire du temps de transit colique (172) qui s'oppose à la diminution du transit qu'on retrouve chez les patients parkinsoniens. La toxicité du MPTP envers les neurones dopaminergiques du plexus myentérique chez la souris a été confirmée par une autre étude (173). Cependant aucun de ces deux travaux n'a pu mettre en évidence la présence d'agrégats d'alpha-synucléine. De plus, une étude réalisée au laboratoire a permis de montrer que l'intoxication par le MPTP chez le primate non-humain s'accompagnait elle aussi d'une baisse de la population dopaminergique dans le plexus myentérique (174). Cette étude a mis en évidence également une augmentation du nombre de neurones nitrergiques par ganglion probablement dû à un mécanisme compensateur, ces deux populations exerçant un effet inhibiteur sur la motilité intestinale.

1.6.2 Roténone

Les effets de la roténone sur les fonctions digestives et sur le SNE ont été étudiés dans différents modèles d'animaux traités par cette toxine. Contrairement aux données obtenues avec le MPTP, les résultats sont parfois discordants. Greene (175) et collaborateurs ont utilisé une administration chronique de roténone (3 mg/kg/j) par injection sous-cutanée pendant 22 à 28 jours chez le rat. Un tel mode d'administration n'entraîne pas de perte des neurones dopaminergiques nigro-striataux. D'un point de vue digestif, les seules anomalies observées concernaient la motricité avec un ralentissement de la vidange gastrique et une diminution significative de la fréquence de production des selles chez les rats traités par rapport aux témoins. Aucun changement du nombre de neurones totaux, ni modification du phénotype neurochimique n'était noté sur l'ensemble du tractus digestif de ces animaux. Il n'y avait pas non plus d'inclusions d'alpha-synucléine. Dans une étude ultérieure, l'équipe de Greenamyre {Drolet:2009jf}a injecté la roténone par voie intrapéritonéale (2 mg/kg, 5 injections par semaine) à des rats pendant 6 semaines et a sacrifié les animaux à 3 jours ou 6 mois après la fin du traitement. Alors que les rats traités par la roténone et sacrifiés à 3 jours présentent une diminution de l'expression de l'alpha-synucléine dans le plexus myentérique de l'intestin grêle, ceux analysés à 6 mois ont une augmentation de l'expression de l'alpha-synucléine sous formes d'agrégats par rapport aux souris témoins. Cette surexpression d'alpha-synucléine s'accompagne d'une perte neuronale discrète mais significative et d'une diminution du temps de transit total

Des travaux plus récents ont étudiés les effets de l'administration orale de la roténone sur le SNE. En s'inspirant des travaux publiés par Inden en 2007 {Inden:2007gm}, Pan-Montojo et *al.* {PanMontojo:2010dt} ont administré par gavage une dose de 5 mg/kg/j de roténone à des souris pendant un mois et demi et 3 mois. L'analyse par immunohistochimie de l'iléon de ces souris a montré une augmentation de l'expression de l'alpha-synucléine dans les neurones myentériques de l'iléon des souris traitées par rapport aux témoins, aussi bien à 1 mois et demi qu'à 3 mois. Il est toutefois à noter que la caractérisation de l'atteinte digestive était incomplète dans ce modèle avec en particulier une absence d'évaluation du nombre total de neurones, de modifications du phénotype neurochimique et de la motricité digestive.

Roténone et MPTP ont suscités beaucoup des critiques et intérêts de la part des chercheurs : comme tout les modèles animaux existants, elles ont des avantages et des inconvénients mais, selon notre opinions, ils restent les plus reproductibles et les plus valables. Mais malgré que la MP a été longtemps considérée comme une maladie

dégénérative des neurones dopaminergiques de la substance noire, cette pathologie reste beaucoup plus complexe et à ce jour personne n'a vraiment été capable de reproduire toutes ses atteintes. Plusieurs travaux récents (9,176) ont montré que d'autres régions du système nerveux central et du système nerveux périphérique sont en effet touchées précocement par la pathologie de Lewy. C'est en particulier le cas du système nerveux entérique (SNE) qui est touché chez la quasi-totalité des patients parkinsoniens. Avant de détailler l'atteinte du SNE au cours de la MP, nous proposons un bref rappel sur sa structure.

2. LE SYSTEME NERVEUX ENTERIQUE

2.1 Morphologie générale du SNE

Le SNE est un réseau neuronal distribué tout le long du tube digestif, composé de plus de 100 millions de neurones, soit autant que dans la moelle épinière. Cette subdivision du système nerveux végétatif est parfois appelée « le second cerveau » car elle est capable de réguler de façon autonome les fonctions digestives, en partie indépendamment du SNC (7).

Le plexus ganglionnaire est l'unité structurelle du SNE (figures 9 et 10). Il existe deux plexus majeurs au sein des parois digestives chez l'Homme: le plexus sous-muqueux qui contient le plexus de Meissner, et le plexus myentérique (PM) ou plexus d'Auerbach. Le plexus sous-muqueux (PSM) est situé dans la sous-muqueuse, et le plexus myentérique se situe dans le plan entre la couche longitudinale (externe) et circulaire (interne) de la *muscularis propria*. Le plexus sous-muqueux est surtout développé dans le grêle, et est absent ou à l'état de reliquat dans le tractus digestif supérieur jusqu'à l'estomac inclus. Le plexus myentérique et sous-muqueux se présentent comme un maillage serré de fibres et de faisceaux de fibres nerveuses couvrant toute la circonférence du tube digestif et continu sur l'ensemble du tractus. Les nœuds ou ganglions nerveux se situent aux points de jonction des fibres nerveuses et sont formés d'un amas serré de cellules gliales entériques (CGE) et de neurones. Les ganglions du PM sont plus volumineux et possèdent plus de neurones que ceux du PSM. Les neurones entériques sont largement interconnectés au sein du ganglion, avec les ganglions adjacents et avec les ganglions des autres plexus.

Les fibres nerveuses contenues dans les plexus nerveux ont deux origines :

- l'innervation extrinsèque désigne les neurones dont le corps cellulaire est situé en dehors du SNE: axones postganglionnaires sympathiques et préganglionnaires parasympathiques d'une part, qui projettent sur les neurones du SNE ou rarement directement sur les effecteurs; innervation viscérosensible extrinsèque d'autre part.

- l'innervation intrinsèque, la plus abondante, désigne les prolongements provenant des neurones des différents plexus du SNE; ces fibres projettent sur d'autres neurones (interneurones) ou sur les effecteurs de la paroi digestive.

Figure 9: Organisation du SNE

Dessin représentatif de l'organisation du SNE: on retrouve plusieurs couches dont deux plexus majeurs : le plexus sous-muqueux et le plexus myentérique ce dernier étant localisé entre la couche longitudinale (externe) et circulaire (interne) de la muscularis propria.

D'apres A. Micheau

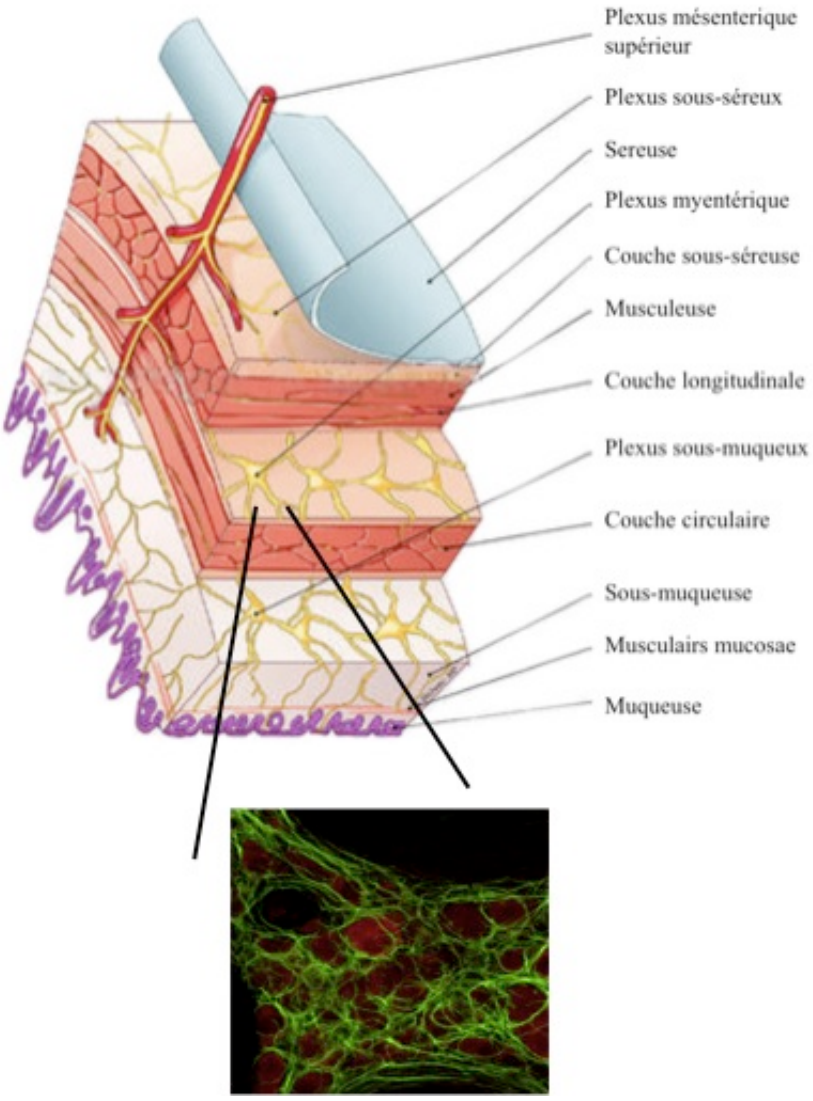


Figure 10: Organisation du réseau neuronal entérique

Photo d'un marquage immunologique de la protéine GFAP (vert) marquant les cellules gliales entourant des neurones entériques (marquage de la protéine Hu (rouge)) au niveau d'un ganglion du plexus myentérique chez la souris.

M. Mahé, Inserm U913 Nantes

2.2. Neuromédiateurs du SNE

La régulation de la motilité intestinale se joue à plusieurs niveaux. Les hormones et les neurotransmetteurs sont les acteurs principaux, agissant directement et indirectement sur les cellules musculaires du tractus digestif. Les hormones, comme l'insuline, la cholécystokinine et les glucagon-like-peptides, sont relarguées pendant et après le repas. Elles sont excrétées localement par les cellules endocrines et modulent la motilité intestinale en activant les neurones intrinsèques primaires afférents (IPANs), puis activent à nouveau les cellules endocrines et la composante extrinsèque du SNE. Ce système envoie des informations au SNC qui évalue et module l'activité gastrointestinale.

La régulation neuronale passe par les composantes intrinsèque et extrinsèque (177). Une trentaine d'agents neuro-humoraux ont été identifiés dans le SNE et peuvent être classés en fonction de leur action excitatrice ou inhibitrice sur la motilité digestive (tableau 6). La plupart peuvent être exprimés par les neurones, même si leur implication directe dans la transmission synaptique reste parfois à démontrer. Ces neuromédiateurs entériques sont des petites molécules (noradrénaline [NA], acétylcholine [ACh], sérotonine [5-HT]), des bases puriques (adénosine, adénosine tri-phosphate [ATP]), des peptides (tachykinines [substance P et neurokinine A], vasointestinal peptide [VIP], *calcitonin gene-related peptide* [CGRP], somatostatine [som]) ou des gaz (protoxyde d'azote [NO]).

Les neurones peuvent être classés suivant leurs fonctions, en sensoriels, interneurones et motoneurones. Brièvement, les neurones *sensoriels* intrinsèques (IPANs) sont appelés aussi « premiers » parce qu'ils captent les changements du tissu avant les autres et afférents parce que leurs afférences montent jusqu'au SNC. Ils forment un réseau de surveillance avec les cellules endocrines et les cellules immunitaires. Les IPANs contrôlent la digestion alors que les afférences extrinsèques règlent l'homéostasie des fluides et la sensation à la douleur. Les neurones sensoriels co-localisent avec un marquage ChAT et SP. Les neurones sensoriels sont connectés aux *interneurones*. Ceci peuvent être ascendants (principalement cholinergiques) et descendants (nitrergiques et VIPergiques). En dernière ligne, on retrouve les *motoneurones* qui innervent les muscles. Ils peuvent être excitateurs ou inhibiteurs relarguant des transmetteurs qui provoquent une contraction (SP) ou une relaxation (NO, VIP, ATP) (178) (tableau 6).

A

Neurones Myenteriques	Proportion	Codage chimique
Neurones moteurs excitateurs du muscle circulaire	12%	ChAT/GABA
Neurones moteurs inhibiteur du muscle circulaire	16%	NOS/VIP/NPY
Neurones moteurs excitateurs du muscle longitudinale	25%	ChAT/TK
Neurones moteurs inhibiteurs du muscle longitudinale	2%	NOS/VIP/ GABA
Interneurones ascendants	5%	ChAT/TK
Interneurones descendants	11%	ChAT/NOS/ VIP/5-HT
IPAN	26%	ChAT/ Calbindine/TK

B

Neurones submuqueuse	Proportion	Codage chimique
Neurones secretomoteurs non-cholinergiques	45%	VIP
Neurones secretomoteurs cholinergiques	44%	ChAT/NPY/ CGRP/ Calretinine
IPAN	11%	ChAT/ Calbindine/TK

C

Stimulation	Inhibition
ACh	NO
Adénosine	VIP
5-HT	Somatostatine
Histamine	GABA
SP	CGRP
	Dopamine

Tableau 6: Principaux neurotransmetteurs et substances neurohumorales

A et B. Types des neurones retrouvés dans l'intestin grêle du cochon d'inde dans les deux plexus ganglionnaires selon leur fonctions.

D'après Furness

C Principales substances neurohumorales classées selon leur action physiologique sur la motricité du tube digestif.

D'après Hansen

Les neurones entériques expriment en général une combinaison de plusieurs de ces neuromédiateurs, définissant leur codage ou phénotype neurochimique. Un neuromédiateur principal peut être associé à un ou plusieurs co-neurotransmetteurs. Leur action varie en fonction du type de récepteur. Comme dans le SNC, les synapses du SNE sont axo-somatiques, axo-axonales ou axo-dendritiques.

Les deux principales populations neuronales du SNE sont cholinergiques et nitrergiques, les deux phénotypes rassemblant plus de 90% de la population neuronale. Cependant, établir le caractère nitrergique ou cholinergique ne suffit pas à définir une classe fonctionnelle de neurones. Les neurones viscérosensibles, les interneurones et les motoneurones peuvent par exemple utiliser l'acétylcholine, d'où l'intérêt d'une caractérisation plus complète du phénotype neurochimique impliquant les co-transmetteurs. Les enzymes limitantes de la synthèse de l'acétylcholine et du NO, respectivement ChAT (acétyl-choline-transférase) et NOS (*nitric oxide synthase*), sont utilisées comme marqueurs des neurones cholinergiques et nitrergiques. Leur expression est largement exclusive. Cependant une minorité de neurones co-exprime ChAT et NOS : ils représentent 3 à 4% de la population totale dans le côlon, et jusqu'à 17% dans l'estomac. Les neurones cholinergiques forment la population dominante du tube digestif. Leur proportion tend à décroître selon un gradient oro-anal : au niveau du plexus myentérique, ils représentent de 57 à 72% du nombre total de neurones au niveau de l'estomac, de 52 à 66% dans le grêle, et de 38 à 65% dans le côlon (tableau 7). Les rares données disponibles sur le plexus sous-muqueux montrent des proportions similaires. La deuxième population en fréquence est celle des neurones nitrergiques, en général distincts des neurones cholinergiques. Leur proportion augmente selon un gradient oro-anal : ils représentent de 25 à 40% des neurones myentériques dans l'estomac, 38% dans le grêle et la moitié dans le côlon.

Deux autres sous-populations du SNE méritent d'être citées, il s 'agit des neurones VIPergiques et dopaminergiques. La sous-population VIPergique est mise en évidence directement par l'immunomarquage du neurotransmetteur. Approximativement 50% des neurones myentériques expriment VIP dans l'estomac, contre 10% dans le côlon (tableau 7). Les neurones dopaminergiques sont rares et distribués selon un gradient rostro-caudal : ils représentent 20% de l'ensemble des neurones du plexus myentérique de l'estomac contre 4% dans le côlon et 20% des neurones sous-muqueux dans l'estomac pour 0 à 0.5% dans le côlon.

	ChAT	VIP	NOS	TH
Plexus Sous-muqueuex				
Estomac	70%	65%	25-40%	20%
Grêle	53-62%	47-53%	38%	2-15%
Côlon	50%	79%	22%	0%
Plexus Myentérique				
Estomac	70%	59%	40%	20%
Grêle	62-66%	11-14%		6-18%
Côlon	65%	13%	47%	4%

Tableau 7

Proportion des neurones ChAT, VIP, NOS et TH dans les deux plexus de la partie haute, intermédiaire et de la partie basse du système digestif chez l'Homme.

D'après Murphy 2007 et Anlauf 2003

2.3 Activité motrice intrinsèque du SNE: le réflexe péristaltique

Le réflexe péristaltique associe une contraction orale et une relaxation anale du muscle circulaire en réponse à une stimulation mécanique ou chimique locale de la muqueuse ou à une distension du tube digestif. Les neurones intrinsèques primaires afférents (IPANs) des plexus sous-muqueux et myentérique sont les afférences de ce réflexe, et projettent circonférentiellement pour faire synapse avec d'autres IPANs et de courts interneurones cholinergiques ascendants formant une chaîne d'excitation (figure 11). Ces interneurones contactent finalement des motoneurones excitateurs cholinergiques et tachykininergiques. La voie inhibitrice descendante implique probablement une deuxième catégorie d'IPANs faisant synapse avec de longs interneurones descendants au codage neurochimique plus complexe, liés par une synapse excitatrice à des motoneurones inhibiteurs nitrergiques. Les motoneurones de la voie ascendante projettent sur le muscle circulaire, et probablement aussi sur le muscle longitudinal (179,180).

Le SNE contrôle la motricité digestive et la sécrétion par des réflexes qui sont amorcés par la distension de la paroi intestinale, la déformation de la muqueuse ou le contenu

chimique de la lumière (181). Ces réflexes impliquent des circuits neuronaux du SNE qui sont interconnectés. Cette régulation neuronale des fonctions digestives consiste en la libération de neuromédiateurs synthétisés par des neurones fonctionnellement bien définis.

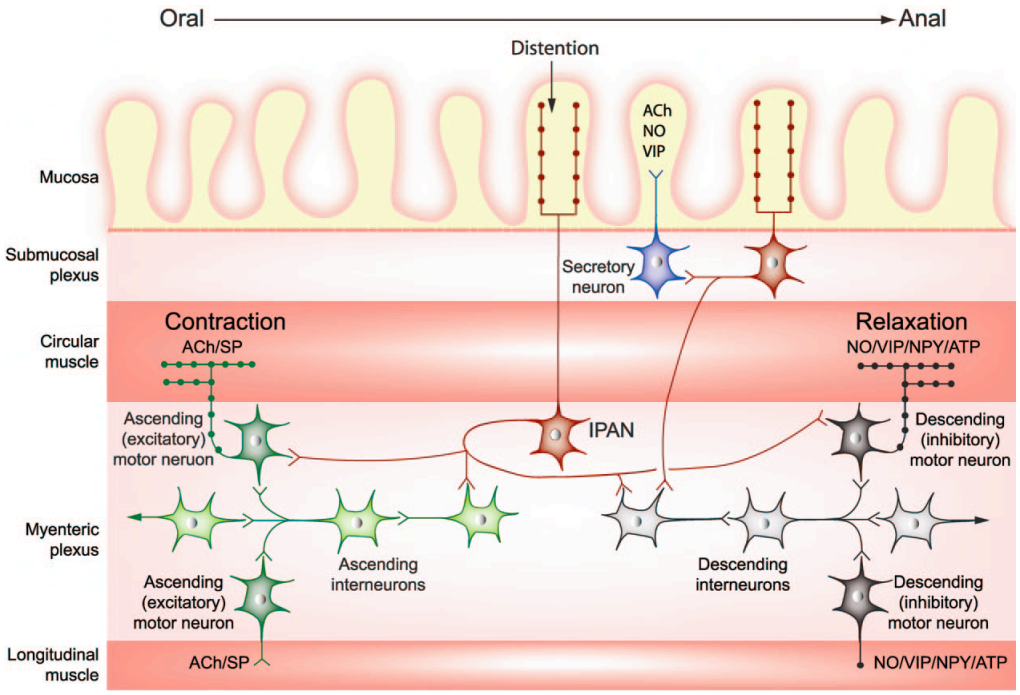


Figure 11: Organisation du SNE et réflexe péristaltique

La distension locale de la paroi intestinale, la distorsion de la muqueuse et le contenu chimique activent les IPANs localisés dans le PSM et PM. Les projections des neurones IPAN vont en direction orale et anale pour permettre les synapses avec les interneurones, les motoneurones et les neurones sensoriels. Le réflexe péristaltique inclut un réflexe excitateur ascendant, médié par des neurones sécrétant de l'Ach et de la substance P, provoquant une contraction de la musculature circulaire et longitudinale en amont du site de stimulation. Le réflexe descendant inhibiteur implique quant à lui des neurones moteurs qui sécrètent du NO et du VIP et provoque une relaxation de la musculature circulaire et longitudinale en aval du site de stimulation. Le réflexe péristaltique est coordonné par l'action des interneurones cholinergiques qui reçoivent des inputs de la part des IPANs.

D'apres E. Benarroch

2.4 Le SNE est connecté au SNC

Le SNE est capable de fonctionner indépendamment du SNC mais il reste toutefois sous le contrôle de ce dernier via les afférences et les efférences des systèmes ortho et parasympathiques (figure 12). Le système nerveux végétatif se caractérise par la présence de deux neurones disposés en série : les neurones pré-ganglionnaires dont le corps cellulaire se trouvent dans le système nerveux central et les neurones post-ganglionnaires dont le corps est localisé dans les ganglions végétatifs. Le système nerveux sympathique et parasympathique diffèrent par :

- l'origine du neurone pré-ganglionnaire (moelle thoraco-lombaire pour le sympathique; tronc cérébral et moelle sacrée pour le parasympathique);
- la position du relais entre les deux neurones par rapport aux organes innervés (à distance des viscères pour le sympathique et à proximité des organes pour le parasympathique);
- la nature des neuromédiateurs entre neurone post-ganglionnaire et effecteur (noradrénaline pour le système sympathique et acétylcholine pour le système parasympathique).

Les neurones primaires afférents (output sensoriel) qui transportent les informations au SNC sont localisés dans le nerf vague (parasympathique) et le nerf splanchnique (sympathique). Les neurones primaires afférents *parasympathiques* situés dans la couche de muscles lisses sont sensibles à la distension mécanique de l'intestin alors que les neurones primaires afférents situés dans la muqueuse sont sensibles aux concentrations luminales de glucose, d'acides aminés ou d'acides gras à chaîne longue (182). Ces neurones, dont le corps cellulaire est situé dans le ganglion du nerf vague, projettent jusqu'au noyau du tractus solitaire et sont à l'origine de plusieurs réflexes vago-vagaux, affectant la déglutition, la motricité de l'intestin ou encore la sécrétion. Les neurones afférents *splanchniques* ont leurs terminaisons dans la paroi du tube digestif et leur corps cellulaires dans les ganglions spinaux. Leurs extrémités distales sont situées dans la corne postérieure de la moelle épinière. Ces neurones afférents sont principalement des nocicepteurs et sont impliqués dans la détection de la douleur dans le tractus digestif (183).

Les voies *efférentes motrices* (input moteur) *parasympathiques* sont constituées par le nerf vague qui contrôle les fonctions motrices et sécrétomotrices du tractus digestif supérieur et le nerf sacré qui contrôle les fonctions du côlon distal et du rectum (184). L'innervation

vagale supérieure a pour origine deux noyaux situés dans la moelle, qui sont le noyau moteur dorsal du vague et le noyau ambigu (185). Le noyau ambigu contient les neurones somato-moteurs non autonomes qui innervent les muscles striés du pharynx, du larynx et de l'œsophage. Le noyau dorsal du vague contient des neurones préganglionnaires viscéromoteurs qui innervent de façon importante le plexus myentérique et sous muqueux du SNE (185,186) et font donc synapse avec les neurones post-ganglionnaires directement à proximité des organes innervés.

Les *fibres sympathiques* qui innervent l'intestin ont leurs corps cellulaires qui se situent dans la corne intermédio-latérale de la moelle épinière. Ces fibres établissent une synapse dans les ganglions de la chaîne paravertébrale. Les fibres post-ganglionnaires rejoignent quant à elles les viscères.

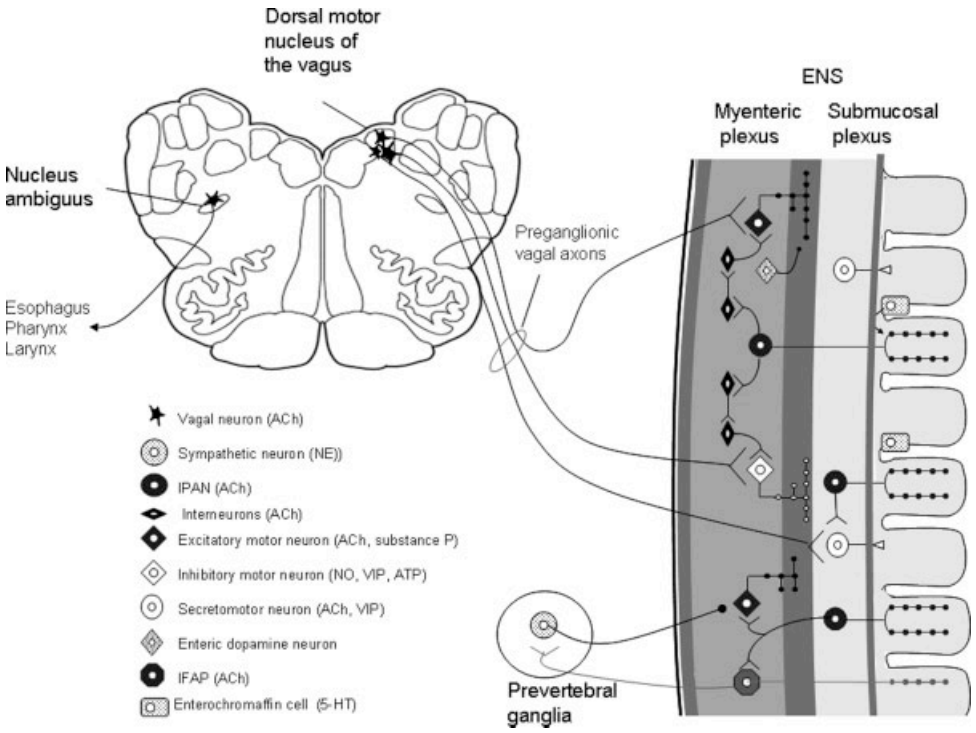


Figure 12: Représentation de la voie vagale efférente

Représentation schématique du contrôle du système nerveux autonome parasympathique sur le SNE. Les voies efférentes motrices parasympathiques sont constituées par le nerf vague et le nerf sacré.

D'apres Cersosimo 2008

2.5 SNE et barrière épithéliale intestinale

La barrière épithéliale intestinale (BEI) est l'interface entre le milieu extérieur et l'organisme (figure 13). Elle joue un rôle central dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme en assurant à la fois sa protection contre le contenu de la lumière digestive avec les agents pathogènes et le contrôle des échanges entre lumière et milieu interne. Cette fonction est assurée par la monocouche de cellules épithéliales intestinales (CEI) maintenues les unes aux autres et sur la membrane basale via des complexes protéiques distincts.

2.5.1 Composants de la BEI

Il existe quatre types de cellules épithéliales intestinales : les cellules absorbantes ou entérocytes, les cellules mucosécrétantes, les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth. Les *entérocytes* sont les cellules responsables de l'absorption des nutriments, de l'eau et des électrolytes. Leur pole apical présente des microvillosités riches en glycoprotéines qui forment les enzymes et les transporteurs. Elles sont également recouvertes de glycolipides formant le glucocalix au rôle protecteur (187). Elles représentent 80% des CEI. Les *cellules calciformes* représentent environ 15% des CEI, on les retrouve sur toute la hauteur de la villosité et de la crypte intestinale. Elles secrètent des granules de mucines dans la lumière digestive.Les *cellules de Paneth* se trouvent au fond des cryptes de l'intestin et sont absentes dans le côlon. Elles secrètent de nombreuses substances anti-microbiennes dans la lumière intestinale. Les *cellules entéroendocrines* sont présentes tout au long de l'intestin et secrètent de la sérotonine.

Parallèlement à la barrière physique représentée par l'épithélium, se trouve à sa surface, la composante extrinsèque de la BEI qui constitue souvent la première protection contre l'agression du milieu luminal (188). En effet, une couche de mucus secrétée par les CEI tapisse la surface épithéliale et constitue une ligne de défense contre l'adhésion et la pénétration de toxines, bactéries et antigènes.

2.5.2 Fonctions de la BEI

Interface entre l'environnement luminal et les tissus sous-jacents, la BEI doit assurer deux fonctions complémentaires: d'une part être perméable pour assurer l'absorption des nutriments et d'électrolytes indispensables au métabolisme et d'autre part, protéger l'organisme contre les agents pathogènes et les toxines. Il s'agît d'une perméabilité sélective. Selon la taille et la nature des composés qui doivent passer la barrière, plusieurs voies sont

possibles. Les gros composés hydrophiles passent la BEI de façon paracellulaire alors que les petits composés hydrophiles et les composés lipophiles peuvent passer directement au travers des membranes des cellules épithéliales, il s'agit de perméabilité transcellulaire. Les très grosses molécules comme les peptides ou les protéines sont endocytées dans la lumière puis exocytées dans la circulation générale (189).

La perméabilité paracellulaire contrôle la majorité des échanges. Elle est constituée de complexes moléculaires jonctionnels des cellules épithéliales intestinales qui jouent un rôle dans la protection contre les agents pathogènes (190). On distingue les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes. Les jonctions serrées sont formées par des complexes multi-protéiques associant des protéines transmembranaires et des protéines cytoplasmiques. Les protéines transmembranaires sont constituées de la famille des claudines, occludines et protéines JAM (*junction adhésion molecule*), elles sont reliées au cytosquelette d'actine par les protéines Zonula Occludens (ZO-1, ZO-2, ZO-3) (191). Les jonctions adhérentes ou Zonula Adherens relient les cellules entre elles par des interactions Ca^{2+}-dépendantes (192,193). Enfin, les desmosomes relient les cellules épithéliales intestinales permettant à la BEI de résister aux forces de pression (194). Les jonctions communicantes (*gap-junctions*) permettent aux cellules épithéliales intestinales de communiquer entre elles par des signaux chimiques ou électriques (195).

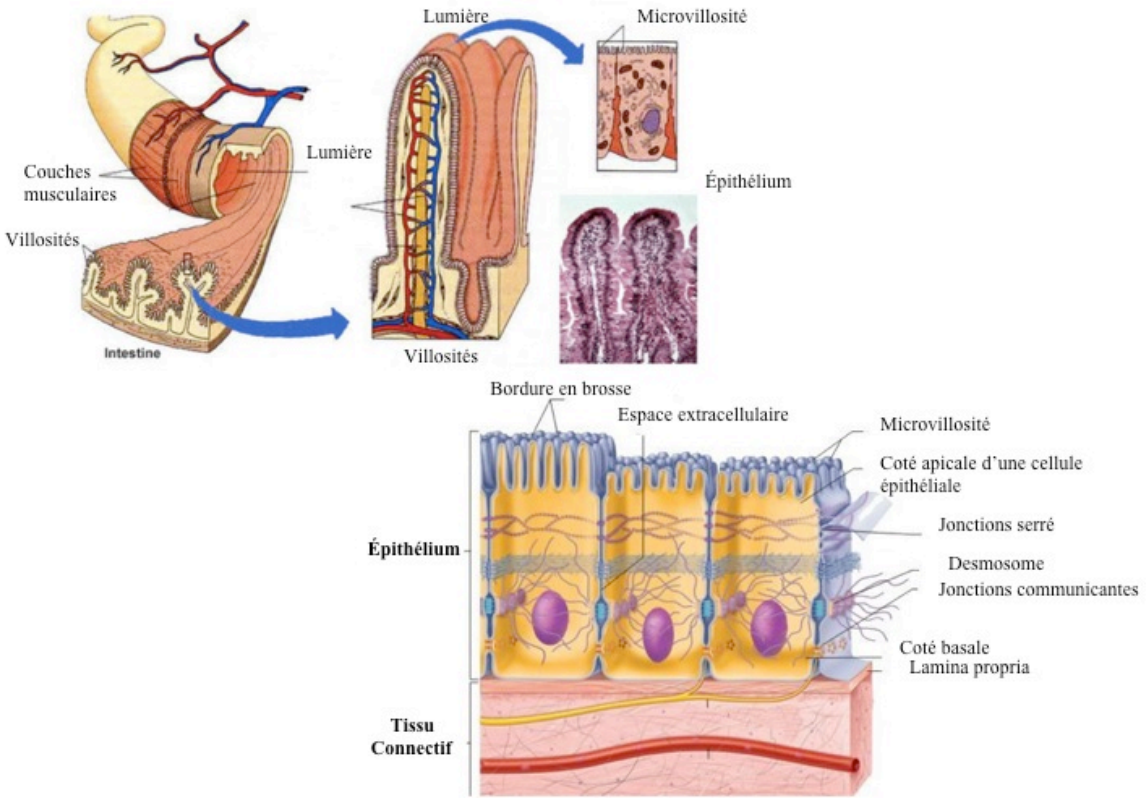


Figure 13: La barrière épithéliale intestinale

Dessins représentatifs de la composition et des éléments constitutifs de la BEI. Elle est composée d'une couche monocellulaire de cellules épithéliales. Sa régulation est assurée par la présence des protéines des jonctions serrées.

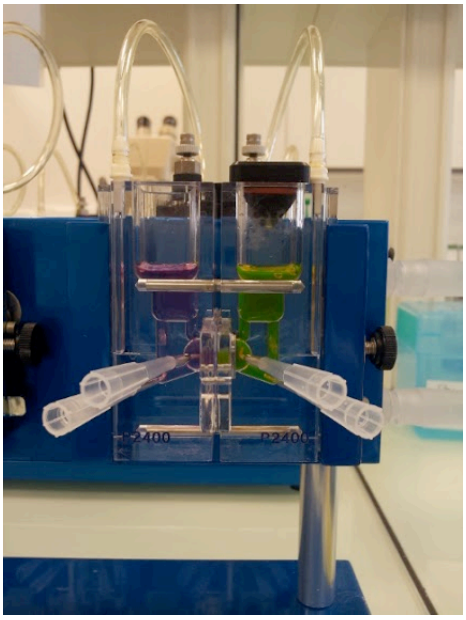
D'après truenourishement.com et antranik.org

L'étude de la perméabilité de la BEI peut se faire aussi bien *ex-vivo* qu'*in-vivo.* L'utilisation de molécules de différentes tailles (dextran, acide sulfonique, peroxydase de raifort) couplées à une molécule fluorescente telle que le FITC (*fluorescein isothiocyanate*) permet d'apprécier les différentes types de perméabilité de façon sensible (paracellulaire, transcellulaire, endocytose) (196-200) chez l'Homme et les animaux (196,201,202). Les chambres d'Ussing permettent d'étudier la perméabilité *ex-vivo* en mesurant la quantité de fluorescence qui passe d'une chambre à l'autre à travers le tissu (203) (figure 14). Enfin, de façon plus globale, la perméabilité de la BEI peut être mesurée *in vivo* chez l'Homme ou l'animal en utilisant les mêmes molécules décrites ci-dessus. Les sucres non métabolisables sont dosés dans les urines (204), alors que les molécules couplées à la fluorescéine (acide sulfonique, dextran ou peroxydase de raifort) sont dosées dans le sérum (205).

2.5.3 Implication du SNE dans la régulation de la perméabilité de la BEI

Les neuromédiateurs sont capables de moduler les fonctions de la BEI. Ainsi, le VIP (206) augmente l'expression de ZO-1 (206) et l'Ach augmente la perméabilité paracellulaire (207,208) et transcellulaire (207). Les CGE participent également à la régulation de la BEI. La délétion des CGE augmente la perméabilité intestinale qui précède le développement d'une inflammation intestinale (209). Les effets directs des CGE sur la perméabilité ont été caractérisés à l'aide de modèles de co-culture de CEI en présence de CGE. Ces modèles ont permis de montrer que les CGE diminuent la perméabilité paracellulaire *in vitro* et que ces effets sont associés à une augmentation de l'expression de la protéine ZO-1 dans les CEI. Par ailleurs, plusieurs facteurs secrétés par les cellules gliales peuvent avoir une influence sur la perméabilité paracellulaire : S100β et IL-6 diminuent la perméabilité paracellulaire de biopsies coliques humaines (210).

Figure 14: Chambre de Ussing



Cette photo montre une chambre de Ussing utilisée pour mesurer la perméabilité intestinale *ex-vivo* chez les animaux et chez l'Homme. Chaque chambre est composée de deux réservoirs dont une contient un marqueur fluorescent (à droite sur la photo). Une cassette qui contient la biopsie est introduite entre les deux réservoirs. Le passage du marqueur se fera du pôle apical vers le pôle basolatéral (de droite vers la gauche).

Inserm U913, Nantes

2.6 Atteinte du SNE et de la BEI dans la MP

Les premières lésions du SNE dans la MP sont décrites dans les années 80. Des inclusions semblables aux corps et prolongements de Lewy ont été mises en évidence dans le plexus myentérique et à un moindre degré dans le plexus sous-muqueux du côlon, du tiers inférieur de l'œsophage et de l'estomac (ref wakabayashi, qualman, kupsky). Dans leur ensemble, ces premières publications sur l'atteinte du SNE dans la MP n'ont rencontré qu'un écho modeste.

Ce sont les travaux fondateurs de Heiko Braak en 2002 et 2006 qui ont permis au SNE de faire un retour en force sur la scène parkinsonienne (211). La vaste étude neuropathologique menée par cet anatomiste allemand a permis de mettre en évidence une progression temporo-spatiale ascendante des corps de Lewy dans le tronc cérébral et le prosencéphale, classée en 6 stades (211). De façon frappante, les premières lésions encéphaliques de la MP apparaissent dans le bulbe olfactif et surtout dans le noyau dorsal du vague, bien avant l'atteinte de la substance noire. Le nerf vague innervant la quasi-totalité du tractus digestif, l'hypothèse de *l'atteinte inaugurale du SNE* dans la maladie de Parkinson voit le jour (9).

Depuis, plusieurs travaux autopsiques de grande envergure ont été menés afin de mieux caractériser l'atteinte du SNE au cours de la MP. Nous retiendrons tout particulièrement l'étude de *l'Arizona Consortium* qui a permis de montrer que les lésions du SNE sont présentes chez la quasi-totalité des patients parkinsoniens (21 sujets sur 23). Des expériences complémentaires sur ces mêmes prélèvements ont montré qu'il n'y a pas de perte neuronale significative dans les plexus myentériques et sous-muqueux au cours de la MP en particulier des neurones dopaminergiques et que la pathologie de Lewy n'affecte pas préférentiellement un sous-type de neurones entériques (212).

En ce qui concerne une éventuelle atteinte de la BEI au cours de la MP, seules 3 études se sont intéressées à son atteinte éventuelle au cours de la MP. En 1996, chez 15 patients parkinsoniens et 15 témoins, Davies *et al.* montrent que les patients parkinsoniens ont un ratio lactulose/mannitol dans les urines supérieur aux témoins, traduisant une diminution de la perméabilité intestinale, mais une perméabilité au sucrose équivalente (perméabilité de la partie haute du tube digestif) (213). En 2011, Forsyth *et al.* montrent que le rapport lactulose/mannitol dans les urines n'est pas modifié mais que la quantité de sucralose (perméabilité totale) est plus élevée chez les parkinsoniens que chez les témoins (204). Enfin, en 2012, Salat-Foix et collaborateurs ont montré une altération de la perméabilité de la BEI chez 4 patients parkinsoniens sur 12 (3 patients sur 12 avec une augmentation de la

perméabilité au mannitol et 1 patient sur 12 avec une augmentation de perméabilité au sucralose) (214).

2.7 Conséquences de l'atteinte du SNE dans la MP

L'atteinte du SNE chez les patients parkinsoniens peut avoir deux conséquences principales : les lésions du SNE seraient à l'origine des troubles digestifs fréquents au cours de la MP et seraient impliqués dans la diffusion et donc dans la physiopathologie de la maladie (Hypothèse de Braak) (215).

Les signes digestifs sont les plus fréquents des manifestations non-motrices de la maladie, pouvant impliquer l'ensemble du tractus digestif avec en particulier les troubles de la vidange gastrique et la constipation (reference). Il est tentant de proposer que ces troubles de la motilité digestive sont la conséquence des lésions du SNE. Toutefois, ceci n'est pas prouvé et il est tout à fait possible qu'ils résultent de l'atteinte parasympathique et en particulier de l'atteinte du noyau dorsal moteur du vague (215,216).

Le bulbe olfactif et le noyau dorsal du vague sont des structures en contact indirect avec le milieu extérieur, par l'intermédiaire des nerfs olfactifs et du nerf vague. C'est pourquoi Braak suggère l'implication d'un toxique environnemental neurotrope, inhalé ou ingéré, qui traverserait la muqueuse nasale et la BEI et qui serait à l'origine de la MP. Le noyau dorsal du nerf vague, qui innerve la majeure partie du tube digestif, serait atteint par transport rétrograde, un scénario semblable à celui proposé pour le nouveau variant du prion (215,216). Les données cliniques et épidémiologiques apportent des arguments en faveur du modèle de Braak, puisque les troubles de l'olfaction et la constipation peuvent constituer des signes précurseurs ou des facteurs de risque de la maladie de Parkinson (reference PMID: 20625084). Ainsi le SNE, serait le premier maillon d'une chaîne d'évènements dégénératifs menant à la substance noire. Cette hypothèse de Braak, bien que séduisante repose néanmoins encore sur des fondations fragiles et incertaines. Trois objections peuvent être opposées : (i) L'atteinte du SNE et du nerf vague n'est qu'un cas particulier de l'atteinte du système nerveux végétatif. Centré sur le nerf vague, parasympathique, le modèle de Braak est battu en brèche par l'atteinte diffuse du système végétatif dans la maladie de Parkinson. Une dénervation sympathique associée à des inclusions d'alpha-synucléine a été décrite au niveau du cœur, de la peau, ou du SNE lui-même qui reçoit une double innervation parasympathique et sympathique (217) (ii) La classification de Braak repose sur le postulat du caractère pathogène obligatoire des corps de Lewy et non sur la présence d'une perte neuronale (iii)

L’hypothèse d’une origine entérique de la maladie de Parkinson repose largement sur la précocité de l’atteinte du noyau dorsal du vague à l’étage encéphalique. Kurt Jellinger, neuropathologiste viennois, a récemment éprouvé cette classification en analysant 71 cas de maladie de Parkinson issus d’une banque de cerveaux londonienne. Dans cette série, seuls 53% des cas sont compatibles avec le modèle de progression caudo-rostral décrit par Braak (218).

OBJECTIFS DE LA THESE

Etant donné le rôle potentiel des toxiques environnementaux et du SNE dans la physiopathologie de la MP, mon travail de thèse s'est intéressé aux effets de la roténone sur le SNE. Nous avons dans un premier temps étudié les effets de la roténone *in vitro* sur un modèle de culture primaire du SNE et *in vivo* après gavage chez la souris.

1. EFFETS DE LA ROTENONE DANS UN MODELE DE CULTURE PRIMAIRE DE SNE

Dans cette première partie, nous avons étudié les effets de la roténone sur l'expression de l'alpha-synucléine dans un modèle de culture primaire des neurones du SNE, mis en place dans notre laboratoire. Différentes doses de roténone (de 0.1 à 10 nM) et différents temps d'exposition (de 1 à 10 jours) ont été utilisés.

1.1 Matériels et méthodes

1.1.1 Cultures primaires de SNE d'embryons de rat

Des rates gestantes (15 jours de gestation) de souche Sprague–Dawley (CERJ, Le Genest St Isle, France) étaient sacrifiées par inhalation de CO_2 et dislocation cervicale après anesthésie à l'isoflurane. Les embryons (E15) étaient récupérés et sacrifiés par décapitation. Les intestins étaient sortis de l'abdomen des embryons sous loupe binoculaire puis hachés finement en milieu HBSS (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). Les tissus fragmentés étaient repris dans 5 ml de milieu DMEM-F_{12} et digérés à 37°C pendant 15 min avec 0,1% (v/v) trypsine (Sigma). Cette digestion était arrêtée par ajout de 10 ml de milieu contenant 10% de sérum de vœu fœtal. La suspension était ensuite traitée avec de la DNAse I (0,01% Sigma) pendant 10 min à 37°C. Cette procédure était suivie de triturations mécaniques à l'aide d'une pipette de 10 ml. La suspension était alors centrifugée à 750 rpm pendant 10 minutes à température ambiante. Le culot était repris et les cellules comptées et ensemencées à une densité de 2.4×10^5 cellules/cm^2 dans une plaque 24 puits précédemment coatée pendant 6 heures avec une solution de gélatine à 0.5% (Sigma) dans du tampon phosphate salin (PBS) stérile. Apres 24 heures, le milieu était remplacé par un milieu sans sérum (DMEM-F_{12} contenant 1% de supplément N-2 (Life Technologies, Cergy Pontoise, France)). La moitié du milieu de culture était changé à J10 et l'expérience débutait le lendemain à J11. Plusieurs dilutions de roténone dans du milieu de culture ont été réalisées pour obtenir les concentrations suivantes : 0.1, 0.5, 1, 5 et 10 nM. Les cellules étaient incubées 24h et 10 jours. A la fin de l'expérience, l'analyse se faisait par immunohistochimie et par Western Blot.

1.1.2 Immunohistochimie

Après fixation dans du PBS contenant 4% (v/v) de paraformaldéhyde pendant 1h à température ambiante, les cellules étaient lavées par du PBS et ensuite perméabilisées pendant 30 minutes en PBS/NaN_3 contenant 0.5% (v/v) de Triton X-100 (Sigma) et 4% (v/v) de sérum de cheval (Millipore). Les cellules étaient alors incubées avec les anticorps primaires suivants: anti alpha-synucléine monoclonal de souris (1:1000; BD Biosciences) et anti-PGP 9.5 polyclonal de lapin (1:2000, Ultraclone Limited) dilués dans du PBS/NaN_3 contenant 0.5% (v/v) de Triton X-100 et 4% (v/v) de sérum de cheval, pendant 1h30 à température ambiante. Après incubation avec les anticorps primaires, les cellules étaient lavées avec du PBS et incubées avec les anticorps secondaires couplés aux fluorophores: anti souris-CY3 (1:500; Jackson Immunoresearch) ; anti lapin-FP488 (1:200, Interchim). Après incubation avec les anticorps secondaires, les cellules étaient lavées avec du PBS et conservées en PBS/NaN_3. Les images étaient acquises à l'aide d'une caméra numérique (DP71, Olympus, France) couplée à un microscope à fluorescence (Olympus IX 50) piloté avec le logiciel Cell B (Soft Imaging System, Olympus).

1.1.3 Western blot

Les cultures primaires du SNE étaient lysées à l'aide d'un tampon NETF (100 mM NaCl, 2 mM EGTA, 50 mM Tris–Cl, pH 7.4 et 50 mM NaF) contenant 1% (v/v) de Nonidet P-40, 2 mM d'orthovanadate de sodium, cocktail d'inhibiteurs de phosphatase II (Roche, Neuilly sur Seine, France) et cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche). Des quantités équivalentes de lysats étaient séparées par électrophorèse en utilisant des gels Bis Tris (NuPage Novex Bis Tris MiniGels, Invitrogen) avant d'être transférées sur membrane à l'aide du système iBlot Dry Blotting (Invitrogen). Les membranes étaient ensuite bloquées pendant 1 heure à température ambiante en tampon Tris-buffered-saline (TBS) (100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.5) avec 5% (W/v) de lait en poudre écrémé avant d'être incubées avec les anticorps primaires à 4°C pendant la nuit. Les anticorps secondaires, anti-lapin couplé à la peroxydase de Raifort (HRP) ou anti-mouse couplé à l'HRP (1:5000, Amersham, Les Ulis, France), étaient mis au contact des membranes pendant 1 heure à température ambiante. L'activité HRP étaient ensuite visualisée par chemiluminescence (ECL plus, Amersham).

1.2 Résultats

1.2.1 Effets de la roténone sur l'expression de l'alpha-synucléine dans les neurones de culture primaire de SNE

Les neurones entériques sont organisés en ganglions connectés par des fibres interganglionaires mises en évidence par un marquage PGP9.5 (figure 15). Après 24h de traitement par la roténone à 0.1 et 0.5 nM, les cellules ne montrent pas de signe de mort neuronale (figure 15 C, E) par rapport à la condition témoin (figure 15 A). En revanche à la dose de 10 nM, les ganglions commencent à se rétracter (figure 15 F). Dix jours après le début du traitement, le réseau neuronal est dégradé (disparition du marquage PGP9.5) notamment aux doses les plus élevées de roténone (0,5 et 10 nM) (figure 16 E, F).

L'expression de l'alpha-synucléine à 24h comme à 10 jours ne semble pas être modifiée par le traitement à la roténone même à des doses très élevées tant en immunohistochimie (figures 15 et 16 B, D, G et H) qu'en Western Blot (figures 15 et 16 I). De plus, la perte du marquage PGP9.5 devient importante après 10 jours du traitement et rend l'analyse d'image impossible à effectuer de manière correcte. Ces conditions ont été évaluées par Western Blot.

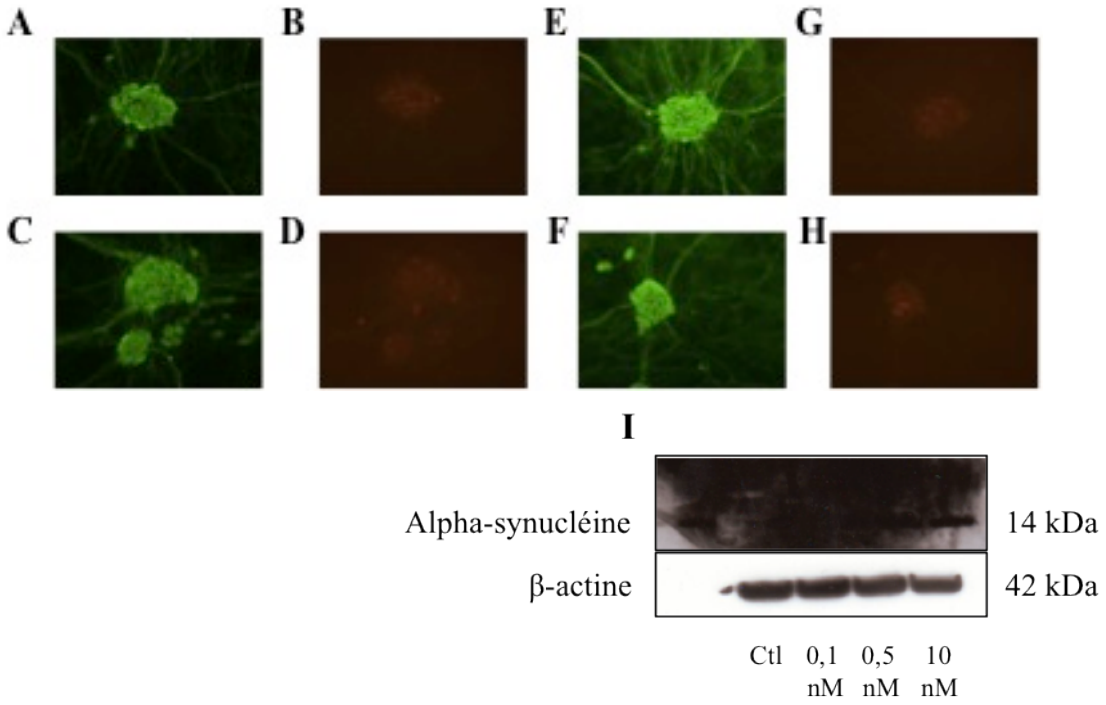


Figure 15 : culture primaire de SNE 24 heures après traitement à la roténone

Immunomarquages d'une culture primaire de SNE de rats traitée avec différentes doses de roténone : **A, B** : conditions témoins ; **C, D** : 0,1 nM; **E, G** : 0,5 nM et **F, H** : 10 nM de roténone. En vert, le marquage PGP9.5 (**A, C, E, F**) et en rouge le marquage alpha-synucléine (**B, D, G, H**). **I,** analyse en Western Blot effectuée après 24h de traitement à la roténone. La révélation se fait en utilisant des anticorps dirigés contre l'alpha-synucléine et la ß-actine.

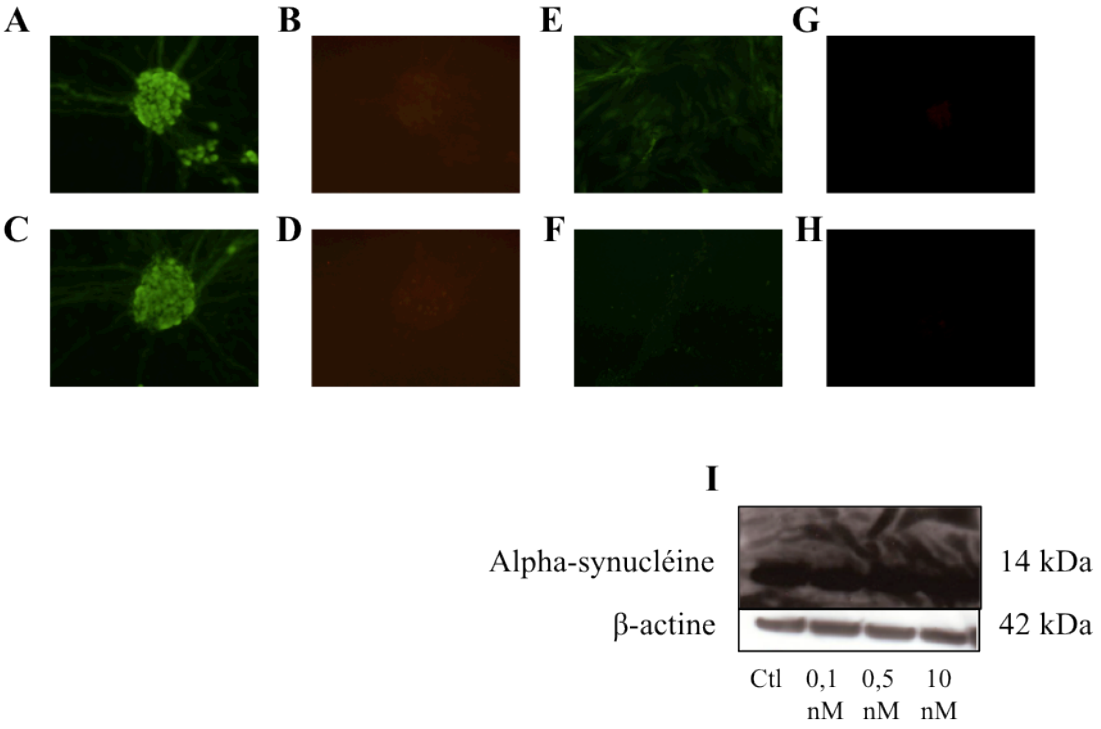


Figure 16 : culture primaire de SNE 10 jours après traitement avec roténone

Immunomarquages d'une culture primaire de SNE de rats traitée avec différentes doses de roténone : **A, B** : conditions témoins ; **C, D :** 0,1 nM; **E, G** : 0,5 nM et **F, H** : 10 nM de roténone.

En vert, marquage PGP9.5 (**A, C, E, F**) et en rouge le marquage alpha-synucléine (**B, D, G, H**). **I,** analyse en Western Blot effectuée après 10j de traitement à la roténone. La révélation se fait en utilisant des anticorps dirigés contre l'alpha-synucléine et la ß-actine.

2. EFFETS DE LA ROTENONE SUR LE SNE DANS UN MODELE ANIMAL

Dans cette étude publiée dans la revue « Neurogastroenterology & Motility» en 2013, nous avons montré que le système digestif et le SNE ne sont atteints que de façon mineure par rapport au SNC chez des souris intoxiquées par un gavage quotidien de roténone sur une période de 28 jours.

Si nous avons pu mettre en évidence une perte importante des neurones dopaminergiques de la SNPc, résultat qui confirme la validité de notre modèle par intoxication orale à la roténone, nous avons relevé en revanche que peu d'effets de la roténone sur les fonctions digestives. Les seules différences significatives sont la diminution de la production de selles associée à une diminution de l'expression de l'alpha-synucléine dans les neurones du jéjunum chez les animaux traités.

A l'heure actuelle, notre étude est la plus complète en terme de caractérisation de l'atteinte du SNE ainsi que de la physiologie digestive par une intoxication orale à la roténone.

DISCUSSION

Les objectifs de notre étude étaient d'analyser les effets de la roténone sur le SNE et les fonctions digestives, en utilisant un modèle de culture primaire de SNE de rat et un modèle d'intoxication orale chez la souris. Dans cette discussion, nous reviendrons en détail sur les différents points de l'étude que nous commenterons par rapport aux données existantes de la littérature.

Nous n'avons pas pu montrer de modification notable de l'expression de l'alpha-synucléine dans les neurones entériques en culture primaire même en utilisant de faibles concentrations de roténone (0.1 à 1 nM pendant 10 jours). Des concentrations plus élevées ont entrainé une désorganisation du réseau neuronal qui rendait délicate l'interprétation des immunomarquages alpha-synucléine. Ces résultats contrastent fortement avec ceux qui ont été obtenus dans des cultures primaires de neurones du SNC et dans des lignées neuronales. Un traitement chronique par 50 mM de roténone de lignées de neuroblastome SHSY-5Y entraine une accumulation progressive d'alpha-synucléine sur une période de 3 à 20 jours, avec un aspect très évocateur de prolongements de Lewy (219). Un traitement à faible concentration par la roténone (entre 0,5 et 1 nM) de cultures primaires de SNC de rat augmente l'expression intracellulaire d'alpha-synucléine sous forme d'agrégats (220). Une des limitations de nos expériences vient de l'interprétation des Western Blots qui était rendue difficile par l'importance du bruit de fond et la difficulté à individualiser l'immunoréactivité alpha-synucléine. Depuis nos expériences, il a été montré que la détection de l'alpha-synucléine par immunoblot était délicate car la protéine se fixait peu sur la membrane de nitrocellulose ou de PVDF et qu'il était nécessaire de bloquer la membrane après transfert en présence de paraformaldéhyde ou du cross linker DSP afin d'augmenter le signal (221,222). Il serait donc intéressant de réaliser de nouveau nos expériences en optimisant le transfert et la fixation de l'alpha-synucléine lors de nos expériences d'immunoblot.

Les résultats relativement décevants obtenus dans le modèle de culture primaire nous ont incité à nous tourner rapidement vers une approche *in vivo* en utilisant un modèle animal d'intoxication orale à la roténone. Nous avons montré qu'un traitement par voie orale à la roténone pendant 28 jours n'entrainait que peu de modifications des fonctions digestives et du SNE. Sur l'ensemble des tests effectués au niveau digestif, aucune dysfonction importante n'a été mise en évidence entre nos groupes d'animaux. La seule anomalie que nous avons pu observer est une diminution du nombre de selles chez les souris traitées sans changement du pourcentage d'humidité. Ceci pourrait être la conséquence des lésions du niveau du SNC et en particulier, à la perte des neurones dopaminergiques dans la SNpc qui était observée chez nos souris. Des données récentes obtenues après injection unilatérale de 6-hydroxydopamine dans le striatum de rat viennent conforter cette hypothèse puisque ces animaux ont une réduction du nombre de selles d'environ 60% (223). Cet effet sur la motricité digestive s'accompagnait d'une diminution du

nombre de neurones nitrergiques dans le plexus myentérique de l'iléon proximal et du côlon distal. Nous n'avons en revanche pas observé de changements du phénotype neuronal chez nos animaux traités à la roténone. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les changements neurochimiques dans le SNE sont trop peu importants ou trop précoces pour être détectés ou que ces changements toucheraient d'autres populations impliquées dans le contrôle de la motilité, comme le vasointestinal peptide (VIP) ou la substance P (SP).

A notre connaissance, seulement deux autres études se sont intéressées aux fonctions digestives après traitement par la roténone. En 2009, Greene *et al.* ont étudié le SNE et les fonctions digestives chez le rat après 22 à 28 jours d'injection systémique de roténone (175). Ils ont noté un retard dans la vidange gastrique et une diminution de la quantité des selles, sans qu'il y ait de perte neuronale digestive ni de modification du phénotype neurochimique (224). Dans une étude du groupe de Greenamyre, des rats ont reçu une injection intrapéritonéale pendant 6 semaines et la motilité GI a été évaluée de 3 jours à 6 mois de la fin du traitement observant une légère diminution seulement après 6 mois. Ces données et nos résultats montrent que les modèles d'intoxication à la roténone, qu'ils soient par gavage ou systémique ne reproduisent pas les troubles digestifs du patient parkinsonien (225)

Un point important dans notre étude, était d'évaluer l'intégrité de la BEI. Notre étude est en effet la première qui s'intéresse à la perméabilité intestinale dans un modèle animal de MP. Ceci nous semble essentiel dans ce contexte puisqu'elle pourrait être impliquée dans le développement de la MP. Braak a en effet suggéré que le processus pathologique de la MP pourrait débuter au niveau digestif. Un pathogène, en créant une brèche dans la BEI déclencherait le processus pathologique dans les neurones entériques du plexus sous-muqueux, processus qui gagnerait ensuite le SNC via l'innervation vagale (9). Deux études récentes sont venues renforcer cette hypothèse en montrant que les patients parkinsoniens ont une perméabilité digestive plus forte que les patients contrôles (204,214).

Nous avons observé une diminution de l'immunoréactivité de l'alpha-synucléine dans le SNE de nos souris traitées à la roténone. Une telle diminution avait aussi été observée par Drolet et al. dans l'iléon de leurs souris après injection de roténone Dans notre étude, nous avons mis en évidence une diminution importante de l'expression de l'alpha-synucléine dans le plexus myentérique du jéjunum des animaux traités avec le pesticide mais nous n'avons pas observé la présence de corps de Lewy. On peut émettre l'hypothèse que cela soit dû au fait que notre analyse ait été effectuée dès la fin du traitement à la roténone. Actuellement, nous ne pouvons pas exclure la possibilité qu'une analyse à plus long terme aurait pu montrer la présence d'agrégats d'alpha-synucléine.

Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que le SNE serait plus résistant à la roténone que le SNC et que le modèle d'intoxication à la roténone par gavage que nous avons mis en place ne permet pas de reproduire les anomalies digestives rencontrées chez le patient parkinsonien. En perspective, il nous semblerait intéressant d'utiliser le gavage à la roténone dans un modèle génétique murin de MP afin d'essayer de modéliser au mieux l'atteinte digestive de la MP.

PARTICIPATION A DES TRAVAUX TIERS

BIBLIOGRAPHIE

1. Nussbaum RL, Ellis CE. Alzheimer“s disease and Parkinson”s disease. N Engl J Med. 2003 Apr 3;348(14):1356–64.

2. de Rijk MC, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, Baldereschi M, et al. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Neurology. 2000;54(11 Suppl 5):S21–3.

3. de Lau LML, Breteler MMB. Epidemiology of Parkinson's disease. Lancet Neurol. 2006 Jun;5(6):525–35.

4. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. J Neurol. 2008.

5. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. Neuron. 2003 Sep 11;39(6):889–909.

6. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. Nature. 1997 Aug 28;388(6645):839–40.

7. Benarroch EE. Enteric nervous system: functional organization and neurologic implications. Neurology. 2007 Nov 13;69(20):1953–7.

8. Beach TG, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue LF. Multi-organ distribution of phosphorylated α-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. Acta …. 2010.

9. Braak H, de Vos RAI, Bohl J, Del Tredici K. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach‘s plexuses in cases staged for Parkinson’s disease-related brain pathology. Neuroscience Letters. 2006 Mar 20;396(1):67–72.

10. Aarsland D, Larsen JP, Tandberg E. Predictors of nursing home placement in Parkinson's disease: a population-based, prospective study. Journal of the American …. 2000.

11. Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM, et al. Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. Psychiatry Research: Neuroimaging. 1979 Nov 30;1(3):249–54.

12. Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. Neuropathol Appl Neurobiol. 2007 Dec;33(6):599–614.

13. Regnault-Roger C, Philogène B, Vincent C. Biopesticides d'origine végétale. Tec & Doc Lavoisier; 2008.

14. Bibliographie de la protection des plantes. 1958.

15. Hisata JS. Lake and stream rehabilitation: rotenone use and health risks. … impact statement Washington Department of Fish …. 2002.

16. The Pesticide Manual. 1994.

17. Couteux A, Lejeune V, Collectif. Index phytosanitaire ACTA. 2004.

18. Talpade DJ, Greene JG, Higgins DS, Greenamyre JT. In vivo labeling of mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) in rat brain using [(3)H]dihydrorotenone.

J. Neurochem. 2000 Dec;75(6):2611–21.

19. Chaturvedi RK, Flint Beal M. Mitochondrial diseases of the brain. Free Radical Biology and Medicine. 2013 Oct;63:1–29.

20. Schuler F, Casida JE. The insecticide target in the PSST subunit of complex I. Pest Manag. Sci. 2001 Oct;57(10):932–40.

21. Hatefi YY. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. Biochemistry. 1984 Dec 31;54:1015–69.

22. Fontaine EE, Eriksson OO, Ichas FF, Bernardi PP. Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation By electron flow through the respiratory chain complex i. J. Biol. Chem. 1998 May 14;273(20):12662–8.

23. Feldkamp T, Kribben A. Assessment of mitochondrial membrane potential in proximal tubules after hypoxia-reoxygenation. American Journal of …. 2005.

24. Bao L, Avshalumov MV, Rice ME. Partial mitochondrial inhibition causes striatal dopamine release suppression and medium spiny neuron depolarization via H2O2 elevation, not ATP depletion. The Journal of neuroscience. 2005.

25. Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Nature. 2006 Oct 19;443(7113):787–95.

26. Hensley K, Pye QN, Maidt ML. … of α-Phenyl-N-tert-Butyl Nitrone and Alternative Electron Acceptors with Complex I Indicates a Substrate Reduction Site Upstream from the Rotenone Binding Site. Journal of …. 1998.

27. Kushnareva YY, Murphy ANA, Andreyev AA. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)+ oxidation-reduction state. Biochem. J. 2002 Nov 30;368(Pt 2):545–53.

28. Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim J-H, et al. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. Journal of Neuroscience. 2003 Nov 26;23(34):10756–64.

29. Duan W, Rangnekar VM. Prostate Apoptosis Response-4 Production in Synaptic Compartments Following Apoptotic and Excitotoxic Insults. Journal of …. 1999.

30. Mattson MP, Duan W. “Apoptotic” biochemical cascades in synaptic compartments: Roles in adaptive plasticity and neurodegenerative disorders. J. Neurosci. Res. 1999 Sep 30;58(1):152–66.

31. Kiechle FLF, Zhang XX. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. Clin. Chim. Acta. 2002 Nov 30;326(1-2):27–45.

32. Ueda S, Masutani H, Nakamura H, Tanaka T, Ueno M, Yodoi J. Redox control of cell death. Antioxidants & Redox Signaling. 2002 May 31;4(3):405–14.

33. Ahmadi FA, Linseman DA. The pesticide rotenone induces caspase-3-mediated apoptosis in ventral mesencephalic dopaminergic neurons. Journal of …. 2003.

34. Watabe M, Nakaki T. Rotenone induces apoptosis via activation of bad in human

dopaminergic SH-SY5Y cells. Journal of Pharmacology and Experimental …. 2004.

35. Radad K, Rausch WD, Gille G. Rotenone induces cell death in primary dopaminergic culture by increasing ROS production and inhibiting mitochondrial respiration. Neurochemistry International. 2006.

36. Xiong Y, Ding H, Xu M, Gao J. Protective effects of asiatic acid on rotenone- or H2O2-induced injury in SH-SY5Y cells. Neurochem Res. 2009 Apr;34(4):746–54.

37. Stokes AH, Hastings TG, Vrana KE. Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. J. Neurosci. Res. 1999 Mar 14;55(6):659–65.

38. Sakka NN, Sawada HH, Izumi YY, Kume TT, Katsuki HH, Kaneko SS, et al. Dopamine is involved in selectivity of dopaminergic neuronal death by rotenone. Neuroreport. 2003 Dec 18;14(18):2425–8.

39. Sjoerdsma A, Engelman K, Spector S, Udenfriend S. Inhibition of catecholamine synthesis in man with alpha-methyl-tyrosine, an inhibitor of tyrosine hydroxylase. Lancet. 1965 Nov 26;2(7422):1092–4.

40. Marshall LE, Himes RH. Rotenone inhibition of tubulin self-assembly. Biochim. Biophys. Acta. 1978 Nov 1;543(4):590–4.

41. Brinkley BR, Barham SS, Barranco SC, Fuller GM. Rotenone inhibition of spindle microtubule assembly in mammalian cells. Experimental Cell Research. 1974 Mar 30;85(1):41–6.

42. Sherer TB, Betarbet R, Greenamyre JT. Environment, mitochondria, and Parkinson's disease. Neuroscientist. 2002 Jun;8(3):192–7.

43. Ren Y, Liu W, Jiang H, Jiang Q, Feng J. Selective vulnerability of dopaminergic neurons to microtubule depolymerization. J. Biol. Chem. 2005 Oct 7;280(40):34105–12.

44. Lewy FH. [CITATION][C]. Handbuch der neurologie. 1912.

45. 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. 2000 Dec;3(12):1301–6.

46. Sherer TB, Kim J-H, Betarbet R, Greenamyre JT. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. Experimental Neurology. 2003 Jan;179(1):9–16.

47. Jakes R, Spillantini MG, Goedert M. Identification of two distinct synucleins from human brain. FEBS Letters. 1994 May 23;345(1):27–32.

48. Lavedan C, Leroy E, Dehejia A, Buchholtz S, Dutra A, Nussbaum RL, et al. Identification, localization and characterization of the human gamma-synuclein gene. Hum. Genet. 1998 Jul;103(1):106–12.

49. Weinreb PH, Zhen W, Poon AW, Conway KA, Lansbury PT. NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. Biochemistry. 1996 Oct 29;35(43):13709–15.

50. Sandal M, Valle F, Tessari I, Mammi S, Bergantino E, Musiani F, et al. Conformational equilibria in monomeric alpha-synuclein at the single-molecule level. PLoS Biol. 2008 Jan;6(1):e6.

51. Hashimoto M, Hsu LJ, Sisk A, Xia Y, Takeda A, Sundsmo M, et al. Human recombinant NACP/alpha-synuclein is aggregated and fibrillated in vitro: relevance for Lewy body disease. Brain Research. 1998 Jul 20;799(2):301–6.

52. Conway KA, Harper JD, Lansbury PT. Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. Nat Med. 1998 Nov;4(11):1318–20.

53. Uversky VN, Li J, Fink AL. Pesticides directly accelerate the rate of alpha-synuclein fibril formation: a possible factor in Parkinson's disease. FEBS Letters. 2001 Jul 5;500(3):105–8.

54. El-Agnaf OM, Jakes R, Curran MD, Middleton D, Ingenito R, Bianchi E, et al. Aggregates from mutant and wild-type alpha-synuclein proteins and NAC peptide induce apoptotic cell death in human neuroblastoma cells by formation of beta-sheet and amyloid-like filaments. FEBS Letters. 1998 Nov 27;440(1-2):71–5.

55. Crowther RA, Jakes R, Spillantini MG, Goedert M. Synthetic filaments assembled from C-terminally truncated alpha-synuclein. FEBS Letters. 1998 Oct 9;436(3):309–12.

56. Giasson BI, Uryu K, Trojanowski JQ, Lee VM. Mutant and wild type human alpha-synucleins assemble into elongated filaments with distinct morphologies in vitro. J. Biol. Chem. 1999 Mar 19;274(12):7619–22.

57. Narhi L, Wood SJ, Steavenson S, Jiang Y, Wu GM, Anafi D, et al. Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation. J. Biol. Chem. 1999 Apr 2;274(14):9843–6.

58. Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, Priyadarshi SS. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. Environmental Research. 2001 Jun;86(2):122–7.

59. Moisan F. Prévalence et facteurs de risque professionnels de la maladie de Parkinson parmi les affiliés à la Mutualité Sociale Agricole. 2011.

60. Ritz B, Yu F. Parkinson's disease mortality and pesticide exposure in California 1984-1994. Int J Epidemiol. 2000 Apr;29(2):323–9.

61. Bhatt MHM, Elias MAM, Mankodi AKA. Acute and reversible parkinsonism due to organophosphate pesticide intoxication: five cases. Neurology. 1999 Apr 21;52(7):1467–71.

62. Meco GG, Bonifati VV, Vanacore NN, Fabrizio EE. Parkinsonism after chronic exposure to the fungicide maneb (manganese ethylene-bis-dithiocarbamate). Scand J Work Environ Health. 1994 Jul 31;20(4):301–5.

63. Sechi GPG, Agnetti VV, Piredda MM, Canu MM, Deserra FF, Omar HAH, et al. Acute and persistent parkinsonism after use of diquat. Neurology. 1991 Dec 31;42(1):261–3.

64. Müller-Vahl KRK, Kolbe HH, Dengler RR. Transient severe parkinsonism after acute organophosphate poisoning. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry. 1999 Jan

31;66(2):253–4.

65. Bocchetta AA, Corsini GUG. Parkinson's disease and pesticides. Lancet. 1986 Nov 14;2(8516):1163–3.

66. Sanchez-Ramos JRJ, Hefti FF, Weiner WJW. Paraquat and Parkinson's disease. Neurology. 1987 Mar 31;37(4):728–8.

67. Wirdefeldt KK, Adami H-OH, Cole PP, Trichopoulos DD, Mandel JJ. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. Eur J Epidemiol. 2011 May 31;26 Suppl 1:S1–58.

68. Zorzon MM, Capus LL, Pellegrino AA, Cazzato GG, Zivadinov RR. Familial and environmental risk factors in Parkinson's disease: a case-control study in north-east Italy. Acta Neurol Scand. 2002 Jan 31;105(2):77–82.

69. Seidler A, Hellenbrand W, Robra BP, Vieregge P, Nischan P, Joerg J, et al. Possible environmental, occupational, and other etiologic factors for Parkinson's disease: a case-control study in Germany. Neurology. 1996 May;46(5):1275–84.

70. Duzcan F, Zencir M, Ozdemir F, Cetin GO, Bagci H, Heutink P, et al. Familial influence on parkinsonism in a rural area of Turkey (Kizilcaboluk-Denizli): a community-based case-control study. Mov Disord. 2003 Jul;18(7):799–804.

71. Golbe LI, Farrell TM, Davis PH. Follow-up study of early-life protective and risk factors in Parkinson's disease. Mov Disord. 1990;5(1):66–70.

72. Semchuk KM, Love EJ, Lee RG. Parkinson's disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals. Neurology. 1992 Jun 30;42(7):1328–35.

73. Hubble JP, Cao T, Hassanein RE, Neuberger JS, Koller WC. Risk factors for Parkinson's disease. Neurology. 1993 Sep;43(9):1693–7.

74. Hertzman C, Wiens M, Snow B, Kelly S, Calne D. A case-control study of Parkinson's disease in a horticultural region of British Columbia. Mov Disord. 1993 Dec 31;9(1):69–75.

75. Liou HHH, Tsai MCM, Chen CJC, Jeng JSJ, Chang YCY, Chen SYS, et al. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. Neurology. 1997 May 31;48(6):1583–8.

76. Menegon AA, Board PGP, Blackburn ACA, Mellick GDG, Le Couteur DGD. Parkinson's disease, pesticides, and glutathione transferase polymorphisms. Lancet. 1998 Oct 23;352(9137):1344–6.

77. Fall PA, Fredrikson M, Axelson O, Granérus AK. Nutritional and occupational factors influencing the risk of Parkinson's disease: a case-control study in southeastern Sweden. Mov Disord. 1999 Jan;14(1):28–37.

78. Baldereschi MM, Di Carlo AA, Vanni PP, Ghetti AA, Carbonin PP, Amaducci LL, et al. Lifestyle-related risk factors for Parkinson's disease: a population-based study. Acta Neurol Scand. 2003 Sep 30;108(4):239–44.

79. Baldi I, Cantagrel A, Lebailly P, Tison F, Dubroca B, Chrysostome V, et al. Association

between Parkinson's disease and exposure to pesticides in southwestern France. Neuroepidemiology. 2003 Sep;22(5):305–10.

80. Galanaud J-PJ, Elbaz AA, Clavel JJ, Vidal J-SJ, Corrèze J-RJ, Alpérovitch AA, et al. Cigarette smoking and Parkinson's disease: a case-control study in a population characterized by a high prevalence of pesticide exposure. Mov Disord. 2005 Jan 31;20(2):181–9.

81. Frigerio R, Sanft KR, Grossardt BR, Peterson BJ, Elbaz A, Bower JH, et al. Chemical exposures and Parkinson's disease: a population-based case-control study. Mov Disord. 2006 Oct;21(10):1688–92.

82. Dick FDF, De Palma GG, Ahmadi AA, Scott NWN, Prescott GJG, Bennett JJ, et al. Environmental risk factors for Parkinson's disease and parkinsonism: the Geoparkinson study. Audio, Transactions of the IRE Professional Group on. 2007 Sep 30;64(10):666–72.

83. Dhillon AS, Tarbutton GL, Levin JL, Plotkin GM, Lowry LK, Nalbone JT, et al. Pesticide/environmental exposures and Parkinson's disease in East Texas. J Agromedicine. 2007 Dec 31;13(1):37–48.

84. Hancock DB, Martin ER, Mayhew GM, Stajich JM, Jewett R, Stacy MA, et al. Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease: a family-based case-control study. BMC Neurol. 2008;8:6.

85. Ho SCS, Woo JJ, Lee CMC. Epidemiologic study of Parkinson's disease in Hong Kong. Neurology. 1989 Sep 30;39(10):1314–8.

86. Tanner CM, Ross GW, Jewell SA, Hauser RA, Jankovic J, Factor SA, et al. Occupation and risk of parkinsonism: a multicenter case-control study. Arch. Neurol. 2009 Aug 31;66(9):1106–13.

87. Taylor CAC, Saint-Hilaire MHM, Cupples LAL, Thomas CAC, Burchard AEA, Feldman RGR, et al. Environmental, medical, and family history risk factors for Parkinson's disease: a New England-based case control study. Am J Med Genet A. 1999 Dec 14;88(6):742–9.

88. Preux PM, Condet A, Anglade C, Druet-Cabanac M, Debrock C, Macharia W, et al. Parkinson's disease and environmental factors. Matched case-control study in the Limousin region, France. Neuroepidemiology. 2000 Nov;19(6):333–7.

89. Herishanu YO, Medvedovski M, Goldsmith JR, Kordysh E. A case-control study of Parkinson's disease in urban population of southern Israel. Can J Neurol Sci. 2001 May;28(2):144–7.

90. McCann SJS, LeCouteur DGD, Green ACA, Brayne CC, Johnson AGA, Chan DD, et al. The epidemiology of Parkinson's disease in an Australian population. Neuroepidemiology. 1997 Dec 31;17(6):310–7.

91. Morano AA, Jiménez-Jiménez FJF, Molina JAJ, Antolín MAM. Risk-factors for Parkinson's disease: case-control study in the province of Cáceres, Spain. Acta Neurol Scand. 1994 Feb 28;89(3):164–70.

92. Werneck AL, Alvarenga H. Genetics, drugs and environmental factors in Parkinson's disease. A case-control study. Arq Neuropsiquiatr. 1999 Jun;57(2B):347–55.

93. Chan DK, Woo J, Ho SC, Pang CP, Law LK, Ng PW, et al. Genetic and environmental risk factors for Parkinson's disease in a Chinese population. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry. 1998 Oct 31;65(5):781–4.

94. Koller W, Vetere-Overfield B, Gray C, Alexander C, Chin T, Dolezal J, et al. Environmental risk factors in Parkinson's disease. Neurology. 1990 Jul 31;40(8):1218–21.

95. Wechsler LS, Checkoway H, Franklin GM, Costa LG. A pilot study of occupational and environmental risk factors for Parkinson's disease. NeuroToxicology. 1991;12(3):387–92.

96. Jiménez FJ, Mateo D. Exposure to well water and pesticides in Parkinson's disease: A case-control study in the madrid area. Movement …. 1992.

97. Chaturvedi S, Ostbye T, Stoessl AJ, Merskey H, Hachinski V. Environmental exposures in elderly Canadians with Parkinson's disease. Can J Neurol Sci. 1995 Aug;22(3):232–4.

98. Smargiassi AA, Mutti AA, De Rosa AA, De Palma GG, Negrotti AA, Calzetti SS. A case-control study of occupational and environmental risk factors for Parkinson's disease in the Emilia-Romagna region of Italy. NeuroToxicology. 1998 Jul 31;19(4-5):709–12.

99. Dong J-Q, Zhang Z-X, Zhang K-L. Parkinson“s disease and smoking: an integral part of PD”s etiological study. Biomed. Environ. Sci. 2003 Jun;16(2):173–9.

100. Nuti AA, Ceravolo RR, Dell'Agnello GG, Gambaccini GG, Bellini GG, Kiferle LL, et al. Environmental factors and Parkinson's disease: a case-control study in the Tuscany region of Italy. Parkinsonism and realted Disorders. 2004 Nov 30;10(8):5–5.

101. Wright JM, Keller-Byrne J. Environmental determinants of Parkinson's disease. Arch Environ Occup Health. 2005 Jan;60(1):32–8.

102. Petersen MS, Halling J, Bech S, Wermuth L, Weihe P, Nielsen F, et al. Impact of dietary exposure to food contaminants on the risk of Parkinson's disease. CORD Conference Proceedings. 2008 Jun 30;29(4):584–90.

103. Wong GF, Gray CS, Hassanein RS, Koller WC. Environmental risk factors in siblings with Parkinson's disease. Arch. Neurol. 1991 Feb 28;48(3):287–9.

104. Kuopio AM, Marttila RJ, Helenius H, Rinne UK. Environmental risk factors in Parkinson's disease. Mov Disord. 1999 Nov;14(6):928–39.

105. Firestone JAJ, Smith-Weller TT, Franklin GG, Swanson PP, Longstreth WTW, Checkoway HH. Pesticides and risk of Parkinson disease: a population-based case-control study. Arch. Neurol. 2004 Dec 31;62(1):91–5.

106. Firestone JA, Lundin JI, Powers KM, Smith-Weller T, Franklin GM, Swanson PD, et al. Occupational factors and risk of Parkinson's disease: A population-based case-control study. Am. J. Ind. Med. 2010 Mar;53(3):217–23.

107. Elbaz A, Clavel J, Rathouz PJ, Moisan F, Galanaud J-P, Delemotte B, et al. Professional exposure to pesticides and Parkinson disease. Ann Neurol. 2009 Oct;66(4):494–504.

108. Tanner CM, Kamel F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, et al. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. Environ Health Perspect. 2011 Jun;119(6):866–72.

109. Butterfield PG, Valanis BG, Spencer PS, Lindeman CA, Nutt JG. Environmental antecedents of young-onset Parkinson's disease. Neurology. 1993 May 31;43(6):1150–8.

110. Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Richardson RJ. The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. Neurology. 1998 May;50(5):1346–50.

111. Behari MM, Srivastava AKA, Das RRR, Pandey RMR. Risk factors of Parkinson's disease in Indian patients. Journal of the Neurological Sciences. 2001 Sep 14;190(1-2):49–55.

112. Stern M, Dulaney E, Gruber SB, Golbe L, Bergen M, Hurtig H, et al. The epidemiology of Parkinson's disease. A case-control study of young-onset and old-onset patients. Arch. Neurol. 1991 Sep;48(9):903–7.

113. Gorell JM, Peterson EL, Rybicki BA, Johnson CC. Multiple risk factors for Parkinson's disease. Journal of the Neurological Sciences. 2004 Feb 14;217(2):169–74.

114. Petrovitch H, Ross GW, Abbott RD, Sanderson WT, Sharp DS, Tanner CM, et al. Plantation work and risk of Parkinson disease in a population-based longitudinal study. Arch. Neurol. 2002 Nov;59(11):1787–92.

115. Baldi I, Lebailly P, Mohammed-Brahim B, Letenneur L, Dartigues J-F, Brochard P. Neurodegenerative diseases and exposure to pesticides in the elderly. American Journal of Epidemiology. 2003 Mar 1;157(5):409–14.

116. Ascherio A, Chen H, Weisskopf MG, O'Reilly E, McCullough ML, Calle EE, et al. Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. Ann Neurol. 2006 Aug;60(2):197–203.

117. Weisskopf MGM, Knekt PP, O'Reilly EJE, Lyytinen JJ, Reunanen AA, Laden FF, et al. Persistent organochlorine pesticides in serum and risk of Parkinson disease. Neurology. 2010 Mar 29;74(13):1055–61.

118. Kamel FF, Tanner CC, Umbach DD, Hoppin JJ, Alavanja MM, Blair AA, et al. Pesticide exposure and self-reported Parkinson's disease in the agricultural health study. American Journal of Epidemiology. 2007 Feb 14;165(4):364–74.

119. Heikkila RE, Nicklas WJ, Vyas I, Duvoisin RC. Dopaminergic toxicity of rotenone and the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion after their stereotaxic administration to rats: implication for the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. Neuroscience Letters. 1985 Dec 18;62(3):389–94.

120. Alam M, Mayerhofer A, Schmidt WJ. The neurobehavioral changes induced by bilateral rotenone lesion in medial forebrain bundle of rats are reversed by L-DOPA. Behavioural Brain Research. 2004 May 5;151(1-2):117–24.

121. Saravanan KS, Sindhu KM, Mohanakumar KP. Acute intranigral infusion of rotenone in rats causes progressive biochemical lesions in the striatum similar to Parkinson's disease. Brain Research. 2005 Jul 12;1049(2):147–55.

122. Santiago RM, Barbieiro J, Lima MMS, Dombrowski PA, Andreatini R, Vital MABF. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. 2010 Aug 16;34(6):1104–14.

123. Cannon JR, Tapias V, Na H-M, Honick AS, Drolet RE, Greenamyre JT. A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. Neurobiology of Disease. 2009 May;34(2):279–90.

124. Bashkatova V, Alam M, Vanin A, Schmidt WJ. Chronic administration of rotenone increases levels of nitric oxide and lipid peroxidation products in rat brain. Experimental Neurology. 2004 Apr;186(2):235–41.

125. Biehlmaier O, Alam M, Schmidt WJ. A rat model of Parkinsonism shows depletion of dopamine in the retina. Neurochemistry International. 2007 Jan;50(1):189–95.

126. Fleming SM, Zhu C, Fernagut P-O, Mehta A, Dicarlo CD, Seaman RL, et al. Behavioral and immunohistochemical effects of chronic intravenous and subcutaneous infusions of varying doses of rotenone. Experimental Neurology. 2004 Jun;187(2):418–29.

127. Ferrante RJ, Schulz JB, Kowall NW, Beal MF. Systemic administration of rotenone produces selective damage in the striatum and globus pallidus, but not in the substantia nigra. Brain Research. 1997 Apr 3;753(1):157–62.

128. Rojo AI, Cavada C, de Sagarra MR, Cuadrado A. Chronic inhalation of rotenone or paraquat does not induce Parkinson's disease symptoms in mice or rats. Experimental Neurology. 2007 Nov;208(1):120–6.

129. Corona JC, Giménez-Cassina A, Lim F, Díaz-Nido J. Hexokinase II gene transfer protects against neurodegeneration in the rotenone and MPTP mouse models of Parkinson's disease. J. Neurosci. Res. 2010 Jul;88(9):1943–50.

130. Thiffault C, Langston JW, Di Monte DA. Increased striatal dopamine turnover following acute administration of rotenone to mice. Brain Research. 2000 Dec 8;885(2):283–8.

131. Inden M, Kitamura Y, Takeuchi H, Yanagida T, Takata K, Kobayashi Y, et al. Neurodegeneration of mouse nigrostriatal dopaminergic system induced by repeated oral administration of rotenone is prevented by 4-phenylbutyrate, a chemical chaperone. J. Neurochem. 2007 Jun;101(6):1491–504.

132. Inden Y, Ito R, Yoshida N, Kamiya H, Kitamura K, Kitamura T, et al. Combined assessment of left ventricular dyssynchrony and contractility by speckled tracking strain imaging: a novel index for predicting responders to cardiac resynchronization therapy. Heart Rhythm. 2010 May;7(5):655–61.

133. Smeyne RJR, Jackson-Lewis VV. The MPTP model of Parkinson's disease. Brain Res. Mol. Brain Res. 2005 Mar 23;134(1):57–66.

134. Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH. Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1985 Apr;82(7):2173–7.

135. Saura J, Bleuel Z, Ulrich J, Mendelowitsch A, Chen K, Shih JC, et al. Molecular neuroanatomy of human monoamine oxidases A and B revealed by quantitative enzyme radioautography and in situ hybridization histochemistry. NSC. 1996 Feb;70(3):755–74.

136. Markey SP, Johannessen JN, Chiueh CC, Burns RS, Herkenham MA. Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. Nature. 1984 Oct 3;311(5985):464–7.

137. Langston JWJ, Irwin II, Langston EBE, Forno LSL. Pargyline prevents MPTP-induced parkinsonism in primates. Science. 1984 Sep 27;225(4669):1480–2.

138. Nicklas WJW, Vyas II, Heikkila RER. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. Life Sciences. 1985 Jun 30;36(26):2503–8.

139. Tipton KFK, Singer TPT. Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds. J. Neurochem. 1993 Sep 30;61(4):1191–206.

140. Langston JWJ, Forno LSL, Tetrud JJ, Reeves AGA, Kaplan JAJ, Karluk DD. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. Ann Neurol. 1999 Sep 30;46(4):598–605.

141. Bezard E, Imbert C, Deloire X, Bioulac B, Gross CE. A chronic MPTP model reproducing the slow evolution of Parkinson's disease: evolution of motor symptoms in the monkey. Brain Research. 1997 Aug 22;766(1-2):107–12.

142. Bezard E, Ferry S, Mach U, Stark H, Leriche L, Boraud T, et al. Attenuation of levodopa-induced dyskinesia by normalizing dopamine D3 receptor function. Nat Med. 2003 Jun;9(6):762–7.

143. fornai F, Giorgi FS, Bassi L, Ferrucci M, Alessandrì MG, Corsini GU. Modulation of dihydroxyphenylacetaldehyde extracellular levels in vivo in the rat striatum after different kinds of pharmacological treatment. Brain Research. 2000 Apr 7;861(1):126–34.

144. Yazdani U, German DC, Liang CL, Manzino L, Sonsalla PK, Zeevalk GD. Rat model of Parkinson's disease: chronic central delivery of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+). Experimental Neurology. 2006 Jul;200(1):172–83.

145. Fornai F, Schlüter OM, Lenzi P, Gesi M, Ruffoli R, Ferrucci M, et al. Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2005 Mar 1;102(9):3413–8.

146. Forno LSL, Langston JWJ, DeLanney LEL, Irwin II, Ricaurte GAG. Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys. Ann Neurol. 1986 Sep 30;20(4):449–55.

147. Przedborski SS, Jackson-Lewis VV, Naini ABA, Jakowec MM, Petzinger GG, Miller RR, et al. The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. J. Neurochem. 2001 Feb 28;76(5):1265–74.

148. Petzinger GM, Langston JW. [CITATION][C]. Advances in neurodegenerative disease.

1998.

149. Bankiewicz KSK, Oldfield EHE, Chiueh CCC, Doppman JLJ, Jacobowitz DMD, Kopin IJI. Hemiparkinsonism in monkeys after unilateral internal carotid artery infusion of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Life Sciences. 1986 Jul 6;39(1):7–16.

150. Schneider JS, Roeltgen DP. Delayed matching-to-sample, object retrieval, and discrimination reversal deficits in chronic low dose MPTP-treated monkeys. Brain Research. 1993 Jul 2;615(2):351–4.

151. Schneider JSJ, Tinker JPJ, Van Velson MM, Menzaghi FF, Lloyd GKG. Nicotinic acetylcholine receptor agonist SIB-1508Y improves cognitive functioning in chronic low-dose MPTP-treated monkeys. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 1999 Jul 31;290(2):731–9.

152. Kopin IJ, Markey SP. MPTP toxicity: implications for research in Parkinson's disease. Annu. Rev. Neurosci. 1988;11(1):81–96.

153. Heikkila RER, Sieber BAB, Manzino LL, Sonsalla PKP. Some features of the nigrostriatal dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse. Neurochem Pathol. 1989 May 31;10(3):171–83.

154. Przedborski S, Jackson-Lewis V, Djaldetti R, Liberatore G, Vila M, Vukosavic S, et al. The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism. Restor Neurol Neurosci. 1999 Dec 31;16(2):135–42.

155. Sonsalla PKP, Heikkila RER. The influence of dose and dosing interval on MPTP-induced dopaminergic neurotoxicity in mice. European Journal of Pharmacology. 1986 Oct 6;129(3):339–45.

156. Giovanni AA, Sieber BAB, Heikkila RER, Sonsalla PKP. Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 1: Systemic administration. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 1994 Aug 31;270(3):1000–7.

157. Giovanni AA, Sonsalla PKP, Heikkila RER. Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 2: Central administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 1994 Aug 31;270(3):1008–14.

158. Storey E, Hyman BT, Jenkins B. 1-Methyl-4-Phenylpyridinium Produces Excitotoxic Lesions in Rat Striatum as a Result of Impairment of Oxidative Metabolism. Journal of …. 1992.

159. Staal RGR, Hogan KAK, Liang CLC, German DCD, Sonsalla PKP. In vitro studies of striatal vesicles containing the vesicular monoamine transporter (VMAT2): rat versus mouse differences in sequestration of 1-methyl-4-phenylpyridinium. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2000 Apr 30;293(2):329–35.

160. Staal R, Sonsalla PK. Inhibition of brain vesicular monoamine transporter (VMAT2) enhances 1-methyl-4-phenylpyridinium neurotoxicity in vivo in rat striata. Journal of Pharmacology and Experimental …. 2000.

161. Jones GM, Vale JA. Mechanisms of toxicity, clinical features, and management of diquat poisoning: a review. J. Toxicol. Clin. Toxicol. 2000;38(2):123–8.

162. Yumino KK, Kawakami II, Tamura MM, Hayashi TT, Nakamura MM. Paraquat- and diquat-induced oxygen radical generation and lipid peroxidation in rat brain microsomes. J. Biol. Chem. 2002 Mar 31;131(4):565–70.

163. Przedborski S, Ischiropoulos H. Reactive oxygen and nitrogen species: weapons of neuronal destruction in models of Parkinson's disease. Antioxidants & Redox Signaling. 2005 May;7(5-6):685–93.

164. Hara SS, Endo TT, Kuriiwa FF, Kano SS. Different effects of paraquat on microsomal lipid peroxidation in mouse brain, lung and liver. Pharmacol. Toxicol. 1991 Mar 31;68(4):260–5.

165. Shimizu K, Matsubara K, Ohtaki K, Fujimaru S, Saito O, Shiono H. Paraquat induces long-lasting dopamine overflow through the excitotoxic pathway in the striatum of freely moving rats. Brain Research. 2003 Jun 26;976(2):10–0.

166. Manning-Bog AB, McCormack AL, Li J, Uversky VN, Fink AL, Di Monte DA. The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. J. Biol. Chem. 2002 Jan 18;277(3):1641–4.

167. Uversky VNV, Li JJ, Bower KK, Fink ALA. Synergistic effects of pesticides and metals on the fibrillation of alpha-synuclein: implications for Parkinson's disease. NeuroToxicology. 2002 Sep 30;23(4-5):527–36.

168. Brooks AI, Chadwick CA, Gelbard HA, Cory-Slechta DA, Federoff HJ. Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. Brain Research. 1999 Mar 26;823(1-2):1–10.

169. Di Monte DA. The role of environmental agents in Parkinson's disease. Clinical Neuroscience Research. 2001.

170. McCormack AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault C, Langston JW, Cory-Slechta DA, et al. Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. Neurobiology of Disease. 2002 Jul;10(2):119–27.

171. Thiruchelvam M, Richfield EK, Baggs RB, Tank AW, Cory-Slechta DA. The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb: implications for Parkinson's disease. Journal of Neuroscience. 2000 Dec 14;20(24):9207–14.

172. Anderson G, Noorian AR, Taylor G, Anitha M, Bernhard D, Srinivasan S, et al. Loss of enteric dopaminergic neurons and associated changes in colon motility in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. Experimental Neurology. 2007 Sep;207(1):4–12.

173. Natale G, Kastsiuchenka O, Pasquali L, Ruggieri S, Paparelli A, Fornai F. MPTP- but not methamphetamine-induced parkinsonism extends to catecholamine neurons in the gut. Annals of the New York Academy of Sciences. 2008 Oct;1139:345–9.

174. chaumette T, Lebouvier T, aubert P, lardeux B, qin C, li Q, et al. Neurochemical plasticity

in the enteric nervous system of a primate animal model of experimental Parkinsonism. Neurogastroenterol. Motil. 2009 Feb;21(2):215–22.

175. Greene JG, Noorian AR, Srinivasan S. Delayed gastric emptying and enteric nervous system dysfunction in the rotenone model of Parkinson's disease. Experimental Neurology. 2009 Jul;218(1):154–61.

176. Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, Del Tredici K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. Cell Tissue Res. 2004 Oct;318(1):121–34.

177. Hansen MB. Neurohumoral control of gastrointestinal motility. Physiol Res. 2003;52(1):1–30.

178. Hansen MB. The enteric nervous system I: organisation and classification. Pharmacol. Toxicol. 2003 Mar;92(3):105–13.

179. Furness JB, Jones C, Nurgali K, Clerc N. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. Progress in Neurobiology. 2004 Feb;72(2):143–64.

180. Hansen MB. The enteric nervous system III: a target for pharmacological treatment. Pharmacol. Toxicol. 2003 Jul;93(1):1–13.

181. Wood JD. Enteric nervous system: sensory physiology, diarrhea and constipation. Curr. Opin. Gastroenterol. 2010 Mar;26(2):102–8.

182. Berthoud HR, Neuhuber WL. Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical. 2000 Dec 20;85(1-3):1–17.

183. Mei N. Intestinal chemosensitivity. Physiol. Rev. 1985 Apr;65(2):211–37.

184. Kirchgessner AL, Gershon MD. Identification of vagal efferent fibers and putative target neurons in the enteric nervous system of the rat. J. Comp. Neurol. 1989 Jul 1;285(1):38–53.

185. Hopkins DA, Bieger D, deVente J, Steinbusch WM. Vagal efferent projections: viscerotopy, neurochemistry and effects of vagotomy. Prog. Brain Res. 1996;107:79–96.

186. Walter GC, Phillips RJ, Baronowsky EA, Powley TL. Versatile, high-resolution anterograde labeling of vagal efferent projections with dextran amines. Journal of Neuroscience Methods. 2009 Mar 30;178(1):1–9.

187. Patsos G, Corfield A. Management of the human mucosal defensive barrier: evidence for glycan legislation. Biological chemistry. 2009.

188. Frey A, Giannasca KT, Weltzin R. Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implications for microbial attachment and oral …. The Journal of …. 1996.

189. Keita ÅV, Söderholm JD. The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. Neurogastroenterol. Motil. 2010 Jul;22(7):718–33.

190. Madara JL. Maintenance of the macromolecular barrier at cell extrusion sites in intestinal epithelium: physiological rearrangement of tight junctions. The Journal of membrane biology. 1990.

191. Förster C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. Histochem Cell Biol. 2008 Jul;130(1):55–70.

192. Ebnet K. Organization of multiprotein complexes at cell-cell junctions. Histochem Cell Biol. 2008 Jul;130(1):1–20.

193. Nieset JE, Redfield AR, Jin F, Knudsen KA, Johnson KR, Wheelock MJ. Characterization of the interactions of alpha-catenin with alpha-actinin and beta-catenin/plakoglobin. Journal of Cell Science. 1997 Apr;110 (Pt 8):1013–22.

194. Garrod DR, Merritt AJ, Nie Z. Desmosomal cadherins. Curr. Opin. Cell Biol. 2002 Oct;14(5):537–45.

195. Prochnow N, Dermietzel R. Connexons and cell adhesion: a romantic phase. Histochem Cell Biol. 2008 Jul;130(1):71–7.

196. Piche T, Barbara G, aubert P, Bruley des Varannes S, Dainese R, Nano JL, et al. Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. Gut. 2009 Feb;58(2):196–201.

197. Elamin E, Jonkers D, Juuti-Uusitalo K, van IJzendoorn S, Troost F, Duimel H, et al. Effects of ethanol and acetaldehyde on tight junction integrity: in vitro study in a three dimensional intestinal epithelial cell culture model. PLoS ONE. 2012;7(4):e35008.

198. Donato RP, El-Merhibi A, Gundsambuu B, Mak KY, Formosa ER, Wang X, et al. Studying permeability in a commonly used epithelial cell line: T84 intestinal epithelial cells. Methods Mol. Biol. 2011;763:115–37.

199. McCall IC, Betanzos A, Weber DA, Nava P, Miller GW, Parkos CA. Effects of phenol on barrier function of a human intestinal epithelial cell line correlate with altered tight junction protein localization. Toxicology and Applied Pharmacology. 2009 Nov 15;241(1):61–70.

200. Wang Q, Fang CH, Hasselgren PO. Intestinal permeability is reduced and IL-10 levels are increased in septic IL-6 knockout mice. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2001 Sep;281(3):R1013–23.

201. Meurette G, Blanchard C, Duchalais-Dassonneville E, Coquenlorge S, aubert P, Wong M, et al. Sacral nerve stimulation enhances epithelial barrier of the rectum: results from a porcine model. Neurogastroenterol. Motil. 2012 Mar;24(3):267–73–e110.

202. De Quelen F, Chevalier J, Rolli-Derkinderen M, Mourot J, Neunlist M, Boudry G. n-3 polyunsaturated fatty acids in the maternal diet modify the postnatal development of nervous regulation of intestinal permeability in piglets. The Journal of Physiology. 2011 Sep 1;589(Pt 17):4341–52.

203. Clarke LL. A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2009 Jun;296(6):G1151–66.

204. Forsyth CB, Shannon KM, Kordower JH, Voigt RM, Shaikh M, Jaglin JA, et al. Increased intestinal permeability correlates with sigmoid mucosa alpha-synuclein staining and endotoxin exposure markers in early Parkinson's disease. PLoS ONE. 2011;6(12):e28032.

205. Yan Y, Laroui H, Ingersoll SA, Ayyadurai S, Charania M, Yang S, et al. Overexpression

of Ste20-related proline/alanine-rich kinase exacerbates experimental colitis in mice. The Journal of Immunology. 2011 Aug 1;187(3):1496–505.

206. Neunlist M, Toumi F, Oreschkova T, Denis M, Leborgne J, Laboisse CL, et al. Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2003 Nov;285(5):G1028–36.

207. Cameron HL, Perdue MH. Muscarinic acetylcholine receptor activation increases transcellular transport of macromolecules across mouse and human intestinal epithelium in vitro. Neurogastroenterol. Motil. 2007 Jan;19(1):47–56.

208. Saunders PR, Hanssen NP, Perdue MH. Cholinergic nerves mediate stress-induced intestinal transport abnormalities in Wistar-Kyoto rats. Am. J. Physiol. 1997 Aug;273(2 Pt 1):G486–90.

209. Bush TG, Savidge TC, Freeman TC, Cox HJ, Campbell EA, Mucke L, et al. Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. Cell. 1998 Apr 17;93(2):189–201.

210. Neunlist M, Van Landeghem L, Bourreille A, Savidge T. Neuro-glial crosstalk in inflammatory bowel disease. J. Intern. Med. 2008 Jun;263(6):577–83.

211. Braak H, Del Tredici K, Bratzke H, Hamm-Clement J, Sandmann-Keil D, Rüb U. Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). J Neurol. 2002 Oct;249 Suppl 3:III–1–5.

212. Beach TG, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue L, White CL III, et al. Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. Acta Neuropathol. 2010 Jun;119(6):689–702.

213. Davies KN, King D, Billington D, Barrett JA. Intestinal permeability and orocaecal transit time in elderly patients with Parkinson's disease. Postgrad Med J. 1996 Mar;72(845):164–7.

214. Salat-Foix D, Tran K, Ranawaya R, Meddings J, Suchowersky O. Increased intestinal permeability and Parkinson disease patients: chicken or egg? Can J Neurol Sci. 2012 Mar;39(2):185–8.

215. Lebouvier T, Chaumette T, Paillusson S, Duyckaerts C, Bruley des Varannes S, Neunlist M, et al. The second brain and Parkinson's disease. Eur. J. Neurosci. 2009 Sep;30(5):735–41.

216. Cersosimo MG, Benarroch EE. Pathological correlates of gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. Neurobiology of Disease. 2012 Jun;46(3):559–64.

217. Wakabayashi K, Mori F, Tanji K, Orimo S, Takahashi H. Involvement of the peripheral nervous system in synucleinopathies, tauopathies and other neurodegenerative proteinopathies of the brain. Acta Neuropathol. 2010 Jul;120(1):1–12.

218. Jellinger KA. A critical evaluation of current staging of alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. Biochim. Biophys. Acta. 2009 Jul;1792(7):730–40.

219. Borland MK, Trimmer PA, Rubinstein JD, Keeney PM, Mohanakumar K, Liu L, et al.

Chronic, low-dose rotenone reproduces Lewy neurites found in early stages of Parkinson's disease, reduces mitochondrial movement and slowly kills differentiated SH-SY5Y neural cells. Mol Neurodegeneration. 2008;3:21.

220. Chaves RS, Melo TQ, Martins SA. Protein aggregation containing beta-amyloid, alpha-synuclein and hyperphosphorylated tau in cultured cells of hippocampus, substantia nigra and locus …. BMC …. 2010.

221. Lee BR, Kamitani T. Improved immunodetection of endogenous α-synuclein. PLoS ONE. 2011;6(8):e23939.

222. Newman AJ, Selkoe D, Dettmer U. A New Method for Quantitative Immunoblotting of Endogenous α-Synuclein. PLoS ONE. 2013;8(11):e81314.

223. Blandini F, Balestra B, Levandis G, Cervio M, Greco R, Tassorelli C, et al. Functional and neurochemical changes of the gastrointestinal tract in a rodent model of Parkinson's disease. Neuroscience Letters. 2009 Dec 31;467(3):203–7.

224. Drolet RE, Cannon JR, Montero L, Greenamyre JT. Chronic rotenone exposure reproduces Parkinson's disease gastrointestinal neuropathology. Neurobiology of Disease. 2009 Oct;36(1):96–102.

225. Kaye J, Gage H, Kimber A, Storey L. Excess burden of constipation in Parkinson's disease: a pilot study. Movement …. 2006.

Résumé

La Maladie de Parkinson (MP) est la deuxième pathologie en terme de fréquence : sa prévalence en Europe a été estimée à 1,8% de la population âgée de plus de 65 ans. La MP est une pathologie neurodégénérative spécifique des neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta associée à la présence d'inclusions intracellulaires, appelées corps de Lewy, dans les neurones survivants dont l'alpha-synucleine était le principal composant. Le déficit en dopamine est à l'origine des signes moteurs cardinaux de la maladie. Mais les progrès réalisés en neuropathologie ont affirmés la présence d'une atteinte extra-nigrale dans la MP. Le système nerveux entérique (SNE) a reçu une attention toute particulière et ce pour plusieurs raisons : (i) il a une organisation anatomique et fonctionnelle qui est proche du SNC (ii) il peut être une des premières structures atteinte par le processus pathologique (iii) enfin, son atteinte serait responsable des troubles digestifs. Il est proposé que la MP résulterait d'une conjonction de facteurs génétiques et environnementaux. Parmi ces toxiques environnementaux, la roténone a fait l'objet d'une attention toute particulière : si ce pesticide largement utilisé est impliqué dans le développement de la MP, il l'est très probablement par inhalation et ou ingestion. Au cours de ce travail de thèse, je me suis donc intéressée aux effets de la roténone sur le SNE, à la fois *in vitro*, en utilisant un modèle de culture primaire de rat mis en place dans notre laboratoire et *in vivo* en utilisant un modèle animal d'intoxication orale à la roténone.

Mots clés : Maladie de Parkinson, Système nerveux entérique, Modèles animaux, Système digestif, Gavage oral, Roténone

Parkinson's disease (PD) is the second disease in term of frequency: its prevalence is estimated to be 1,8% of the population aged over 65. PD is a specific neurodegenerative pathology targeting the dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta and associated with the presence of intracellular proteins aggregates, termed Lewy bodies in the remaining surviving neurons. Remarquably alpha-synuclein, a protein involved in familial forms of PD, has been described to be the main component of Lewy bodies. The lack of dopamine is mainly responsible of the motors symptoms, nonetheless recent studies showed the possibility of an extra-nigral injury. Recently the enteric nervous system (ENS) has received a particular interest for different reasons: (i) it has a functional and anatomical organisation similar to the CNS, (ii) it is involved in the pathological process before the CNS, (iii) it is responsible of digestive disorders. It has been proposed that PD results from a combination of genetic and environmental factors. Among those environmental toxins, rotenone has been proposed to play a central role in the pathophysiological process. It may be able to penetrate the organism either by respiratory and digestive tract. During my thesis my work has been focused the effects of rotenone on the ENS both *in vitro* using a rat primary culture and *in vivo* using an oral intoxication animal model.

Key words : Parkinson's disease, Enteric nervous system, Animal models, Digestive system, Oral gavage, Rotenone