Les plasmalogènes comme traitement prophylactique dans la maladie de Parkinson au niveau intestinal

Mémoire

Jordan Nadeau

Maîtrise en sciences pharmaceutiques
Maître ès sciences (M.Sc.)

Québec, Canada

© Jordan Nadeau, 2018

Les plasmalogènes comme traitement prophylactique dans la maladie de Parkinson au niveau intestinal

Mémoire

Jordan Nadeau

Sous la direction de :

Denis Soulet, directeur de recherche
Thérèse Di Paolo, codirectrice de recherche

Résumé

La phase avancée de la maladie de Parkinson (MP) caractérisée par des symptômes moteurs est souvent précédée par des troubles gastro-intestinaux qui proviendraient d'une altération des neurones dopaminergiques (DAergiques) de l'intestin. Des études suggèrent que la maladie se propagerait au cerveau via le nerf vague. Notre laboratoire a démontré le rôle majeur de l'inflammation dans l'intestin chez des souris parkinsoniennes. Récemment, une baisse des niveaux de plasmalogènes, des glycérophospholipides, dans le cerveau et le sang de patients parkinsoniens a été rapportée. Les plasmalogènes avec un groupement éthanolamine (PGE) jouent un rôle important dans la structure fonctionnelle membranaire des cellules via la médiation de divers mécanismes, tels que le transport des vésicules lors de la neurotransmission, l'activité des protéines membranaires et l'élimination des radicaux libres.

Dans cette étude, nous avons évalué les effets neuroprotecteurs et anti-inflammatoires de l'administration d'un précurseur de PGE, le PPI-1011, dans l'intestin de souris modèles de la MP. La neurotoxine 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) a été utilisée pour modéliser la MP chez les souris et le PPI-1011 (10, 50 et 200 mg/kg) leur a été administré par gavage. Les neurones totaux, les neurones DAergiques positifs à la tyrosine hydroxylase (TH), les macrophages, les macrophages pro-inflammatoires et la protéine G couplée au récepteur 120 (GPR120) ont été marqués dans le plexus myentérique par immunomarquages. Cette dernière est intéressante, puisqu'elle joue un rôle anti-inflammatoire via sa liaison avec du DHA. Pour ce faire, un protocole dose-réponse, un protocole pré-traitement et un protocole post-traitetement ont été réalisés.

Le MPTP induit une baisse des neurones DAergiques et une augmentation de la densité de macrophages dans le plexus myentérique. Le traitement au PPI-1011 (50 et 200 mg/kg) a protégé les neurones DAergiques contre cette baisse et a limité l'infiltration de macrophages dans le système nerveux entérique (SNE).

Cette nouvelle approche thérapeutique pourrait être utilisée pour prévenir et retarder l'initiation et la progression de la MP.

Abstract

The advanced stage of Parkinson's disease (PD) is characterized by motor symptoms witch are often preceded by gastrointestinal disorders that would result from alteration of the dopaminergic neurons (DAergics) of the intestine. Studies suggested that the disease would spread to the brain by the vagus nerve. Our laboratory has demonstrated the major role of inflammation in the intestine in parkinsonian mice. Recently, decreased levels of plasmalogens, glycerophospholipids, in the brain and blood of PD patients have been reported. Ethanolamine plasmalogens (EP) play an important role in the membrane functional structure of cells through the mediation of various mechanisms including neurotransmission, membrane proteins activity and free radicals removal.

In this study, we evaluated the neuroprotective and anti-inflammatory effects of the administration of a PGE precursor, PPI-1011, in the intestine of parkinsonian mice. The neurotoxin 1-mehyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) was used to model PD in mice, and PPI-1011 (10, 50 and 200 mg / kg) was administered by gavage. Total neurons, DAergics TH-positive (TH^+) neurons, macrophages, proinflammatory macrophages and G-protein coupled receptor 120 (GPR120) were labeled in the myenteric plexus by immuno-labeling. This latest is interesting, since it plays an anti-inflammatory role via its link with DHA. To do this, a dose-response protocol, a pre-treatment protocol and a post-treatment protocol were performed.

MPTP induces a decrease of DAergic neurons and an increase in the density of macrophages in the myenteric plexus. Treatment with PPI-1011 (50 and 200 mg / kg) protected DAergic neurons against this alteration and limited the infiltration of macrophages into the enteric nervous system.

This new therapeutic approach could be used to prevent and delay initiation and progression of PD.

Table des matières

Résumé iii
Abstract iv
Table des matières v
Liste des figures viii
Liste des abréviations x
Remerciements xii
Avant-propos xiii
1 Introduction 1
1.1 La maladie de Parkinson 1
1.1.1 Épidémiologie 1
1.1.2 Symptômes moteurs 2
1.1.3 Symptômes non moteurs 3
1.1.4 Physiologie 4
Lésions des neurones dopaminergiques 4
Présence des corps de Lewy 6
1.1.5 Étiologie 9
Facteurs génétiques 9
Facteurs environnementaux 11
Épidémiologie et alimentation 12
1.1.6 Pathogenèse 14
Stress oxydatif 14
Inflammation 14
Réponse immunitaire innée 15
1.1.7 Traitements 16
Médicaments 16
Stimulation cérébrale profonde 19
Développement d'agents neuroprotecteurs 19
1.1.8 Les modèles animaux 21
Modèle MPTP 22
1.2 Comparaison des systèmes nerveux central et périphérique 23
Différences et similitudes 23
1.2.1 Le système nerveux entérique 24
Organisation et fonctions 25
Axe intestin-cerveau 26
1.2.3 L'hypothèse de Braak 26
1.3 Les plasmalogènes 27
1.3.1 Structure 29
1.3.2 Distribution 31
1.3.3 Biosynthèse 31
1.3.4 Régulation 35
1.3.5 Transport 36
1.3.6 Rôles physiologiques 36
1.3.7 Déficience dans différentes pathologies 36
Implications dans la maladie de Parkinson 38
1.3.8 PPI-1011 39
Pharmacocinétique 40
Effets neuroprotecteurs 41
Effets anti-dyskinétiques 41

1.4 Les acides gras oméga 3 41
1.4.1 DHA 42
Effets neuroprotecteurs 42
Effets neurorestorateurs 44
Effets anti-inflammatoires 44
1.5 Projet de recherche 46
1.5.1 Problématique 46
1.5.2 Hypothèses 47
1.5.3 Objectifs 47
2 Neuroprotection and immunomodulation in the gut of parkinsoninan mice with a plasmalogen precursor 48
2.1 Résumé 49
2.2 Abstract 50
2.3 Introduction 51
2.4 Materials and methods 55
Animals and Treatments 55
Dose-response of PPI-1011 pre-treatment neuroprotection experiment 55
PPI-1011 pre-treatment for the neuroprotection experiment 56
Tissue preparation 57
Immunohistochemistry and analysis 57
Confocal laser scanning microscopy and analysis 59
Quantification of plasmalogens and metabolites in serum 59
Statistical analysis 60
2.5 Discussion 65
2.6 Author contributions 70
2.7 Acknowledgments 70
2.8 References 71
3 Discussion 95
3.1 Niveaux des différentes espèces de plasmalogènes dans le protocole dose-réponse 95
3.1 Effets neuroprotecteurs du PPI-1011 dans les protocoles de prétraitement et post-traitement 97
3.2 Effets anti-inflammatoires du PPI-1011 dans les protocoles de prétraitement et post-traitement 98
3.3 Réflexions sur mon projet de recherche de maitrise 99
4 Conclusion 101
5 Perspectives 102
5.1 Mécanismes impliquées dans les effets neuroprotecteurs et anti- inflammatoire du PPI-1011 102
5.2 Effet du PPI-1025 chez la souris en comparaison avec le PPI-1011 103
5.3 Effet du PPI-1011 dans un modèle de la maladie de Crohn 104
5.4 Effet des plasmalogènes dans le vieillissement 104
6 Références 105

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Tableau des gènes pouvant être impliqués dans le développement de la MP 11
Tableau 1.2 : Liste des médicaments avec leurs principes actifs et leur voie d'administration disponibles au Canada en fonction des stratégies thérapeutiques pour le traitemet de la MP..... 18
Tableau 1.3 : Résumé des mécanismes impliqués dans la pathogenèse de la MP et leurs cibles thérapeutiques potentielles 20
Tableau 1.4 : Résumé des principaux modèles utilisés pour étudier la MP 21

Table 2.1: List of antibodies..... 75

Liste des figures

Figure 1.1 : Représentation typique d'un patient parkinsonien. 2
Figure 1.2 : Représentation graphique du pourcentage de neurones restants dans la substance noire en fonction de l'âge et l'interaction entre les causes génétiques et environnementales 3
Figure 1.3 : Neuropathologie de la MP 4
Figure 1. 4 : Schéma des voies striatales directes et indirectes dans la maladie de Parkinson 6
Figure 1.5 : Corps de Lewy marqués par immunohistochimie dans des neurones DAergiques de la substance noire 6
Figure 1.6 : Corps de Lewy marqués par immunohistochimie par un marquage de l'α-synucléine dans le colon de patients parkinsoniens 9
Figure 1.7 : Mécanisme d'action de la neurotoxine MPTP dans le modèle de la MP chez la souris. 22
Figure 1.8 : Représentation schématiques des barrières hémato-nerveuse et hémato-encéphaliques 24
Figure 1.9 : Organisation du système nerveux entérique 25
Figure 1.10 : Représentation de la localisation des agrégats d'α-synucléine en fonction des symptômes dans la MP 27
Figure 1.11 : Structure d'un glycérophospholipide et produits de l'oxydation d'un plasmalogène 28
Figure 1.12 : Structures des liaisons ester, éther et vinyle 28
Figure 1.13 : Structures du diacyl glycérophospholipide, du plasmanyl glycérophospholipide (étherlipide) et du plasmalogène 30
Figure 1.14 : Voie métabolique de la synthèse des plasmalogènes à groupement éthanolamine.. 32
Figure 1.15 : Représentation d'un acide gras (C18:1) 33
Figure 1.16 : Représentation d'un alcool gras (C18:0) 33
Figure 1.17 : Représentation des étapes initiales de la biosynthèse des plasmalogènes endogènes dans le peroxysome 33
Figure 1.18 : Représentation des étapes de la biosynthèse des plasmalogènes endogènes dans le réticulum endoplasmique à partir du produit (c) de la figure 1.17 34
Figure 1.19 : Structure chimique du PPI-1011, de l'acide palmitique, de l'acide docosahexaénoïque et de l'acide lipoïque 39
Figure 1.20 : Représentation des étapes de la biosynthèse des plasmalogènes dans le réticulum endoplasmique à partir du PPI-1011. 40
Figure 1.21 : Représentation schématique de l'effet anti-inflammatoire du DHA via l'inhibition de la voie NF-κB par sa liaison avec le récepteur membranaire GPR120 46
Figure 1. 21 : Structure chimique du PPI-1025, de l'acide stéarique, de l'acide oléique et de l'acide lipoïque 103

Figure 2.1 : PlsEtn levels in dose-response experiment 80

Figure 2.2 : Dose-response of PPI-1011 neuroprotection in myenteric neurons..... 81
Figure 2.3 : Dose-response of PPI-1011 neuroprotection in myenteric macrophages 82
Figure 2.4 : Effect of PPI-1011 in in myenteric neurons of intact and lesioned mice..... 83
Figure 2.5 : Effect of PPI-1011 in in myenteric pro-inflammatory macrophages of intact and lesioned mice..... 84
Figure 2.6 : Effect of PPI-1011 administered post-lesion on myenteric neurons and macrophages 85

Supplemental Figure 2. 1: Structural formulas..... 86
Supplemental Figure 2. 2: Experimental design and timeline..... 87
Supplemental Figure 2. 3..... 88
Supplemental Figure 2. 4..... 89
Supplemental Figure 2. 5..... 91
Supplemental Figure 2. 6..... 93

Liste des abréviations

6-OHDA : 6-Hydroxydopamine
AA : Acide arachidonique
ANOVA : "Analysis of variance"
ATP : Adénosine Triphosphate
BHE : Barrière hémato-encéphalique
BHN: Barrière hémato-nerveuse
CNS : "Central nervous system"
COX : Cyclo-oxygénase
DA : Dopamine
DAB : 3-3'Diaminobenzidine
DAergic : "Dopaminergic"
DAergique : Dopaminergique
DAT : Tranporteur de dopamine, « Dopamine transporter »
DOPAC : 3,4-Dihydroxyphenylacétique, "3,4-Dihydroxyphenylacetic acid"
ENS : "Enteric nervous system"
GI : "Gastrointestinal tract"
GPR120 : Protéine G couplée au récepteur 120
H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène
Iba-1 : "Ionized calcium binding adaptor molecule"
IL : Interleukine
INF-γ : interférons gamma
L-DOPA : Lévodopa
LOX : Lipoxygénase
LPS : Lipopolysaccharide
M1 : Pro-inflammatoire
M2 : Pro-réparateur ou anti-inflamatoire
MAO : Monoamine oxydase
MP : Maladie de Parkinson
MPP^+ : 1-Méthyl-4-phénylpyridinium
MPTP : 1-Méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
MyD88 : "Myeloid differentiation primary response gene 88"
NF-κB : "Nuclear factor kappa-B"
PBS : "Phosphate buffered saline"
PD : "Parkinson's disease"
PGE : Plasmalogène avec un groupement éthanolamine
PINK1 : Protéine sérine/thréonine kinase
ROS : Produits réactifs de l'oxygène
SNA : Système nerveux autonome

SNC : Système nerveux central
SNE : Système nerveux entérique
SNP : Système nerveux périphérique
TAB-1 : "Transforming growth factor-_-activated kinase-1 (TAK-l)-binding protein"
TAK-1 : "Transforming growth factor-_-activated kinase-1"
TBARS : Thiobarbituric acid reactive substances
TGF-β1 : Facteur de croissance transformant bêta 1
TNF-α : tumor necrosis factor alpha
TH : Tyrosine hydroxylase
TH^+: TH-positive
VMAT 2 : Transporteur vésiculaire monoaminergique 2

Remerciements

Je voudrais dabord remercier mon directeur de recherche le Dr Denis Soulet pour m'avoir accordé sa confiance pour rejoindre les rangs de son équipe de laboratoire. Il a été d'un très grand soutient par ses précieux conseils et son encadrement tout au long de mes études au 2e cycle. Je voudrais également remercier ma co-directrice Dre Thérèse Di Paolo pour m'avoir fait bénéficier de son expertise et de sa grande expérience en recherche biomédicale. Je remercie aussi Dr Frédéric Calon pour m'avoir généreusement offert ses conseils pour la rédaction de mon mémoire ainsi que Dr Abid Oueslati pour avoir accepté de faire partie de mes évaluateurs en cette période estivale.

Si je retiens une chose importante de ma maitrise, c'est que les grands projets comme ceux réalisés aux cycles supérieurs se font avant tout en équipe. Je voudrais donc remercier l'ensemble de mes collègues ainsi que les assistants de recherche avec qui j'ai travaillé pour leur aide et leurs conseils. Se fut un réel plaisir de travailler avec vous.

Je tiens à remercier plus particulièrement Andrée-Anne Poirier pour m'avoir initié au laboratoire ainsi que Dre Mélissa Côté qui ont toujours été d'un très grand support par leurs conseils et leur aide généreuse tout au long de mon cheminement. Je veux également remercier Maryline Dubois, Philippe Bourassa, Benoit Mailhot et Katherine Coulombe, notre assistante de recherche, pour leur aide technique ainsi que pour m'avoir assisté dans la préparation de mon séminaire.

Je remercie aussi la faculté de pharmacie pour m'avoir octroyé une bourse du FER.

La recherche est un environnement stimulant dans sa persistante progression. Au cégep, on nous enseigne des concepts développés depuis au moins dix ans. Rendu au baccalauréat à l'Université, les informations dans les livres que nos professeurs utilisent pour monter leurs cours remontent à il y a environ sept ans. Arrivé enfin au 2e cycle, nous avons atteint le bout du pont qui est toujours en construction et ce fut un honneur de participer à sa construction avec vous tous!

Avant-propos

Le manuscrit intégré à ce mémoire intitulé «Neuroprotection and immunomodulation in the gut of parkinsoninan mice with a plasmalogen precursor» a été soumis au journal PlosOne le 18 juillet 2017 et inclus tel que soumis. Je suis le premier auteur de cet article.

Contribution des auteurs de ce manuscrit :

Jordan Nadeau :
a réalisé la préparation des tissus, les immunomarquages, fait l'analyse des résultats et rédigé la première version du manuscrit.

Sara Al Sweidi :
a réalisé les manipulations animales

Tara Smith :
a réalisé la deuxième version du manuscript, a préparé le PPI-1011 et supervisé l'analyse des plasmalogènes

Mélissa Côté :
a fait la mise au point de l'immunomarquage d'Iba-1

Dushmanthi Jaysinghe :
a préparé le PPI-1011 et a fait l'analyse des plasmalogènes

Shawn Ritchie :
a supervisé la préparation du PPI-1011 et supervisé l'analyse des plasmalogènes

Thérèse Di Paolo :
est reponsable de la conception générale du projet et a révisé le manuscript

Denis Soulet :
est reponsable de la partie du projet portant sur le plexus myentérique et a révisé le manuscrit

CHAPITRE 1

Introduction

1.1 La maladie de Parkinson

La MP est la deuxième maladie neurodégénérative la plus répandue à travers le monde[1]. Cette maladie est typiquement associée à des symptômes moteurs causés par la dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques (DAergique) de la voie nigro-striée[2]. Toutefois, les études actuelles démontrent que cette atteinte du système DAergique ne se limite pas seulement au niveau cérébral, puisque des perturbations sont également observées au niveau du système nerveux autonome (SNA) en périphérie[2]. Aujourd'hui encore, l'étiologie de la MP n'est pas bien comprise et aucun traitement curatif n'est disponible[3]. Depuis quelques années, les symptômes non moteurs qui affectent les patients parkinsoniens sont pris en considération et pourraient représenter des indices majeurs dans la prévention et la prise en charge de la maladie.

1.1.1 Épidémiologie

La prévalence de la MP est particulièrement élevée considérant que de 2011 à 2012, elle touchait 0,2% des adultes en général et 4,9% de ceux placés en centre d'hébergement[2]. Chaque jour, 25 nouveaux patients sont diagnostiqués, au Canada, et l'incidence ne cesse d'augmenter avec le vieillissement de la population[4]. De 2011 à 2031, on estime que le nombre de personnes touchées par la MP devrait doubler et atteindre plus de 163 700 canadiens[5]. Il est à noter que la MP est la troisième maladie ayant les coûts directs associés aux soins de santé les plus élevés au Canada, soit environ 120 millions de dollars par année[6]. Le principal facteur de risque de la maladie est l'âge, bien qu'il ne s'agisse pas d'une conséquence normale du vieillissement[7]. Conséquemment, 85% des personnes ayant reçu le diagnostic de la MP sont âgées de plus de 65 ans[8]. Néanmoins, une grande variation de la prévalence est observée entre les populations des différents pays et pourrait s'expliquer par des variations génétiques et environnementales [2,9].

1.1.2 Symptômes moteurs

L'atteinte de la voie DAergique nigrostriée se traduit essentiellement par une triade de symptômes moteurs communément associée à la MP, soit de la bradykinésie, de la rigidité musculaire et des tremblements au repos[10]. La bradykinésie est par définition une lenteur du mouvement. Chez le patient parkinsonien, elle se caractérise par un appauvrissement de la motricité automatique et par une perte d'amplitude des mouvements. Elle affecte les mouvements rapides ainsi que la motricité fine nécessaires à l'écriture, à l'expression faciale et à la gestuelle des doigts et des mains par exemple. La rigidité musculaire est caractérisée par une contraction musculaire basale involontaire, soit une augmentation du tonus musculaire. Cette hypertonicité affecte préférentiellement les muscles fléchisseurs causant des déformations de la posture, tel que le dos fléchit caractéristique des patients parkinsoniens (Figure 1.1). Le tremblement est le symptôme le plus facile à identifier. Toutefois, contrairement à la bradykinésie, il n'est pas proportionnel à la dénervation DAergique[11], suggérant que d'autres systèmes pourraient être impliqués. Son intensité varie en fonction des émotions et il disparait durant le sommeil. Globalement, les symptômes moteurs sont responsables de l'instabilité posturale et de la démarche lente et hésitante chez le patient parkinsonien[11].

Figure 1.1 : Représentation typique d'un patient parkinsonien. (Tiré de Gowers, 1886)[12]

Ces manifestations physiques résultent principalement de la diminution des concentrations de dopamine (DA) dans le striatum[13,14]. Cette baisse est causée par la dégénérescence des neurones DAergiques dans la substance noire et de leurs projections dans le striatum[13,14]. Néanmoins, les symptômes moteurs ne font leur apparition que lorsque 70 à 80% des neurones DAergiques de la substance noire ont dégénéré en raison d'un mécanisme compensatoire mis en place par les neurones restants[15] (Figure 1.2).

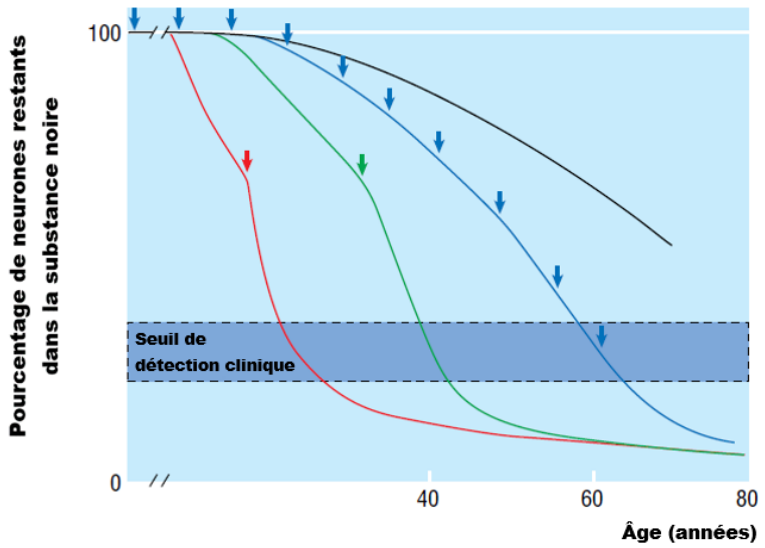


Figure 1.2 : Représentation graphique du pourcentage de neurones restants dans la substance noire en fonction de l'âge et l'interaction entre les causes génétiques et environnementales. La ligne rouge représente un niveau élevé de mort cellulaire en lien avec prédispositions génétiques et des expositions sévères à des facteurs environnementaux survenus avant le diagnostic clinique. La ligne verte représente des causes génétiques et environnementales moins sévères contribuant à une mort cellulaire plus graduelle. La ligne en bleu représente les personnes ayant une susceptibilité génétique et ayant une exposition à des toxines communes au cours de leur vie causant une perte neuronale lente. La ligne noire représente la perte des neurones DAergiques liée à l'âge. Les flèches représentent l'exposition aux facteurs de risque liés à l'environnement. (Adapté de Schapira, 1999)[15]

1.1.3 Symptômes non moteurs

La recherche biomédicale a longtemps été centrée sur les symptômes moteurs en lien avec la dégénérescence des neurones DAergiques au niveau du système nerveux central. Depuis quelques années, les symptômes non moteurs de la MP ont éveillé un intérêt croissant en vue de mieux comprendre sa pathogenèse et de développer des traitements efficaces. Ces manifestations cliniques peuvent être regroupées dans trois grandes catégories, soit les symptômes cognitifs et psychiatriques, les troubles sensitifs et la dysautonomie[16]. Les symptômes cognitifs et psychiatriques se manifestent principalement par des troubles cognitifs et du sommeil[17,18]. De 70 à 80% des patients parkinsoniens ont une qualité du sommeil perturbée par la pathologie que ce soit sous forme d'insomnie ou de réveils nocturnes[17,18]. Les troubles sensitifs quant à eux sont des manifestations sensitivo-douloureuses et sont classés dans cinq catégories, soit les douleurs dystoniques, musculo-squelettiques, radiculaires, akathistiques et neuropathiques centrales[19,20]. Ces phénomènes sensitifs affectent de 40 à 70 % des patients parkinsoniens[21]. Enfin, la dysautonomie

est définie comme étant un dysfonctionnement du système nerveux autonome. Chez les patients parkinsoniens, elle se caractérise principalement par une altération des fonctions digestives, cardio-vasculaires, vésico-sphinctériennes et respiratoires[22-24]. À noter qu'environ 60 % des patients parkinsoniens sont suivi pour des problèmes de constipation contre 20 à 30 % chez la population en général[25-27]. Les symptômes non moteurs de la MP font également partie des conditions associées au vieillissement. Néanmoins, ils sont généralement plus fréquents et plus sévères chez les patients parkinsoniens. Ils n'en demeurent pas moins intéressant, puisque certains d'entre eux, tels que la perte d'odorat, les troubles du sommeil, l'anxiété, les troubles de l'humeur, l'apathie et la constipation sont connues comme étant des signes prémoteurs et peuvent survenir des années avant l'apparition des symptômes moteurs[28,29].

1.1.4 Physiologie

Lésions des neurones dopaminergiques

D'un point de vue anatomique, la MP se caractérise principalement par la perte de neurones DAergiques dans la substance noire [30] (Figure 1.3). La substance noire est l'un des quatre principaux noyaux des ganglions de la base qui constituent un ensemble sous-cortical [31]. Son nom provient de la couleur des cellules qui la composent causée par sa haute teneur en neuromélanine, un pigment noir.

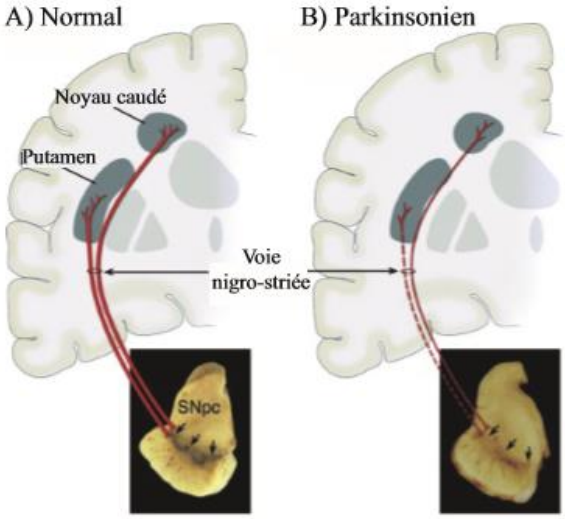


Figure 1.3 : Neuropathologie de la MP. (A) Représentation schématique de la voie nigrostriatale normale (en rouge). Les corps des neurones DAergiques dans la substance noire sont pointés avec

des flèches. (B) Représentation schématique de la voie nigrostriatale dégénérée dans la maladie. (en rouge pointillé). (Adaptée de Dauer et Przedborsk, 2003)[32]

Les trois autres régions d'intérêt sont le noyau caudé, le putamen qui est la partie latérale du noyau lenticulaire et le noyau sous-thalamique[33]. Ces structures sont anatomiquement interconnectées et interagissent avec le cortex via le thalamus[33]. Les ganglions de la base agissent comme un filtre de manière à moduler les informations en provenance du cortex par l'intermédiaire d'une boucle cortico-striato-thalamo-corticale [31]. Cette boucle est modulée par les afférences DAergiques issues de la substance noire compacte [31]. Elle forme un circuit sensori-moteur et joue un rôle fondamental dans la régulation du mouvement volontaire[34 31]. Aussi appelés noyaux gris centraux, ils jouent un rôle majeur dans le contrôle et l'exécution des mouvements. Ils participent également à diverses fonctions cognitives et comportementales associées, par exemple, aux émotions, aux processus attentionnels, à la motivation, à la sélection et à la motivation[35-37]. Les noyaux gris centraux sont également subdivisés selon les structures suivantes :

- le striatum, formé du noyau caudé et du putamen, lui-même formé par la partie latérale du noyau lenticulaire;
- le pallidum, formé de la partie médiale du noyau lenticulaire et subdivisé en globus pallidus interne et externe;
- le noyau sous-thalamique
- la substance noire, elle-même subdivisée en région compacte et réticulée[31].

La substance noire compacte est composée des corps cellulaires des neurones DAergiques. Ces neurones forment des projections axonales qui aboutissent dans le striatum. Dans la MP, la dégénérescence des neurones DAergiques entraine une perte d'inhibition du globus pallidus interne et de la substance noire réticulée [38,39]. Ainsi, l'activité inhibitrice du globus pallidus interne exercée sur les réseaux prémoteurs du thalamus et du tronc cérébral est augmentée et est responsable des troubles hypokinétiques abordés précédemment [13,14] (Figure 1.4).

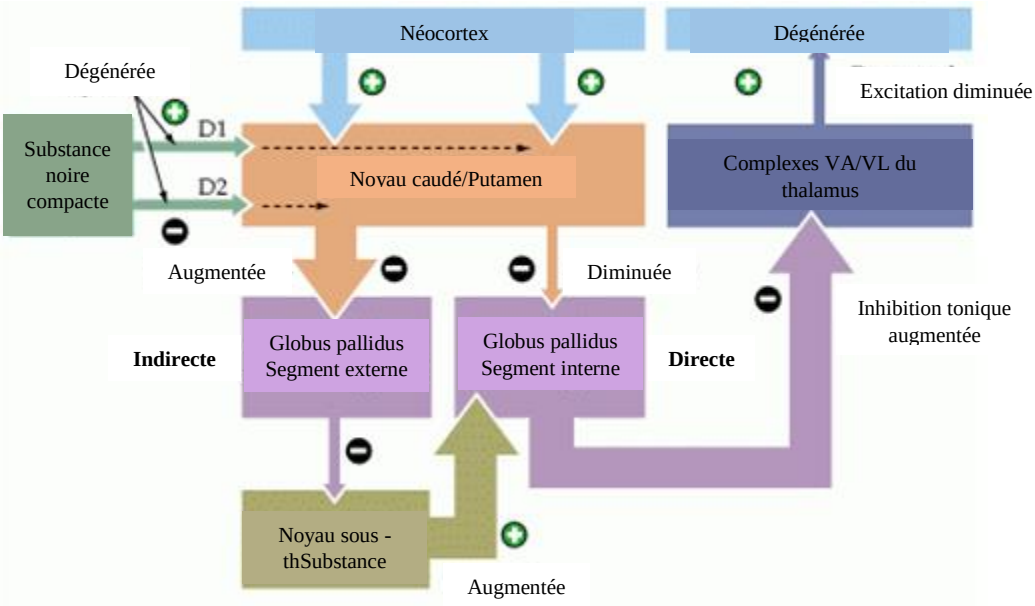


Figure 1. 4 : Schéma des voies striatales directes et indirectes dans la maladie de Parkinson. Tiré de Purves et coll, 2015 [31]. La diminution de dopamine provenant de la substance noire pars compacta entraîne une augmentation des signaux inhibiteurs de la voie basale. Conséquement, l'inhibition tonique des noyaux du thalamus est augmentée, ce qui résulte en une diminution de l'excitabilité des neurones moteurs. Abréviations : D1, récepteur 1 de la dopamine; D2, Récepteur 2 de la dopamine; VA, noyau antérieur ventral; VL, noyau latéral ventral.

Présence des corps de Lewy

Une autre caractéristique histopathologique importante de la MP est la présence d'inclusions dans les neurones DAergiques appelées corps et neurites de Lewy [30] (Figure 1.5). Il s'agit essentiellement d'agrégats d'α-synucléine, bien que plusieurs autres protéines le composent également[32,40-44]. Les corps de Lewy font une dizaine de microns de diamètre et sont présents dans le corps cellulaire alors que les neurites de Lewy se retrouvent dans les prolongements du neurone[45].

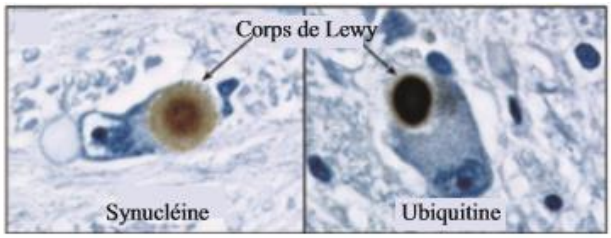


Figure 1.5 : Corps de Lewy marqués par immunohistochimie dans des neurones DAergiques de la substance noire. À gauche, le corps de Lewy est représenté par un marquage de l'α-synucléine et

présente une zone centrale dense entourée d'une zone périphérique diffuse. À droite, le corps de Lewy est représenté par un marquage d'ubiquitine et présente un aspect homogène. (Adaptée de Dauer et Przedborsk, 2003)[32]

L'α-synucléine est une protéine essentiellement localisée à l'intérieur des boutons présynaptiques des neurones et a la capacité d'interagir avec des lipides et des protéines[46]. Ces terminaisons spécialisées contiennent des vésicules synaptiques qui sont nécessaires à la relâche des neurotransmetteurs. Ces derniers vont permettre aux neurones de communiquer entre eux pour permettre au système nerveux de remplir ses fonctions. Les études suggèrent que l'α-synucléine serait un acteur important dans la régulation du traffic et du recyclage des vésicules synaptiques[47,48]. De plus, l'α-synucléine interviendrait dans la régulation de la libération de la DA, un neurotransmetteur essentiel dans le contrôle de l'initiation et l'arrêt des mouvements volontaires et involontaires[49].

Ainsi, plusieurs études se sont penchées sur le rôle de l'α-synucléine dans la physiopathologie de la MP. Le domaine central de cette protéine lui confère la propriété de s'agréger facilement en différentes structures amyloïdes[50]. La protéine va passer de la forme d'un monomère à un dimère pour ensuite devenir un oligomère, puis une protofibrille, une fibrille et enfin former un corps de Lewy[50]. Ces agrégats sont observés dans le système nerveux central et dans les systèmes nerveux périphériques[51-54]. Au niveau central, ils sont présents dans différentes structures, telles que la substance noire, le bulbe olfactif, le noyau dorsal moteur du vague et le complexe locus cœruleus latéral de la moelle épinière chez l'ensemble des patients [51-55].

Leur présence dans le locus cœruleus-subcœruleus pourrait être responsable des troubles de l'humeur ainsi que des troubles du comportement en sommeil paradoxal[56]. Une perte neuronale significative à également été observée dans cette région du cerveau dans la MP[57]. Les corps de Lewy dans le bulbe olfactif coïncident avec la perte d'odorat, bien que les études soient contradictoires par rapport à la perte neuronale[57]. L'atteinte du faisceau intermédio-latéral de la moelle épinière pourrait expliquer l'hypotension orthostatique [57,58]. Les corps de Lewy retrouvés dans le noyau dorsal moteur du vague et dans le SNE seraient responsables des troubles de la motilité intestinale[57,58]. Des études n'ont rapporté qu'une faible ou aucune perte des neurones entériques chez les parkinsoniens[59-61]. Ces observations pourraient être en lien avec une altération des neurones DAergiques causée par le vieillissement. Une étude non publiée du laboratoire du Dr Soulet a permis d'observer chez les souris vieilles une diminution significative des neurones TH^+

par rapport aux souris jeunes dans le plexus myentérique[62]. De plus l'effet neurotoxique du MPTP était significatif chez les souris jeunes, mais était absent chez les souris vieilles. Ainsi aucune différence significative n'était présente entre les souris jeunes ayant reçu la neurotoxine et les souris vieilles contrôles. Cette étude suggère que les neurones DAergiques chez les parkinsoniens soient altérés plus précocement que chez les autres. Elle expliquerait le peu de différence observée entre des gens agés et des patients parkinsoniens au niveau de la densité des neurones TH^+ au niveau intestinal.

De nombreux travaux se sont intéressés au transport de l'α-synucléine entre les neurones. L'α-synucléine est une protéine généralement intracellulaire, mais est également présente dans le liquide céphalo-rachidien et le plasma[63,64]. La sécrétion d'α-synucléine se produit chez un individu sain, mais est portée à augmenter en condition pathologique lors d'un stress oxydatif, par exemple[65-67]. L'α-synucléine extracellulaire interagit avec les cellules gliales et/ou est recaptée par les neurones environnants[68]. Ce transport de l'α-synucléine entre les neurones est l'un des mécanismes qui permettrait la propagation du processus pathologique[69].

Certaines études réalisées sur des patients ayant reçu des greffes de neurones embryonnaires pour remplacer les neurones DAergiques perdus ont observé la présence de corps de Lewy dans ces nouveaux neurones et ce 11 ans après la transplantation[70,71]. La diffusion de l'α-synucléine de neurones à neurones permettrait d'expliquer ces observations. En situation pathologique, ce transfert entre les cellules est communément appelé «prion-like», puisque comme dans le cas des prions, une forme amyloïde repliée des protéines apparait et propagerait la maladie entre les cellules[69,72-74]. Néanmoins, ces agrégats d'α-synucléine ne semblent pas pouvoir transmettre la maladie entre les individus comme le font les prions, tels que l'encéphalopathie spongiforme bovine[75].

Quelques mécanismes pourraient expliquer la diffusion de l'α-synucléine dans la MP. La sécrétion de ces agrégats dans l'espace extracellulaire peut se faire par exocytose non conventionnelle ou via des exosomes [66,76] et peut être stimulée par le repliement protéique et le stress mitochondrial [76]. Une fois dans le milieu extracellulaire, l'α-synucléine peut être absorbée par endocytose[77,78], mais pourrait également circuler via des nanotubes comme le font les prions[79]. Le taux de transferts de l'α-synucléine entre les cellules serait proportionnel à sa concentration[77,80].

Au niveau périphérique, ces agrégats sont présents dans l'innervation du système nerveux sympathique et parasympathique des glandes salivaires ainsi que dans le système nerveux entérique (SNE)[54,81] (Figure 1.6).

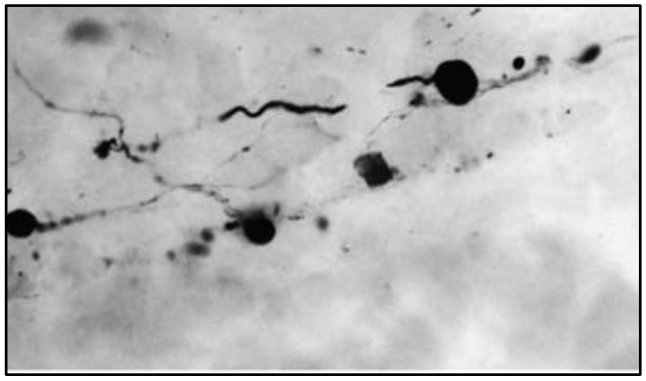


Figure 1.6 : Corps de Lewy marqués par immunohistochimie par un marquage de l'α-synucléine dans le colon de patients parkinsoniens. (Adapté de Braak et coll. 2006) [82]

Bien qu'elle ne soit pas toujours associée à une perte neuronale [59,60], l'observation des corps de Lewy en périphérie a mené à faire le rapprochement entre la présence de ces inclusions et certains symptômes non moteurs affectant la majorité des parkinsoniens[61].

1.1.5 Étiologie

La MP est une maladie d'origine complexe, puisqu'elle dépend d'une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux[83,84]. À ce jour, plusieurs facteurs modulant le risque de développer la MP ont été identifiés.

Facteurs génétiques

De nombreuses études se sont concentrées sur la composante génétique de la MP [85]. Celle-ci se divise en deux catégories, soit les transmissions génétiques héréditaires et les polymorphismes d'un seul nucléotide [86]. Les gènes en question sont impliqués dans différentes fonctions intracellulaires, telles que la transmission synaptique, le trafic des vésicules, les voies signalétiques endosomales et lysosomales et la fonction mitochondriale.

Parmi les gènes qui se transmettent de manière héréditaire liés à la MP, le gène SNCA codant pour l'α-synucléine fut le premier a être identifié [87] [88]. De fait, certaines de ses mutations favorisent le repliement de l'α-synucléine en oligomères ou en fibrilles, deux des formes de l'α-synucléine qui seraient les plus toxiques [89]. De plus, la surexpression de ce gène serait liée à un développement précoce et plus aggressif de la MP [90] [91] [92]. Le LRRK2 quant à lui présente plus de 100 mutations qui seraient liées à la MP et sont reliées à 4% des formes héréditaires de la maladie [85]. Sa protéine est impliquée dans le transport des vésicules, l'autophagie et la fonction mitochondriale. Les mutations du VPS35 perturbent le transport rétrograde des vésicules ainsi que le transport de la cathepsine D impliquée entre autres dans la dégradation de l'α-synucléine [85,93,94]. Ses mutations sont reliées à 1% des formes héréditaires de la maladie. L'ensemble des mutations de ces gènes proviennent de transmissions autosomiques dominantes, ce qui signifie qu'une seule allèle est nécessaire à la génération du phénotype.

Plusieurs transmissions autosomiques récessives liées à la MP ont également été identifiées. Les plus fréquentes sont celles de Parkin[94] et de PINK-1[93]. Certaines mutations de Parkin et de PINK-1 entrainent la perte de mécanismes impliqués dans la dégradation des mitochondries défectueux[94,95].

De leur côté, les polymorphosmismes d'un seul nucléotide regroupent un ensemble de mutations ponctuelles qui ensemble augmentent le risque de développer la MP. Plusieurs régions chromosomales ont été identifiées[86] (Tableau 1.1).

Locus	Gènes	Mutation autosomale	Produit du gène	Phénotype
PARK1/4	SNCA	Dominante	α-synucléine	Parkinsonisme avec démence Début précoce et progression rapire
PARK2	Parkine	Récessice	Ubiquitine ligase E3	Parkinsonisme avec progression lente
PARK5	UCHL1	Dominante	Ubiquitine carboxyl-terminal hydrolase L1	Parkinsonisme tardif
PARK6	PINK1	Récessive	Protéine sérine thréonine kinase	Parkinsonisme avec progression lente
PARK8	LRRK2	Dominante	Protéine avec répétition riche en leucine kinases 2	Parkinsonisme tardif
PARK9	APTP13A2	Récessive	ATPase de type A2	Parkinsonisme précoce avec syndrome du Kufos-Rakeb
PARK11	GIGYF2	Dominante	Protéine GBR10 interagissant avec le domaine GYP de type 2	Parkinsonisme tardif
PARK13	Omi/HTRA2	Dominante	Protéase à sérine mitochondriale HTRA2	Parkinsonisme incluant bradykinésie, tremblements et rigidité musculaire
PARK14	PLA2G6	Récessive	Phospholipase A2 calcium-indépendant de type 6	Parkinsonisme avec dystonie
PARK15	FBX07	Récessive	Protéine à boite-F de type 7	Parkinsonisme précoce
PARK16	RAB7	Dominante	Protéine associée à la famille des RAS	Parkinsonisme tardif
PARK17	GAK	Dominante	Cycline kinase couplé à une protéine G	Parkinsonisme tardif
PARK18	HLA-DRA	Dominante	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe 2 (type DR)	Parkinsonisme tardif

Tableau 1.1 : Tableau des gènes pouvant être impliqués dans le développement de la MP. (Adaptée de Martin et al., 2011[96], de Fujioka and Wszolek, 2012 [97] et de Alberio et al., 2012 [98])

Facteurs environnementaux

Au niveau environnemental, plusieurs facteurs modulant le risque de développer la MP ont été identifiés tels que la cigarette[99,100], les métaux lourds[101], la caféine[102] et les pesticides[103-107]. Selon des méta-analyses, la consommation de cigarette réduirait de 23 à 70% le risque de développer la MP [99,100], bien qu'elle soit également associée à une augmentation du risque de développer des troubles du sommeil [108]. Les mécanismes impliqués derrière cette protection ne sont pas encore bien compris. Une autre méta-analyse a rapporté une diminution de 25% du risque de développer la MP chez les consommateurs de caféine [102]. Cette protection serait liée à l'effet antagoniste de la caféine sur le récepteur A2A de l'adénosine [109]. À l'inverse, l'exposition à certains pesticides tels que le Paraquat et la Roténone augmentent le risque de développer la MP [107,110-112]. Au Canada, la roténone et le Paraquat sont utilisés selon des normes établies en fonction des risques liés à la santé

contrairement à la Suède qui a interdit l'utilisation du Paraquat depuis 1983 en raison de sa toxicité et de l'absence d'antidote[113,114]. En 2005, par exemple, le paraquat a été répandu sur 24% de la superficie totale des cultures du Québec[115]. De son côté, la roténone peut être utilisée dans les lacs pour éliminer des poissons indésirables, en vue de les repeupler par la suite par des poissons dédiés à la pêche[116]. Du côté des métaux lourds, une dérégulation de l'homéostasie du fer est associée à l'éthiologie de la MP depuis des dizaines d'années [117]. La liaison du fer et d'autres métaux par la neuromélanine dans les neurones DAergiques de la substance noire pigmentés peut être à l'origine de leur vulnérabilité sélective [118]. En effet, de nombreux métaux sont des pro-oxydants qui génèrent des réactifs de l'oxygème (ROS) [119].

Une très faible portion de l'incidence de la MP est liée aux mutations génétiques[120-122]. Au contraire, les facteurs environnement seraient liés à plus de 90% des cas de Parkinson, en partie due à l'exposition aux pesticides[103-106]. Parmi les facteurs de risque modifiables, avec la cigarette et la caféine abordés précédemment, l'alimentation représente une importante exposition quotidienne.

Épidémiologie et alimentation

Au cours de la dernière décennie, de nombreuses études épidémiologiques se sont intéressées à l'effet protecteur de différentes composantes de l'alimentation associé à l'incidence de la MP[123]. Les principaux éléments rapportés sont les vitamines B6 et E, les flavonoïdes et les acides gras insaturés[124].

Une étude épidémiologique prospective semiquantitative réalisée sur 7 983 sujets sur une période de 6 ans a observé une protection de l'apport alimentaire en vitamine B6 contre la MP[125]. Cette vitamine se retrouve dans presque tous les aliments, mais est particulièrement riche dans les poissons gras, les viandes et les pommes de terre[126,127]. De son côté, la vitamine E semble être la vitamine ayant le plus grand impact positif par rapport à la MP [124]. Une diminution significative des niveaux de vitamine E a été rapportée dans le sérum des patients parkinsoniens [128]. De plus, une étude réalisée sur 106 patients parkinsoniens et leur conjoint(e) a rapporté une tendance plus élevée chez les non-parkiniens à consommer des aliments riches en vitamine E, tels que les noix, les huiles végétales et les légumes à feuilles vertes [129]. La vitamine E est un puissant antioxydant[130], ce qui pourrait expliquer en partie ces observations. Une étude réalisée sur des neurones DAergiques en présence de 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP^+) a par exemple observé une diminution du stress oxydatif induit suite à l'ajout de vitamine E [130]. Néanmoins, dans cette même

étude d'autres agents antioxydants tels que la vitamine C ayant eu des effets bénéfiques *in vitro* n'ont pas été clairement associée à la MP dans les études épidémiologiques, supportant le fait que le stress oxydatif ne soit pas le seul médiateur impliqué dans la MP [131-133].

D'autres travaux se sont intéressés aux flavonoïdes. Il s'agit du groupe de polyphénol le plus commun dans l'alimentation humaine[134]. Ces puissants antioxydants sont riches dans le thé, l'huile d'olive et les fruits [135]. Ils jouent également un rôle dans la modulation des enzymes liées à l'oxydation et dans la fonction des mitochondries dans les neurones[134,136]. Ils seraient eux aussi associés à un risque moindre de développer la MP [137].

Enfin, des études épidémiologiques ont cherché à déterminer l'implication de la consommation d'acides gras polyinsaturés (AGPI) dans l'incidence de la MP. [123] Une petite étude rétrospective[131], plus tard confirmé par une large étude prospective semiquantitative sur six ans [125] a observée une diminution significatique du risque de développer la MP avec une consommation élevée en AGPI totaux. Cette association était d'autant plus marquée avec les oméga-3 après des ajustements pour l'âge, le sexe, le tabagisme et la consommation de vitamine E[125]. Néanmoins cette association n'a pas été observée pour le DHA[125]. Au contraire, une étude prospective réalisée sur deux autres larges cohortes américaines sur deux ans (Health Professionals Follow-up Study et the Nurse's Health Study) n'a observé aucune association significative entre la consommation d'AGPI totaux ou d'oméga-3[138]. Par contre, elles ont pu constater une corrélation positive entre le remplacement isocalorique des AGPI avec des acides gras saturés et un risque accru de développer la MP, supportant l'hypothèse d'un effet protecteur des AGPI [138]. Une analyse plus détaillée de 2007 sur ces deux mêmes cohortes a fait le rapprochement entre les habitudes alimentaires de ces patients et le risque de développer la MP. Elle a relevé que les régimes sains riches en fruits, en légumes et en poissons étaient inversement associés à l'incidence de la MP, contrairement aux régimes occidentaux typiquement gras [139].

Dans l'ensemble, ces études épidémiologiques suggèrent que les habitudes alimentaires à base de fruits, de légumes et de poisson qui sont de bonnes sources de vitamines B6 et E, de flavonoïdes et d'AGPI favoriserait une diminution du risque de développer la MP.

1.1.6 Pathogenèse

Plusieurs processus participeraient au développement de la MP, tels que l'apoptose des neurones DAergiques[140], le dysfonctionnement du système ubiquitine-peroxysome et des lysosomes[141], l'excitotoxicité et le déséquilibre intracellulaire de calcium[142], le dysfonctionnement mitochondrial, le stress oxydatif [143-145] et l'inflammation. Ces deux derniers éléments seront plus particulièrement abordés.

Stress oxydatif

Au niveau biochimique, le stress oxydatif retrouvé chez les patients parkinsoniens est suspecté de participer à la dégénérescence des neurones DAergiques [143-145]. De plus, il y aurait une corrélation positive entre le niveau de stress oxydatif et le changement de conformation de l'α-synucléine [42]. Le stress oxydatif est une forme d'agression des constituants de la cellule causée par un excès toxique des dérivés ROS et des dérivés réactifs de l'azote. Ces excès peuvent être causés par une augmentation de la production de ROS ou par une diminution des acteurs impliqués dans les mécanismes de détoxification. Cette forme de toxicité peut entrainer plusieurs perturbations au sein des cellules. Il peut induire l'apoptose des cellules saines en lésant de l'ADN, en altérant la membrane cellulaire via l'oxydation des lipides insaturés ou en stimulant la production de cytokines pro-inflammatoires. Ce dernier effet est responsable de l'association étroite qui existe entre le stress oxydatif et l'inflammation [146].

Par ailleurs, la DA produite dans les neurones spécifiquement lésés dans la MP peut elle-même être impliquée dans la génération de ROS. En plus de pouvoir s'auto-oxyder, la monoamine-oxydase B (MAO-B) qui permet d'inactiver ce neurotransmetteur en le dégradant va par le fait même générer de l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (DOPAC) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) [147,148]. Ces réactions peuvent former des semiquinones potentiellement toxiques pour les cellules [149,150]. De plus, l'H_2O_2 généré peut contribuer à augmenter le stress oxydatif.

Inflammation

L'inflammation représente l'ensemble des réactions générées par le système immunitaire en réponse à une agression, telle qu'un stress chimique ou une infection[151]. Le système immunitaire

se définit comme étant un ensemble coordonné de reconnaissance et de défense qui discrimine le soi du non-soi[151]. Ce système biologique se divise en deux grandes catégories de mécanismes de défense, soit les mécanismes de défense non spécifiques et les mécanismes de défense spécifiques[151]. Le premier type est mis en place par le système immunitaire innée, comme les barrières épithéliales, les muqueuses, l'acidité gastrique, les larmes ainsi que les cellules immunitaires d'origine myéloïde[151]. Les défenses spécifiques quant à elles font intervenir le système immunitaire adaptatif qui comprend les lymphocytes et la production d'anticorps spécifiques. Ce second type de défense ne sera pas abordé[151].

Réponse immunitaire innée

Le système immunitaire innée est la première ligne de défense de l'organisme en réponse aux agents infectieux [152]. Au niveau intestinal cette défense est mise à rude épreuve, considérant l'importante exposition à différents antigènes étrangers [152]. Par conséquant, il n'est pas surprenant que le système digestif abrite une grande part du système immunitaire [152]. Les monocytes, les cellules dendritiques et les macrophages jouent un rôle central dans la discrimination des antigènes nocifs des antigènes inoffensifs pour l'organisme [152]. Les monocytes sont des cellules phagocytaires mononucléaires qui patrouillent l'ensemble l'organisme via le système circulatoire [152]. Ils participent a des fonctions clés de l'immunité innée, telles que la phagocytose, la présentation d'antigène, la régulation de la réponse inflammatoire et la réparation tissulaire[153]. Cette reconnaissance peut durer jusqu'à trois jours, après quoi, ils infiltrent les tissus pour se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques[153,154]. Ils doivent donc être renouvelés en continu pour assurer une surveillance immunitaire permanente[153,154]. Ensemble, ces cellules initient et maintiennent une protection contre les pathogènes tout en assurant une tolérance locale et systémique aux antigènes inoffensifs[155]. Lorsque cette tolérance aux protéines alimentaires et à la flore intestinale est perdue, une inflammation chronique peut s'installer, comme c'est le cas dans la maladie de crohn[155].

Deux phénotypes fonctionnels distincts caractérisent les monocytes et les macrophages, soit l'activation classique (M1) et l'activation alternative (M2) [156]. Le type M1 est cytotoxique et pro-inflammatoire alors que le type M2 régule la réponse inflammatoire et joue un rôle dans la réparation tissulaire[156]. Les cellules de type M1 expriment une série de cytokines, de chimiokines et de molécules effectrices pro-inflammatoires telles que IL-12, IL-23, tumor necrosis factor alpha (TNF-α) et CMH II[156]. À l'inverse, celles de type M2 expriment un large éventail de

molécule anti-inflammatoires dont, l'IL-10, le facteur de croissance transformant bêta 1 (TGF-β) et l'arginase 1[157]. Cette polarization entre M1 et M2 est un phénomène dynamique qui peut-être influencée par l'environnement des cellules en question[158,159]. À titre d'exemple, les monocytes et les macrophages adoptent les propriétés du type M1 lorsqu'ils sont exposés à des interférons gamma (INF-γ) ou à un produit bactérien tels que les lipopolysaccharides (LPS)[158,160].

Les processus inflammatoires représentent une composante importante de la MP, puisqu'elle est associée à un état d'inflammation chronique dans différentes régions affectées par la maladie[161]. Une étude a d'ailleurs observé une corrélation positive entre les concentrations plasmatiques d'IL-6, une cytokine pro-inflammatoire, et le risque développer la MP[162]. Au niveau du système nerveux central, une forte activité microgliale a été rapportée [65]. De plus, une augmentation significative des niveaux de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF-α, IL-1b, IL-2, IL-4 et IL-6 et de protéines pro-apoptotiques ont été mesurées dans le liquide céphalorachidien ainsi que dans la substance noire et le putamen[66,163,164]. Dans l'intestin, cette exacerbation des processus inflammatoires se caractérise, à ce jour, par une élévation des concentrations de cytokines pro-inflammatoire[165]. De fait, les patients parkinsoniens souffrent fréquemment de maladies inflammatoires de l'intestin[166-169].

1.1.7 Traitements

Il n'existe à ce jour que des traitements symptomatiques pour prendre en charge les patients parkinsoniens. Ceux-ci reposent sur l'utilisation de médicaments ou d'implants qui vont compenser la baisse de DA sans agir sur la cause ou la progression de la maladie.

Médicaments

Trois stratégies mécanistiques sont disponibles pour restaurer la transmission DAergique striatale [170].

La première est l'utilisation de la lévodopa (L-DOPA), soit le principal médicament utilisé actuellement pour prendre en charge les symptômes moteurs des patients parkinsoniens[171]. Il s'agit d'un précurseur de DA soit la L-DOPA qui vient pallier la baisse de DA induite par la dégénérescence des neurones DAergiques[171]. Ce médicament est utilisé en association avec un inhibiteur de la dopadécarboxylase tel que le carbidopa et la benséraside[172]. Cet inhibiteur ne peut

pas traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE), ce qui permet de bloquer la synthèse de DA en périphérie tout en permettant la synthèse de DA au niveau central. Cette association est efficace, puisque parmi les trois stratégies, elle est la plus efficace et présente le moins d'effets secondaires[171]. Il existe différentes formes commerciales à ce duo telles que, le Sinemet®, le Stalevo®, le Prolopa® sous forme orale[173]. La courte demi-vie de ce médicament nécessite une posologie de quatre pilules par jour en début de maladie. De plus, le Duodopa® sous forme de gel intestinal peut être utilisé au stade avancé de la MP. (Tableau 1.2)

La deuxième approche consiste à utiliser des agonistes DAergiques pour activer les récepteurs DAergiques, bien qu'ils sont moins efficaces que la L-Dopa. Leur administration peut être faite per os, sous forme retard, le Requip® ou à l'aide d'un timbre transdermique, le Neupro®. La forme retard a l'avantage de ne nécessiter qu'une pilule par jour et d'avoir une action plus continue que la L-DOPA. De son côté, la forme injectable permet une action plus rapide. Le Parlodel® et le Mirapex® sont deux autres agonistes DAergiques pouvant être utilisés sous forme orale. (Tableau 1.2)

La troisième stratégie repose sur l'utilisation d'inhibiteurs enzymatiques[172,173]. Ceux-ci comprennent deux inhibiteurs de la monoamine-oxydase B, l'Azilect® et l'Eldepryl® ainsi que deux inhibiteurs de la catéchol-O-méthyl-transférase (COMT), soit le Comtan® qui ne peut pas traverser la BHE et agit donc en périphérie seulement[172,173]. Les inhibiteurs de la MAO-B limitent la dégradation de la dopamine, alors que les inhibiteurs de la COMT limitent la dégradation de son précurseur, la L-Dopa[172,173]. Ces molécules visent à augmenter la demi-vie et la biodisponibilité de la L-Dopa et de la DA et seront administrés en fonction des autres médicaments du patient[172,173]. Il existe également un médicament, le Stalevo®, qui associe trois principes actifs, soit la L-Dopa à un inhibiteur de la COMT pour protéger ce précurseur en périphérie et à un inhibiteur de la dopa-décarboxylase pour inhiber la synthèse de DA en périphérie[172,173]. (Tableau 1.2)

Il existe d'autres médicaments pouvant améliorer la condition des parkinsoniens, tels que le Symmetrel®, le Cogentin® et l'Artane®. Le premier est un antiviral qui augmente la libération de DA et bloque le glutamate[172,173]. Les deux autres ont quant à eux un effet anticholinergique qui permet de rétablir l'équilibre entre la DA et l'acétylcholine[172,173]. (Tableau 1.2)

Stratégies	Noms commerciaux	Voie	Principes actifs
1. Précurseur de DA jumelé à un inhibiteur de la dopadécarboxylase	Sinemet®	*per os*	L-DOPA, Carbidopa
	Stalevo®	*per os*	L-DOPA, Carbidopa, Entacapone
	Prolopa®	*per os*	L-DOPA, Bensérazide
	Duodopa®	Gel intestinal	L-DOPA, Carbidopa
2. Agonistes DAergiques	Requip®	*per os*	Ropinirole
	Neupro®	Timbre	Rotigotine
	Parlodel®	*per os*	Bromocriptine
	Mirapex®	*per os*	Pramipexole
3. Inhibiteur de la MAO-B	Azilect®	*per os*	Rasagiline
	Eldepryl®	*per os*	Sélégiline
3. Inhibiteurs de la catéchol-O-méthyl-transférase	Comtan®	*per os*	Entacapone
	Stalevo®	*per os*	L-DOPA, Carbidopa. Entacapone
Antiviral	Symmetrel®	*per os*	Amantadine
Anticholinergiques	Cogentin®	*per os*	Benztropine

Tableau 1.2 : Liste des médicaments avec leurs principes actifs et leur voie d'administration disponibles au Canada en fonction des stratégies thérapeutiques pour le traitemet de la MP [172,173]

Malheureusement, les stratégies reposent sur la L-DOPA présente souvant un épuisement de l'effet thérapeutique en fin de dose, autrement dit que l'effet d'une dose est écourtée et s'explique par l'évolution inintérompue de la dégénérescence des neurones DAergiques. L'utilisation de la L-DOPA à long terme a également un effet secondaire incontournable, les dyskinésies, qui consistent en des mouvements anormaux involontaires qui peuvent affecter différentes régions du corps. Il s'agit d'un problème majeur, puisque les dyskinésies peuvent devenir plus invalidantes que la maladie elle-même [174,175].

Fait intéressant, une étude de 2006 a rapporté des changements dans la composition lipidique du cerveau en lien avec l'utilisation de la L-DOPA chez des patients parkinsoniens et des singes traités au MPTP[176]. Aucune différence n'a été observée entre les parkinsonniens et le groupe contrôle. Toutefois, chez les singes, l'administration de L-DOPA a augmenté les niveaux d'acide arachidonique (AA) et a réduit ceux d'acide docohexaenoique (DHA) comparativement aux singes contrôles. Similairement, chez les patients ayant présentés des complications motrices en lien avec la L-DOPA, des niveaux plus élevés d'AA ont été mesurés dans le cortex comparativement aux

patients sans complications et au groupe contrôle[176]. De plus, les patients ayant reçu des doses cumulatives plus élevées que la médiane présentaient des niveaux relativement plus élevés d'acide gras saturé, contre des niveaux moins élevés d'acides gras mono-insaturés dans leur cortex cérébral.

Stimulation cérébrale profonde

Les traitements chirurgicaux sont indiqués à un peu moins de 15% des patients parkinsoniens et plus spécifiquement ceux qui ont des symptômes invalidants malgré un traitement médicamenteux optimal [171]. Cette intervention consiste à implanter une électrode dans une zone ciblée par IRM encéphalique, telle que le noyau sous-thalamique ou le pallidum interne [177]. L'évaluation des bénéfices de la stimulation cérébrale profonde peut se faire pendant ou après l'opération. Ce traitement consiste essentiellement à stimuler différentes régions du cerveau en y faisant passer un courant électrique [177]. Néanmoins, cette intervention présente quelques risques non négligeables. Par exemple, elle peut causer un hématome intracérébral et diverses complications infectieuses liées à l'implantation. Néanmoins les effets secondaires liés à la stimulation cérébrale profonde, tels que des paresthésies, une dysarthrie, une aggravation de la stabilité posturale, des déviations monoculaires et des nausées sont réversibles suite à l'arrêt de celle-ci [177].

Développement d'agents neuroprotecteurs

Un grand nombre d'agents neuroprotecteurs pour la MP ont été démontrés chez des modèles animaux[178]. Toutefois, jusqu'ici, ces effets n'ont pas été observés chez l'humain atteint de la MP[178]. Le manque d'outils permettant de diagnostiquer rapidement la MP et la difficulté à évaluer la progression de la MP sont des obstacles importants qui permettent d'expliquer cette discordance[178]. Parmi les stratégies qui sont actuellement considérées comme étant les plus prometteuses, il y a les antagonistes des récepteurs de l'adénosine, les agents anti-inflammatoires, les antioxydants et celles visant à limiter l'agrégation de l'α-synucléine (Tableau 1.3) [178].

Les agents anti-inflammatoires représentent eux aussi une voie intéressante pour limiter les processus neurodégénératifs de la MP. Des études réalisées dans des modèles in vitro et in vivo qui ont étudié les effets de l'aspirine ont rapporté une protection des neurones DAergiques et une amélioration des symptômes associés à la MP [179]. Une étude épidémiologique a d'ailleurs constaté que la prise régulière d'aspirine permettrait de réduire le risque de développer la MP [180]. Un autre rapport portant sur les effets de l'ibuprofène à également observé un potentiel neuroprotecteur dans

la MP [181]. Toutefois, il n'est pas encore clair si ces anti-inflammatoires non stéroïdiens ont réellement des effets bénéfiques chez les patients parkinsoniens.

De leur côté, les agents antioxydants sont intéressants, puisque le stress oxydatif fait lui aussi partie des processus pathologiques identifiés dans la MP, tels qu'abordés précédemment.

Bien que les mécanismes derrière la toxicité des agrégats d'α-synucléine ne soient pas encore détaillés, ceux-ci semblent être un facteur clé dans la pathogenèse de la MP. Ainsi, trois stratégies visant à limiter cette agrégation ont été explorées, soit l'inhibition de la synthèse d'α-synucléine, l'augmentation de la dégradation de l'α-synucléine et l'induction de changements dans les molécules intermédiaires à la synthèse d'α-synucléine. Par exemple, trois études, dont une chez la drosophile et deux chez le rat ont rapporté que la dégradation de l'α-synucléine peut être stimulée et prévenir la formation d'agrégats par l'augmentation de l'expression de Parkin [182-184].

Processus pathologiques de la MP	**Cibles pour la neuroprotection**
Stress oxydatif et dysfonction mitochondriale	Inhibiteur du métabolisme de la DA (ex. : inhibiteurs de la MAO, agonistes DAergiques) Stimulateurs du transport d'électron (ex.: CoQ10) Antioxydants (ex.: vitamine E, acide urique) Stimulateurs de la synthèse de glutathions (ex.: sélénium)
Agrégation et mauvais repliement des protéines	Inhibiteurs de l'agrégation de l'α-synucléine Agents réducteurs des niveaux d'α-synucléine Stimulateurs de la fonction de Parkin Stimulateurs de la fonction de UCH-L1 Stimulateurs des voies lysosomales et des protéasomes
Neuroinflammation	Agents anti-inflammatoires (ex. : NSAIDs, statines, minocycline)
Excitotoxicité	Antagonistes des récepteurs NMDA Antagonistes des canaux calcium
Apoptoses	Agents anti-apoptotiques
Perte de facteurs trophiques	Facteurs neurotrophiques (ex. : GDNF, neurturine)

Tableau 1.3 : Résumé des mécanismes impliqués dans la pathogenèse de la MP et leurs cibles thérapeutiques potentielles (Adapté de Yacoubian TA et coll., 2009) [185]

1.1.8 Les modèles animaux

Considérant la complexité de la MP, il n'est pas surprenant qu'un grand nombre de modèles ait été développés pour représenter les différentes sphères de la maladie. Ceux-ci peuvent être regroupés dans quatre catégories. Le premier type de modèle utilise une neurotoxine, telle que la 6-hydroxydopamine (6-OHDA), le BSSG[186] ou le MPTP. Le deuxième utilise des pesticides et herbicides, tels que le paraquat et la roténone. La troisième catégorie repose sur l'utilisation de méthamphétamine. Enfin, le quatrième type permet de représenter chez l'animal, des formes familiales de la MP, tels que celles impliquant l'α-synucléine, LRKK2, PINK1, Parkin et DJ-1. (Tableau 1.4)

	Modèle animal	Symptômes moteurs	Dommages nigrostriaux	Formation des corps de Lewy
Neurotoxine	MPTP (souris)	Légers	Perte des innervations DAergiques dans le striatum et dans la substance noire à forte dose	Non
	MPTP (primate)	Sévères	Perte des innervations DAergiques dans le striatum et dans la substance noire à forte dose	Oui
	6-OHDA (rat)	Mouvement de rotation	Perte des innervations DAergiques dans le striatum au site d'injection	Non
	BSSG (rat)	Diminution des mouvements en général	Perte des innervations DAergiques dans le striatum et dans la substance noire	Oui
Pesticides et herbicides	Roténone	Diminution des mouvements en général	Perte des innervations DAergiques dans le striatum et dans la substance noire	Oui
	Paraquat	Diminution des mouvements en général	Diminution de l'activité de la TH	Oui
Mutations génétiques	α-synucléine	Sévères dans le modèle A53T, moins important dans le modèle A30P	Non	Chez les animaux âgés
	LRKK2	Légers	Non	Non
	PINK1	Pas d'évidences	Non	Non
	PARKIN	Pas d'évidences	Faible perte des innervations DAergiques dans la substance noire	Non
	DJ-1	Diminution des mouvements en général	Non	Non

Tableau 1.4 : Résumé des principaux modèles utilisés pour étudier la MP. (Adapté de Blesa et coll, 2012 et de Blesa et coll, 2014) [187,188]

Modèle MPTP

Parmi tous ces modèles, aucun n'est parfaitement représentatif de la MP pour étudier la neuroprotection[189,190]. Néanmoins, le modèle de souris utilisant la neurotoxine MPTP est l'un des plus acceptés en plus d'être considéré comme l'étalon-or des modèles de la MP [32,191,192]. Cet analogue du narcotique mépéridine est très utilisé de manière systémique chez le singe et chez la souris pour induire une dégénérescence sélective des neurones DAergiques de la substance noire [193,194]. Cette toxicité est également présente dans l'intestin, puisqu'une diminution des niveaux d'expression de la TH des neurones DAergiques est observée [195]. Celle-ci est d'ailleurs dépendante de la composante inflammatoire induite par la neurotoxine [196,197]. Le MPTP est généralement injecté par voie intrapéritonéale chez la souris. Une fois dans le sang, celui-ci est converti en MPP+ par la MAO-B des cellules gliales. Le MPP+ utilise ensuite les transporteurs de la dopamine (DAT) pour entrer spécifiquement dans les neurones DAergiques, où il va bloquer le complexe I des mitochondries, ce qui induit l'inhibition de la synthèse de l'adénosine triphosphate (ATP) et stimule la production de ROS (Figure 1.7).

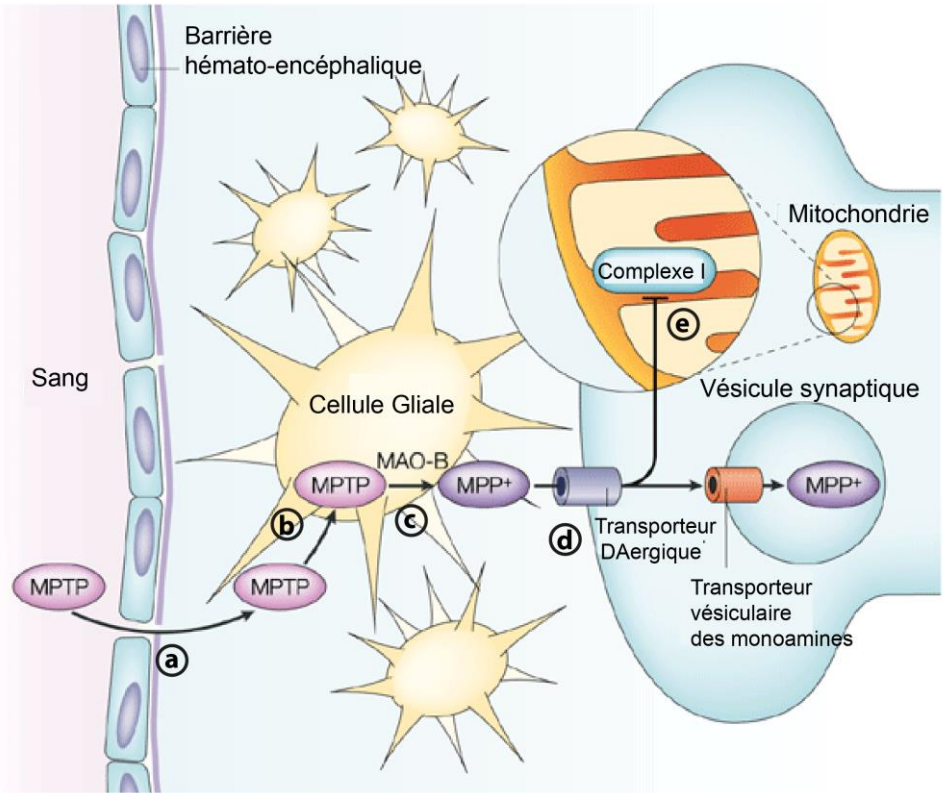


Figure 1.7 : Mécanisme d'action de la neurotoxine MPTP dans le modèle de la MP chez la souris. (Adaptée de Vila and Przedborski, 2003)[198]

Ce modèle présente plusieurs avantages. Il est reproductible, économique, rapide, permet de choisir le niveau de dénervation voulu en plus de représenter les composantes de l'inflammation et du stress oxydatif observés dans la MP. Puisque l'objectif de ce projet vise à protéger les neurones DAergiques au niveau intestinal, ce modèle est tout indiqué pour simuler une phase précoce de la MP. L'intérêt de ce modèle précoce est d'éviter que les mécanismes neuroprotecteurs ne puissent être défaillants dans un modèle trop aigu de la maladie.

1.2 Comparaison des systèmes nerveux central et périphérique

Le système nerveux périphérique (SNP) est formé de ganglions et de nerfs à l'extérieur du cerveau et de la moelle épinière[31]. Il assure principalement la communication entre les organes et le système nerveux central, mais peut aussi fonctionner de manière autonome sur différentes fonctions de l'organisme[31].

Différences et similitudes

Il existe quelques différences notables entre le système nerveux central et le SNP. La plus évidente est l'isolation mécanique du SNC par les os du crâne et de la colonne vertébrale contrairement au SNP qui ne possède aucune protection de la sorte. De plus, le SNC est isolé du système sanguin par la BHE, alors que le SNP est isolé par une barrière hémato-nerveuse (BHN) plus perméable[199] (Figure 1.8).

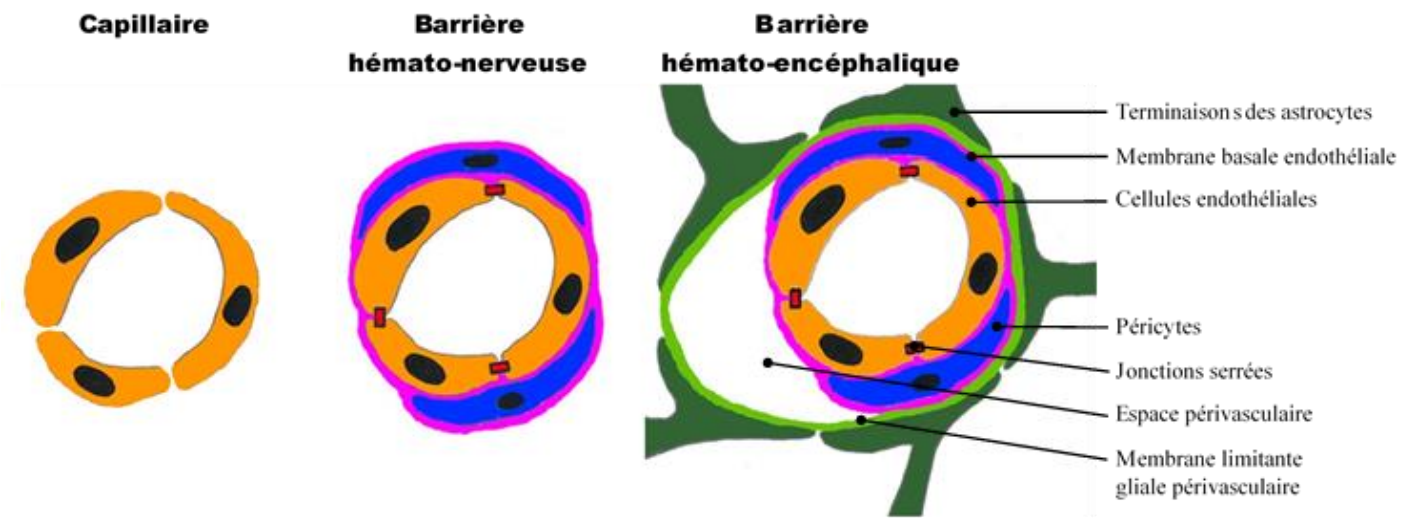


Figure 1.8 : Représentation schématiques des barrières hémato-nerveuse et hémato-encéphaliques. Les cellules endothéliales de la BHN et de la BHE sont connectées par des jonctions serrées et enveloppées dans une membrane basale, elle-même entourée de péricytes. La BHE comprend une deuxième membrane basale ainsi que les terminaisons des astrocytes qui enveloppent les éléments précédemment mentionnés. L'espace périvasculaire entre les deux membranes basales est présent dans les veinules post-capillaires et draine le LCR. (Adaptée de Kanda et coll, 2013)[200]

Néanmoins, dans l'intestin, les cellules gliales entériques assureraient une imperméabilité comparable à celle des astrocytes dans la BHE[201]. Au niveau cellulaire, le cerveau compterait environ 85 milliards de neurones[202] comparativement au SNE dont on estime la population neuronale à environ 100 millions. Le système nerveux central produit la moitié de la DA totale. L'autre moitié est produite par le SNE qui abrite une importante population de neurones DAergiques[202].

1.2.1 Le système nerveux entérique

Le SNE fait partie du SNP, lui-même subdivisé en système nerveux somatique et en système nerveux autonome (ou végétatif) [31]. Le premier intervient dans l'afférence des informations sensorielles en provenance des organes vers le cerveau ainsi que dans l'efférence des informations motrices du cerveau vers les muscles squelettiques[31]. Ce système ne sera pas abordé. De son côté, le SNA, comme son nom l'indique, assure les fonctions automatiques de l'organisme, telles que la digestion et la sudation[31]. Pour se faire, il possède deux systèmes généralement opposés, soit le système parasympathique qui est dit inhibiteur et le système sympathique qui active les fonctions

de l'organisme en réponse à un stress[31]. Le SNE est la composante du système nerveux autonome qui contrôle le système digestif[203].

Organisation et fonctions

Deux plexus ganglionnaires qui s'étendent sur toute la longueur du tube digestif composent le SNE, soit le plexus myentérique (ou plexus d'Auerbach) situé entre les couches musculaires longitudinale et circulaire ainsi que le plexus sous-muqueux (ou plexus de Meissner) situé entre la couche musculaire circulaire et la couche sous-muqueuse (Figure 1.9). Le premier est constitué de ganglions parasympathiques et de fibre sympathique qui lui permettent de contrôler la motricité du tube digestif, tel que le péristaltisme[203]. Ces ganglions présentent des caractéristiques similaires à l'environnement retrouvé dans le système nerveux central (SNC), soit la présence de cellules gliales, d'interneurones, une isolation de la circulation sanguine, de multiples mécanismes synaptiques et plusieurs neurotransmetteurs[203]. On observe 14 à 20% des neurones entériques DAergiques dans la région proximale du tube digestif alors que cette proportion diminue entre 1 et 6% dans la région distale de l'intestin grêle [204]. La DA sécrétée par ces neurones peut inhiber la motilité intestinale [204]. Le plexus sous-muqueux quant à lui n'est constitué que de fibres parasympathiques et contrôle les sécrétions de la muqueuse intestinale[203].

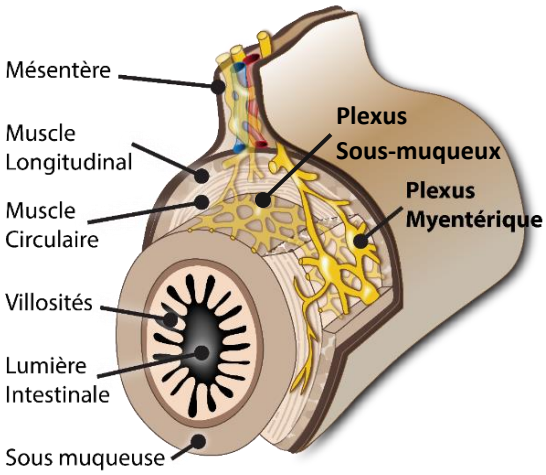


Figure 1.9 : Organisation du système nerveux entérique (Adaptée de Coté et coll, 2011) [196]

Axe intestin-cerveau

L'ensemble des voies de communications bidirectionnelles entre le cerveau et le tractus gastro-intestinal forment l'axe-intestin-cerveau. Le contrôle nerveux des fonctions gastro-intestinales peut être décomposé en quatre niveaux hiérarchiques impliquant à la fois des neurones intrinsèques et extrinsèques au tube digestif [205,206]. Le premier niveau est le SNE composé des deux plexus présentés précédemment [207]. Celui-ci contrôle les réflexes locaux, tels que le complexe moteur migrant et le péristaltisme[203]. Le second niveau est assuré par les ganglions prévertébraux qui modulent différentes fonctions viscérales périphériques [208]. Le troisième niveau fait intervenir une partie du système nerveux autonome dans la moelle épinière ainsi que le noyau du tractus solitaire et le noyau moteur dorsal du tronc cérébral[209]. Les fibres afférentes et efférantes reliant ces structures au SNE forment le nerf vague [209]. Enfin, le quatrième niveau implique les centres corticaux et sous-corticaux, incluant les ganglions de la base qui peut affecter une grande part des fonctions gastro-intestinales [206]. En plus du système nerveux, l'axe intestin cerveau est également contrôlé par le système immunitaire via la production de cytokines ainsi que par le système endocrinien via la production d'hormones[210,211].

1.2.3 L'hypothèse de Braak

En 2002, une étude a rapporté que la MP ne s'initiait pas dans la substance noire, puisque le tronc cérébral inférieur et la partie antérieure du bulbe olfactif étaient affectés à un stade plus précoce[212]. En 2003, cette même équipe c'est intéressée aux différents stades symptômatiques de la MP en fonction de la localisation des corps de Lewy[51]. Chez les patients en phase pré-symptômatique, les corps de Lewy et les neurites de Lewy étaient observés dans le noyau moteur dorsal et dans le locus coeruleus (Figure 1.10). Chez les patients présentant un début de symptômes moteurs, ces inclusions étaient également présents dans la substance noire et dans le mésocortex. Enfin, chez les patients souffrant d'un stade avancé de la maladie, les agrégats ont été observés jusqu'au néocortex. Ces observations sont à l'origine de l'hypothèse de Braak, selon laquelle, les processus pathologiques de la MP pourraient débuter au niveau intestinal[82] et remonter via le nerf vague jusqu'au cerveau.

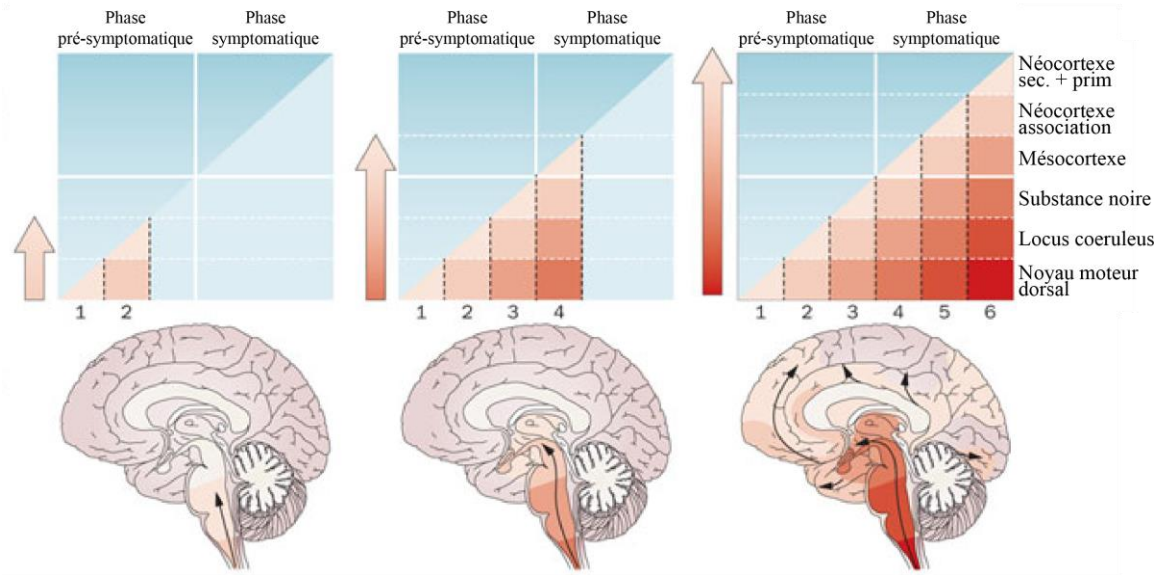


Figure 1.10 : Représentation de la localisation des agrégats d'α-synucléine en fonction des symptômes dans la MP. (Adaptée de Goedert et coll., 2013) [213]

1.3 Les plasmalogènes

Tel qu'abordé précédemment, certaines composantes de l'alimentation contribuent à prévenir ou a ralentir la MP. Au fil de l'évolution, l'organisme à su développer des mécanismes endogènes lui permettant de tirer profil de ces éléments nutritifs. En 1924, le terme plasmalogène a été attribué à un composant inconnu qui produisait un aldéhyde plasmatique, soit une chaîne carbonylée, après être traité à l'acide[214] (Figure 1.11). En 1957, ce composé fut classé dans la famille des glycérophospholipides avec comme caractéristique la présence d'une liaison vinyle éther sur le carbone un du glycérol[215]. Les plasmalogènes sont largement présents chez les bactéries anaérobiques ainsi que chez les différentes espèces de vertébrés et d'invertébrés[216]. Leur absence chez les bactéries aérobiques ainsi que chez la plupart des plantes et champignons suggère qu'ils aient disparu et réapparu au cours de l'évolution. Cette hypothèse s'appuie également sur le fait que leur biosynthèse varie entre les bactéries et les animaux[216]. Cette interruption dans l'évolution pourrait s'expliquer par la capacité de la liaison vinyle éther à se transformer par oxydation[216]. D'autre part, sa réapparition pourrait s'expliquer par la capacité des organismes plus évolués à l'utiliser de manière avantageuse de manière à permettre l'émergence de fonctions uniques chez les animaux[216].

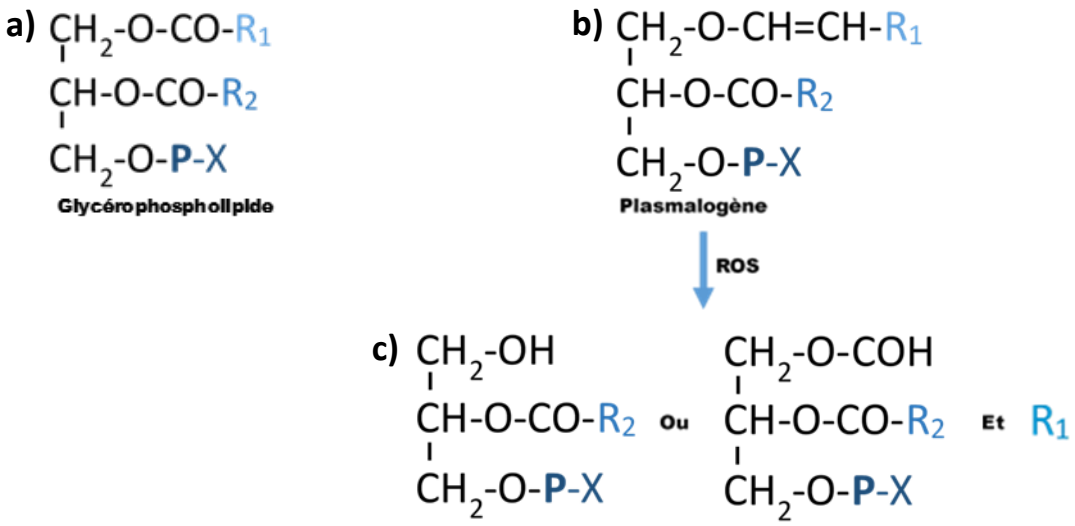


Figure 1.11 : Structure d'un a) glycérophospholipide et c) produits de l'oxydation d'un b) plasmalogène, où R_1 représente un acide gras ou un alcool gras pour le glycérophospholipide et un alcool gras pour le plasmalogène, R_2 représente un acide gras, P représente le phosphate et X représente le groupement polaire. (Adaptée de Braverman et coll, 2012) [217]

Des centaines de molécules lipidiques différentes constituent les membranes cellulaires chez les eucaryotes. Celles-ci sont regroupées dans trois principales catégories, soit les glycérophospholipides (GPL), les sphingolipides et les stérols[218]. Les GPL sont les plus abondants dans la grande majorité des tissus chez les mammifères[218]. Ceux-ci sont subdivisés en plus de 10 classes définies par le groupement polaire sur leur carbone 3[219]. Les principales classes sont les phosphatidylcholine (PC), les phosphatidyléthanolamines (PE), les phosphatidyl-nitrositols phosphatidylserines et les cardiolipines[218]. Les classes sont ensuite subdivisées en espèces en fonction de leurs deux chaînes de carbones. Si la chaîne carbonée est toujours liée par une liaison ester sur le carbone 2 du glycérol, celle sur le carbone un peut être liée par une liaison ester, éther ou vinyle dans le cas des plasmalogènes[219-222] (Figure 1.12).

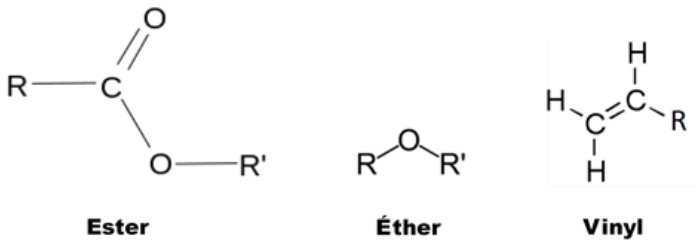


Figure 1.12 : Structures des liaisons ester, éther et vinyle

De plus, la longueur de ces chaines peut varier entre 14 et 24 atomes de carbone. Alors que la chaine sur le carbone 2 peut avoir de 0 à 6 liaisons doubles, celle sur le carbone 1 est saturée ou mono-insaturée[219-222]. Les implications de cette diversité ne sont pas encore entièrement comprises, mais se rapporteraient aux nombreuses fonctions des GPL[223]. Ces derniers jouent un rôle dans le maintien des propriétés physiques de la double couche membranaire telles que les transitions de phase de gel à fluide lors des changements de température, l'épaisseur de la double couche et sa densité[224]. Ils sont également nécessaires au bon fonctionnement des protéines membranaires, à l'élimination des radicaux libres et à la génération de seconds messagers lipidiques. Les fonctions uniques des plasmalogènes sont directement en lien avec la liaison vinyle éther en position un et à l'acide gras polyinsaturé en position deux. Ces propriétés seront abordées dans la section portant sur les rôles physiologiques.

1.3.1 Structure

Les plasmalogènes sont des étherlipides constitués d'une base glycérol, à laquelle sur le premier carbone se lie un alcool gras par une liaison vinyle-éther[225]. Un acide gras est lié au deuxième carbone et un alcool azoté ou non tel que la choline, l'éthanolamine, la sérine ou l'inositol est lié au troisième carbone par l'intermédiaire d'un phosphate[225]. La nature des chaînes de carbones sur les positions un et deux du glycérol formeront des sous-classes de diacyl et éther glycérophospholipides (Figure 1.13). Les diacyl-glycérophospholipides sont les plus communs et ont un acide gras en position un sur le glycérol[226]. Les éther-glycérophospholipides sont moins abondants et se caractérisent par leur alcool gras lié par une liaison éther en position un sur le glycérol[226]. Les alcools gras utilisés sont essentiellement des chaines de carbone saturées (C16:0) ou saturées et mono-insaturées (C18:0, C18:1) liées par une liaison 1-O-alkyle éther non modifiée pour former un plasmanyl glycérophospholipide, aussi appelé étherlipide, ou par une liaison 1-O-alkenyl éther (vinyle éther) pour former un plasmalogène[226,227]. Le premier chiffre dans les parenthèses indique le nombre de carbones formant la chaîne et le deuxième indique le nombre de liaisons doubles dans celle-ci.

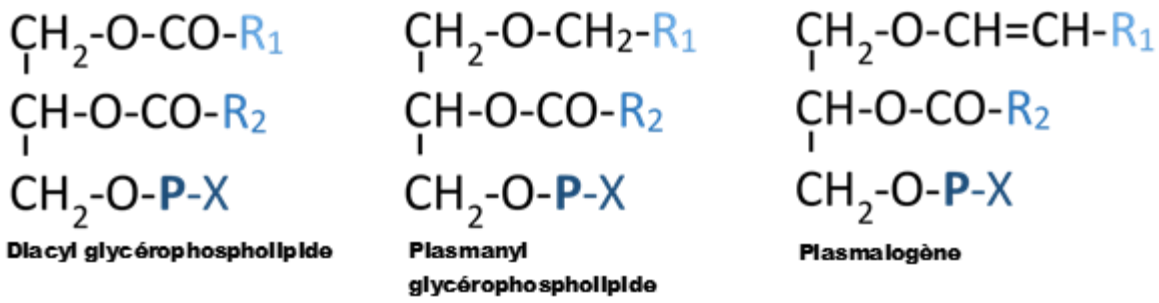


Figure 1.13 : Structures du diacyl glycérophospholipide, du plasmanyl glycérophospholipide (étherlipide) et du plasmalogène, où R_1 représente un acide gras ou un alcool gras pour le diacyl glycérophospholipide et un alcool gras pour le plasmanyl glycérophospholipide et le plasmalogène, R_2 représente un acide gras, P représente le phosphate et X représente le groupement polaire. (Adaptée de Brites et coll, 2004) [228]

Les éther-glycérophospholipides sont en grande majorité des plasmalogènes[226]. L'acide gras sur le carbone deux du glycérol est spécifiquement un DHA ou un AA.

Au niveau biochimique, l'acide gras en position un est toujours perpendiculaire à la membrane plasmique (Voir R1, Figure 1.13). Par contre, chez les diacyl glycérophospholipides l'acide gras en position 2 des diacyle-glycérophospholipides a une courbure qui augmente l'aire de surface transversale (Voir R2, Figure 1.13). Chez les plasmalogènes à groupement éthanolamine, des analyses par spectroscopie RMN montrent l'absence de cette courbure[229,230]. Ainsi, dans les plasmalogènes, les chaînes en position 1 et 2 sont presque parallèles, ce qui augmente leur longueur et l'ordre dans la membrane en diminuant sa fluidité. Cette caractéristique favorise la formation de phase mono couche à des températures moins élevées qui sont nécessaires à la fusion et à la fission cellulaires. De plus, dans le diacyle-glycérophospholipide, un composé carbonyle est présent sur la position un du glycérol. L'absence de ce groupement chez les plasmalogènes, due à leur liaison vinyle-éther les rend moins hydrophobe. En raison de leurs propriétés, les plasmalogènes pourraient être impliqués dans les différentes fonctions des radeaux lipidiques. Il s'agit de microdomaines lipidiques de la membrane plasmique qui sont enrichis en cholestérol et en sphingomyéline, un sphingolipide [231]. Le cholestérol y est 3 à 5 fois plus concentré que dans la membrane plasmique en général[231]. Ceux-ci agissent comme une colle dynamique en maintenant l'intégrité du radeau lipidique[232]. De son côté, la sphygomyéline y est 1,5 fois plus concentrée [233]. Une étude réalisée sur des cellules CHO a rapporté que les plasmalogènes y étaient 1,7 fois plus concentrés[234]. Cette région membranaire contient des protéines impliquées dans la signalisation cellulaire, la communication

entre les cellules et l'endocytose. Les plasmalogènes pourraient faciliter les changements de phase de la membrane et les mécanismes de transduction de signal.

1.3.2 Distribution

Environ 15 à 20% des phospholipides totaux composant les membranes cellulaires sont des plasmalogènes[235]. Ceux-ci se retrouvent en grande quantité dans le cerveau et le cœur[235]. Ils sont également présents en quantités notables dans les reins, les poumons et les muscles squelettiques[235]. Ils seraient également abondants au niveau intestinal [236]. Certaines cellules sont préférentiellement plus riches en plasmalogènes, telles que les neutrophiles et les éosinophiles[235]. Au niveau intracellulaire, ils se retrouvent principalement dans les membranes du noyau, du réticulum endoplasmique, du compartiment post-golgien et des mitochondries, mais n'ont pas été détectés dans les peroxysomes[234]. Certaines membranes spécialisées telles que les vésicules synaptiques en sont également enrichies[237,238].

Les niveaux de plasmalogènes dans les tissus varient en fonction de l'âge. Chez le nourrisson, la teneur en plasmalogène est significativement plus basse que chez les enfants plus âgés[239]. Dans cette étude, les plasmalogènes ont été mesurés sur des échantillons sanguins prélevés chez 25 nouveau-nés ainsi que sur des échantillons sanguins de 15 enfants âgés de un an à huit ans comme groupe contrôle[239]. Les taux de plasmalogène ont été mesurés par chromatographie en phase gazeuse dans un extrait lipidique des membranes des globules rouges[239]. De l'enfance, jusqu'à l'âge de 30 ans, le niveau total de plasmalogènes va augmenter très rapidement en parallèle avec le développement de la myéline et atteindre un niveau maximal[240]. Par la suite, la teneur en plasmalogène dans les tissus est portée à diminuer avec le vieillissement[241,242].

1.3.3 Biosynthèse

La voie de synthèse de l'ensemble des étherlipides s'initie du côté de la lumière des peroxysomes[228]. Celle-ci fait intervenir des enzymes peroxisomales, la glycéronephosphate O-acyltransférase (GNPAT) et l'alkylglycérone phosphate synthase (AGPS) [217] (Figure 1.14).

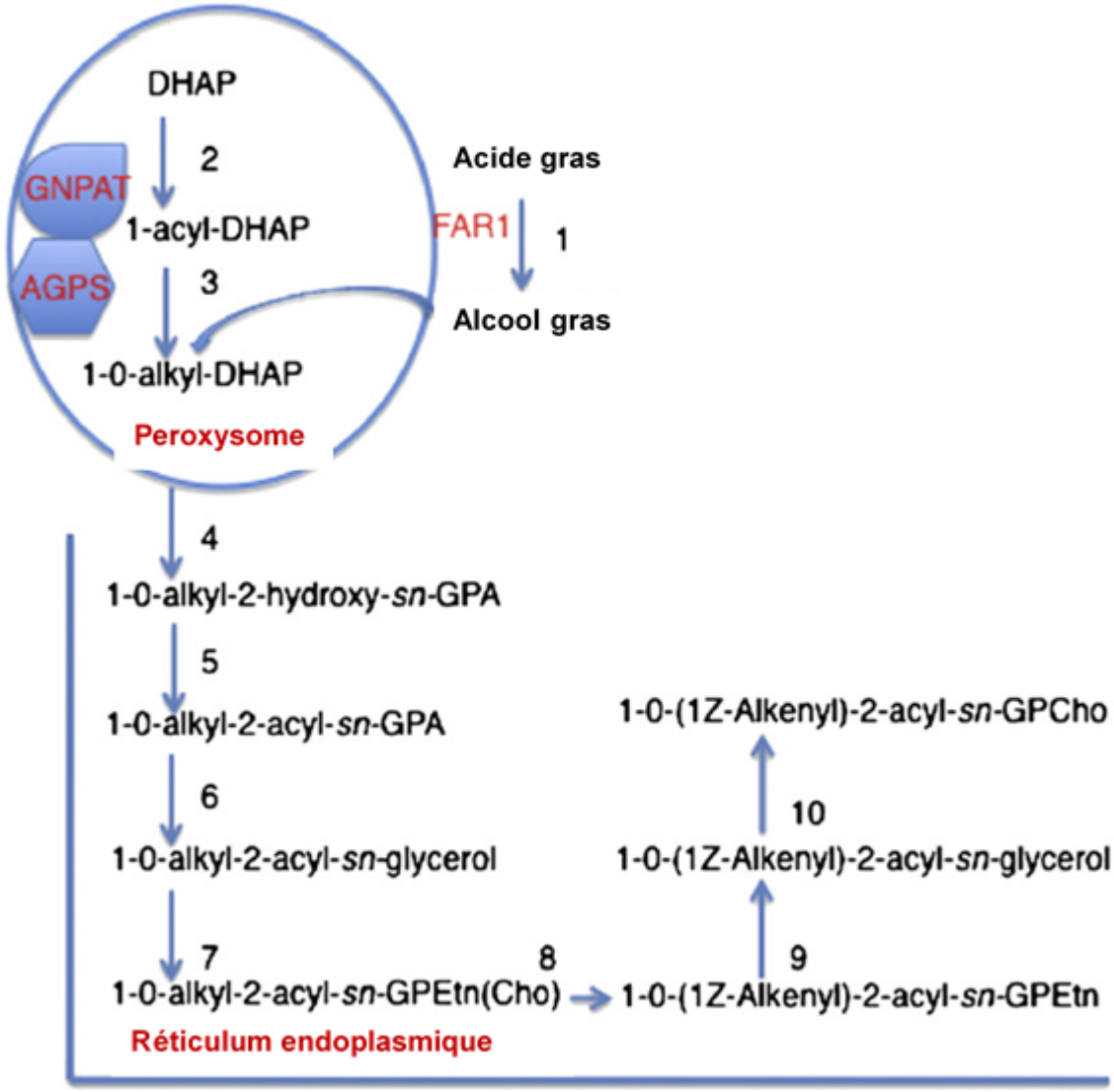


Figure 1.14 : Voie métabolique de la synthèse des plasmalogènes à groupement éthanolamine. Les enzymes sont : 1) alcool gras réductase 1, 2) glycerone phosphate O-acyltransferase, 3) alkylglycerone phosphate synthase, 4) alkyl/acyl DHAP réductase, 5) alkyl/acyl glycerophosphate acyltransférase, 6) phosphatidic acid phosphatase, 7) ethanolamine (choline) phosphotransferase, 8) plasmenylethanolamine desaturase, 9) phospholipase C et 10) choline phosphotransferase. (Adaptée de Braverman et coll, 2012) [217]

Le dihydroxyacétone phosphate (DHAP), soit un phosphate attaché sur un glycérol est le précurseur initial de la formation des plasmalogènes[243]. La première étape de sa transformation qui se déroule dans la lumière du peroxysome est l'ajout d'un groupement acyle, soit une acylation, par l'enzyme GNPAT à la position 1 du glycérol pour former la 1-acyle-DHAP. En parallèle, sur la face cytosolique de la membrane des peroxysomes, l'enzyme «fatty acyl-CoA reductase 1» (FAR1) une

réductase d'acides gras qui réduit préférentiellement les acides gras «fatty acyl-CoAs C16 et C18» (Figure 1.15), en alcool gras (Figure 1.16)[244]. À noter que le cerveau et la muqueuse intestinale qui synthétisent une importante quantité de plasmalogènes présentent une forte activité de cette enzyme[245,246].

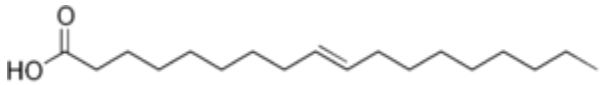


Figure 1.15 : Représentation d'un acide gras (C18:1)

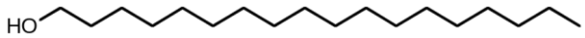


Figure 1.16 : Représentation d'un alcool gras (C18:0)

Ensuite, à l'intérieur du peroxysome, l'enzyme AGPS permet l'échange du groupement acyle par cet alcool gras lié par une liaison éther sur le carbone un du glycérol pour former le 1-O-alkyl-DHAP[243,247-252] (Figure 1.17).

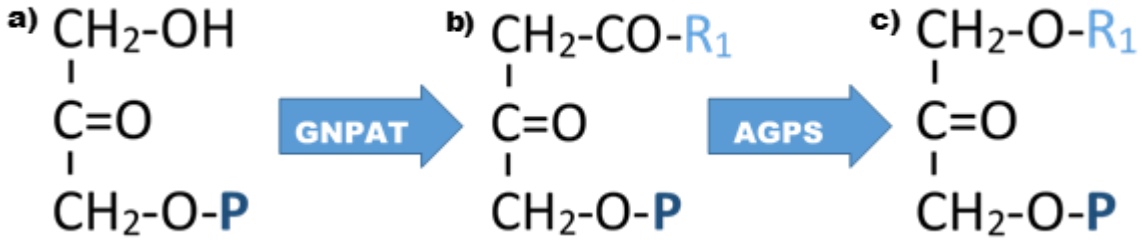


Figure 1.17 : Représentation des étapes initiales de la biosynthèse des plasmalogènes endogènes dans le peroxysome. a) DHAP, b) 1-acyl-DHAP et c) 1-O-alkyl-DHAP (Adaptée de Kanzawa et coll, 2009) [248]

Les étapes subséquentes nécessaires à la maturation du plasmalogène se déroulent dans le réticulum endoplasmique. En sortant du peroxysome, le 1-O-alkyle-DHAP est réduit en 1-O-alkyl-2-hydroxy-sn-glycérophosphate (GPA) par une enzyme membranaire ayant une activité acyle/alkyle-DHAP réductase [253]. Ensuite, une enzyme alkyle/ acyle-GPA acyl transférase ajoute un groupement acyl sur le carbone deux du glycérol, suite à quoi, le phosphate en position trois est détaché par une

acide phosphatidique phosphatase pour former le 1-O-alkyle-2-acyle-glycérol. Cette molécule est ensuite transformée en 1-O-alkyl-2-acyl-sn-GPEtn par l'éthanolamine phosphotransférase en présence de cytidine diphosphoéthanolamine ou en 1-O-alkyl-2-acyl-sn-GPCho par la choline phosphotransférase en présence de cytidine diphosphocholine[254]. À ce stade, seul le 1-O-alkyl-2-acyl-sn-GPEtn peut poursuivre sa transformation vers le plasmalogène[254]. Les carbones 1 et 2 de son groupement alkyle sont déshydrogénés via un cytochrome b5 et une plasmenyléthanolamine désaturase pour formé la liaison vinyle éther des plasmalogènes[254]. Il n'existe pas de plasménylcholine désaturase, se qui explique l'incapacité du 1-O-alkyl-2-acyl-sn-GPCho à former un plasmalogène[254] (Figure 1.18). Les plasmalogènes avec un groupement choline doivent donc être synthétisés à partir des plasmalogènes avec un groupement éthanolamine, mais ne seront pas abordés.

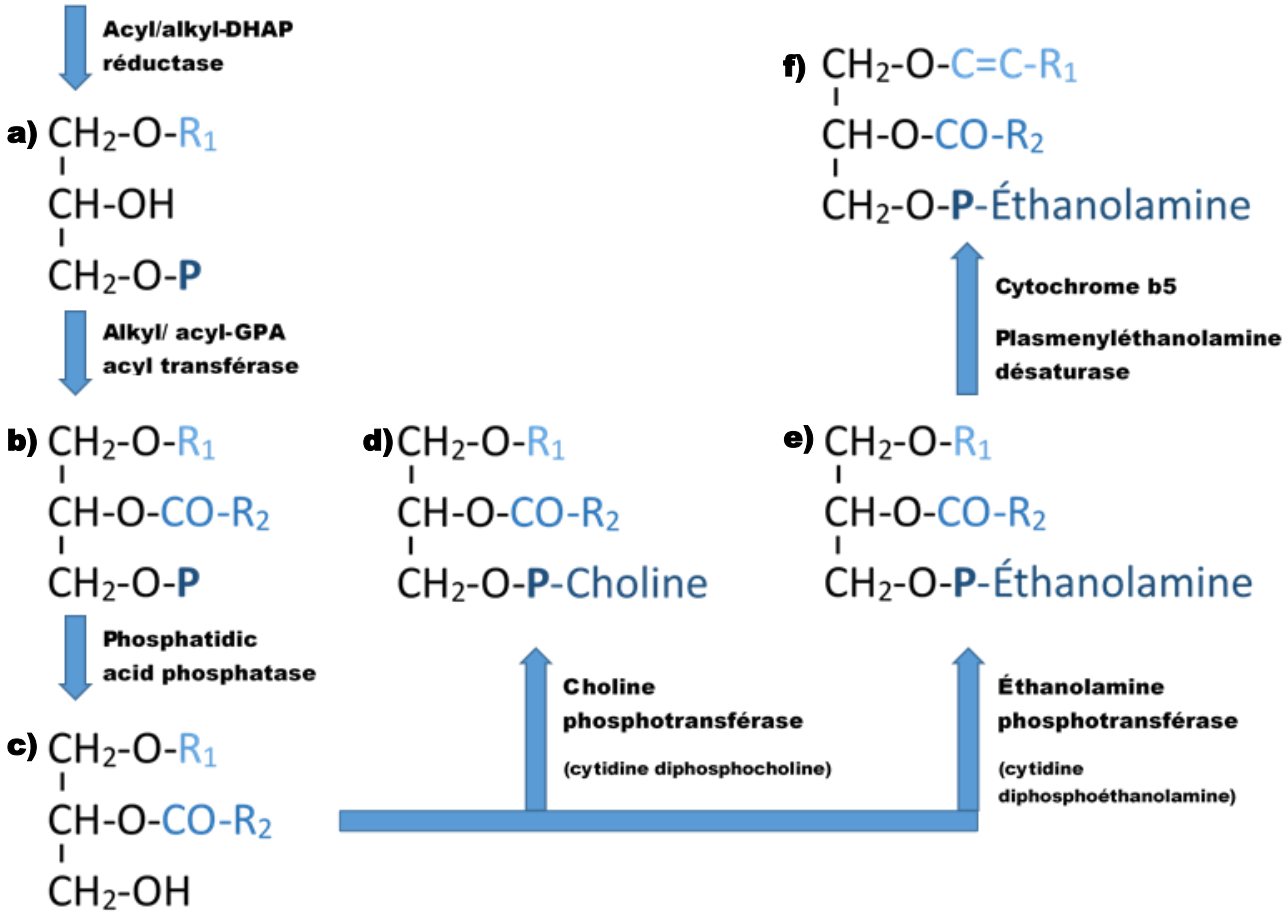


Figure 1.18 : Représentation des étapes de la biosynthèse des plasmalogènes endogènes dans le réticulum endoplasmique à partir du produit (c) de la figure 1.17. a) GPA, b) 1-O-alkyl-2-acyl-sn-GPA, c) 1-O-alkyle-2-acyle-glycérol, d) 1-O-alkyl-2-acyl-sn-GPCho, e) 1-O-alkyl-2-acyl-sn-GPEtn et f) plasmalogène (Adaptée de Braverman et coll, 2012) [217]

1.3.4 Régulation

La composition membranaire en plasmalogène est contrôlée par la synthèse, telle qu'abordée précédemment, mais aussi par le remodelage et la dégradation. Il existe plusieurs mécanismes de remodelage et de dégradation des plasmalogènes[228]. Par exemple, la lysoplasmalogénase catalyse spécifiquement le clivage de la liaison vinyle-éther sur le carbone un des plasmalogènes, libérant un aldéhyde gras et un GPEtn ou un GPCho[228]. Le GP peut être ré-acylé pour former le GP diacyle correspondant. De son côté, l'aldéhyde gras libéré peut être oxydé pour former un acide gras ou être réduit pour former un alcool gras. La lysoplasmalogénase est importante dans la régulation des niveaux de plasmalogènes. Son activité spécifique aux différents tissus est plus active dans le foie et dans l'intestin grêle [255,256].

La phospholipase A2 hydrolyse sélectivement le carbone 2 du glycérol des plasmalogènes [218]. Suite au détachement du groupe acyle du carbone 2 du glycérol, des lysophospholipides acyltransférases vont remplacer cette chaine carbonnée par une autre. Son activité est également plus élevée dans le foie et dans l'intestin grêle[255].

La phospholipase C est une autre enzyme qui hydrolyse la liaison entre le phosphate et le glycérol, alors que la phospholipase D hydrolyse la liaison entre le phosphate et le groupe de la tête. Une fois relâché, ces groupements agissent comme messagers lipidiques en parallèle avec le diacyl GP: 1-O- (1Z-alcényl) -2-lyso-sn-GPEtn et 1-O- (1Z-alcényl) -2-lyso-sn-GPCho , 1-O- (1Z-alcényl) -2-lyso-sn-GPA et 1- 0- (1Z-alcényl) -2-lyso-sn-glycerol. Les liaisons éther des alkyle-glycérols peuvent être oxydées par la monooxygénase alkyle-glycérol. Cette réaction libère l'aldéhyde gras et aboutit à un groupe hydroxyle libre sur le carbone un[257].

La principale étape limitante à la formation des plasmalogènes serait la production d'alcools gras par l'enzyme FAR1[217] (Figure 1.13). Bien que le mécanisme reste à découvrir, cette enzyme est rétrorégulée par les niveaux de plasmalogènes dans les cellules et peut être dégradé lorsque la concentration en plasmalogène est importante[258]. Néanmoins, les alcools gras pourraient aussi dériver directement de l'alimentation[217].

1.3.5 Transport

Le transport des lipides membranaires produits dans le réticulum endoplasmique vers les organelles et les membranes plasmiques peut se faire via l'appareil de Golgi et les endosomes ou encore à l'aide de lipoprotéines[234]. Cette dernière voie seraient dépendante des niveaux d'ATP cellulaire[234].

1.3.6 Rôles physiologiques

Les plasmalogènes ont un fort potentiel oxydatif, en raison de l'atome d'hydrogène adjacent à la liaison vinyle éther dont l'énergie de dissociation est particulièrement faible[259]. (Fig 1.12) Les plasmalogènes sont consommés lors de cette réaction et ne propagent pas l'oxydation aux lipides insaturés[260]. Cette propriété permettrait d'éviter l'oxydation des acides gras polyinsaturés et d'autres lipides membranaires[260]. (Fig 1.10)

La présence d'AA ou de DHA en position deux sur le glycérol permettrait aux plasmalogène de jouer un rôle de réservoir de médiateurs lipidiques pouvant être relâchés suite à une hydrolyse par la phospholipase A2[218]. L'AA est un précurseur de prostaglandines, de thromboxanes et de leukotriènes[261]. Le DHA quant à lui peut agir comme substrat à différents seconds messagers tels que les résolvines, les docosatriènes et les neuroprotectines[261]. Celui-ci sera abordé dans la section sur les oméga-3.

Les plasmalogènes ayant une chaine de carbone insaturé en position deux sont abondants dans la matière grise, où ils facilitent les événements de fusion membranaire et la communication cellulaire[235]. Les plasmalogènes ayant une chaine de carbone saturée ou mono-insaturée sur le carbone deux du glycérol prédominent plutôt dans la myéline où ils jouent un rôle dans la stabilité membranaire[235].

1.3.7 Déficience dans différentes pathologies

Chez les mammifères, les concentrations de GPL sont maintenues dans des limites étroites, puisque l'écart avec la composition optimale est néfaste pour les cellules[262]. Ainsi, peu de maladies génétiques avec une composition de phospholipides altérée sont connues chez l'humain et les invalidations géniques des enzymes clés de la biosynthèse des phospholipides ont des effets embryonnaires létaux ou compromettants chez la souris[262].

Il existe deux maladies héréditaires caractérisées par un dysfonctionnement des peroxysomes, soit la Chondrodysplasie ponctuée rhizomélique (RCDP) [263] et le syndrome de Zellweger[264]. Tel que mentionné précédemment, la synthèse des plasmalogènes débute dans les peroxysomes. Ainsi, un dysfontionnemet de ceux-ci entrainera entre autres une carence en plasmalogènes. Bien que l'espérance de vie des patients atteints de la RCDP soit dramaticalement écourtée, les phénotypes de cette maladie ont fourni des éléments importants dans la compréhension du rôle des plasmalogènes. Par exemple, des altérations structurales dans les membranes ont été observées dans une culture primaire de fibroblaste de patients atteints de la maladie RCDP[265]. Cette étude a rapporté une diminution du nombre et de la taille des cavéoles, un sous-type de radeau lipidique, un aplanissement des invaginations membranaires recouvertes de clathrine, une dilatation du réticulum endoplasmique, une accumulation de protéines dans l'appareil de Golgi, une accumulation de cholestérol dans les structures périnucléaires et une diminution du nombre de récepteurs de transférine dans les dépressions membranaires recouvertes de clathrine[265]. Une autre étude réalisée sur des cellules de patients RCDP et Zellweger ainsi que sur des cellules CHO déficientes en AGPS a rapporté une diminution de la transduction de signal muscarinique et cholinergique[266].

Au niveau immunologique, une étude a rapporté que les fibroblastes des patients RCDP expriment cinq fois moins de récepteurs à l'interleukine-1 (IL-1) sur leur membrane cellulaire par rapport aux lignées cellulaires contrôles[267]. L'IL-1 est une cytokine impliquée dans différents processus inflammatoires dont la transmigration des cellules immunitaires[267]. Par contre, des niveaux significativement plus élevés de prostaglandines E2 un autre facteur pro-inflammatoire ont été rapporté dans ces mêmes cellules[267].

Plusieurs études *in vitro* ont rapporté le rôle antioxydant des plasmalogènes[268-270]. Par exemple, une étude a rapporté que les cellules CHO déficientes en plasmalogènes étaient plus sensibles à la mort cellulaire induite par l'oxygène singulet et les radicaux libres que les cellules de type sauvage[268]. Ces cellules sont une lignée cellulaires provenant d'ovaires de hamster. Dans cette étude, les plasmalogènes des cellules CHO sauvages étaient spécifiquement dégradés en présence des facteurs oxydatifs. Ces études indiquent que l'oxydation atteint plus facilement la liaison vinyle-éther et serait à l'origine de la consommation préférentielle des plasmalogènes sous stress oxydatifs, par rapport aux liaisons doubles des autres lipides membranaires. Cet effet était réversible avec l'ajout d'un précurseur de plasmalogène ajouté dans le milieu de culture cellulaire[269]. Toutefois, bien que le déficit en plasmalogène puisse être associé à une plus grande

sensibilité aux ROS, l'association avec des niveaux de ROS supérieurs n'est pas encore bien définie dans ces cellules. Par exemple, une étude réalisée sur des fibroblastes de patients RCDP et Zellweger n'a pas rapporté d'augmentation de ROS dans ces cellules par rapport à des cellules sauvages suite à l'ajout de radicaux libres dans le milieu[271]. À l'inverse, une étude réalisée sur des cellules gliales de rat dont les niveaux de GNPAT étaient réduits via des ARN interférents a rapporté une augmentation des ROS[272]. Enfin, une étude réalisée sur des cellules endothéliales pulmonaires humaines a observé une diminution de la mort cellulaire en condition d'hypoxie associée à une diminution des ROS suite à l'ajout de plasmalogènes[273].

Implications dans la maladie de Parkinson

Alors que la sévérité de la maladie d'Alzheimer, une autre maladie neurodégénérative, corrèle avec la diminution des plasmalogènes[274,275], cette corrélation n'a pas été observée dans le noyau caudé et la substance noire chez les patients Parkinsoniens[274,275]. Toutefois, dans la MP, une baisse de plasmalogène a été rapportée dans le plasma[276]. Cette dernière étude comprenait 30 patients atteints de la MP et 37 individus contrôles, tous agées de 61 ans et plus. Les critères d'exclusion utilisés chez ces participants comprenaient des valeurs hématologiques ou hépatiques anormales, la présence d'infractus du myocarde ou d'accident vasculaire cérébral, les maladies cardiovasculaires, l'hypertension, le diabète, l'hyperuricérimie, la présence d'infections et d'inflammation définie par un niveau de protéine C-réactive sérique de 10 mg/L ou plus, la malnutrition et l'alcoolisme. De même, les participants ne devaient pas être atteints d'une autre maladie neurodégénérative, suivre une diète spéciale, prendre des suppléments d'anti-oxydants ou de drogues connues pour affecter le système immunitaire. Néamoins, les participants utilisant des médicaments antiparkinsoniens, de l'acide acétylsalicilique (100 mg) ou des statines étaient inclues. Brièvement, la méthode de mesure des plasmalogènes consistait d'abord à extraire et à fractionner les classes de lipides des échantillons de plasma lyophilisés contenant de l'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) en utilisant des colonnes de gel de silice. Les fractions isolées de phospholipides totaux ont ensuite été transestérifiés avec du borontrifluoride et du méthanol, donnant des mélanges d'esters méthyliques d'acides gras (FAME) et d'aldéhyde gras dérivé de plasmalogène (DMA). Ces mélanges ont été mesurés en utilisant une chromatographie gazeuse capillaire programmée en température sur une colonne WCOT BPX70 de 50 m.

Une baisse de plasmalogènes a également été rapportée dans les radeaux lipidiques au niveau cérébral[277]. Cette étude comprenait huit patients atteints de la MP âgés de 73,9 ans en moyenne

ainsi que 11 individus contrôles âgés de 75,5 ans en moyenne. Les participants du groupes contrôle ne présentaient aucun signes, symptômes ou anormalitées neurologiques. Les patients parkinsoniens présentaient une courte histoire de symptômes moteurs. La sélection de patients présentant des symptômes moteurs modérés visait à minimiser les effets concomitants de la médication à long terme. Dans les deux groupes, la cause de la mort était de nature infectieuse, tel qu'une pneumonie ou encore due à un infractus ou un carcinome. Suite à l'isolation des radeaux lipidiques, les esters méthyliques d'acides gras ont été séparés et quantifiés en utilisant un chromatographe en phase gazeuse Shimadzu GC-14A équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (250 ° C) et d'une colonne capillaire en silice fondue Supelcowax™ 10.

1.3.8 PPI-1011

Structure et origine

Le PPI-1011 est un précurseur de plasmalogène développé par la compagnie Med-Life Discoveries, antérieurement Phenomenome Discoveries Inc.[278] (Figure 1.19). Il est formé d'un glycérol auquel s'attache deux chaines et une tête polaire, soit l'acide palmitique par une liaison éther, le DHA et l'acide lipoïque. L'acide palmitique joue un rôle dans la synthèse des plasmalogènes endogènes[217]. Quant au DHA, il présente différents effets neuroprotecteurs associés à la MP[279-284] qui seront abordés dans la section 1.4.1. Enfin, l'acide lipoïque aurait lui aussi des effets antioxydants et anti-inflammatoire[281] en plus de servir à stabiliser le précurseur oral[217].

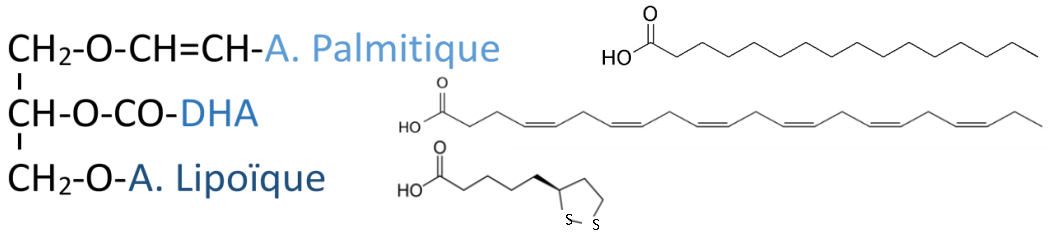


Figure 1.19 : Structure chimique du PPI-1011, de l'acide palmitique, de l'acide docosahexaénoïque et de l'acide lipoïque

Pharmacocinétique

Le PPI-1011 n'est pas un précurseur endogène des plasmalogènes, tel que présenté dans la biosynthèse des plasmalogènes. Toutefois, hormis la première étape qui consiste à cliver l'acide lipoïque via une lipase intestinale, le PPI-1011 utilise les mêmes mécanismes de biosynthèse, soit à partir de c) dans la figure 1.17[285] (Figure 1.20).

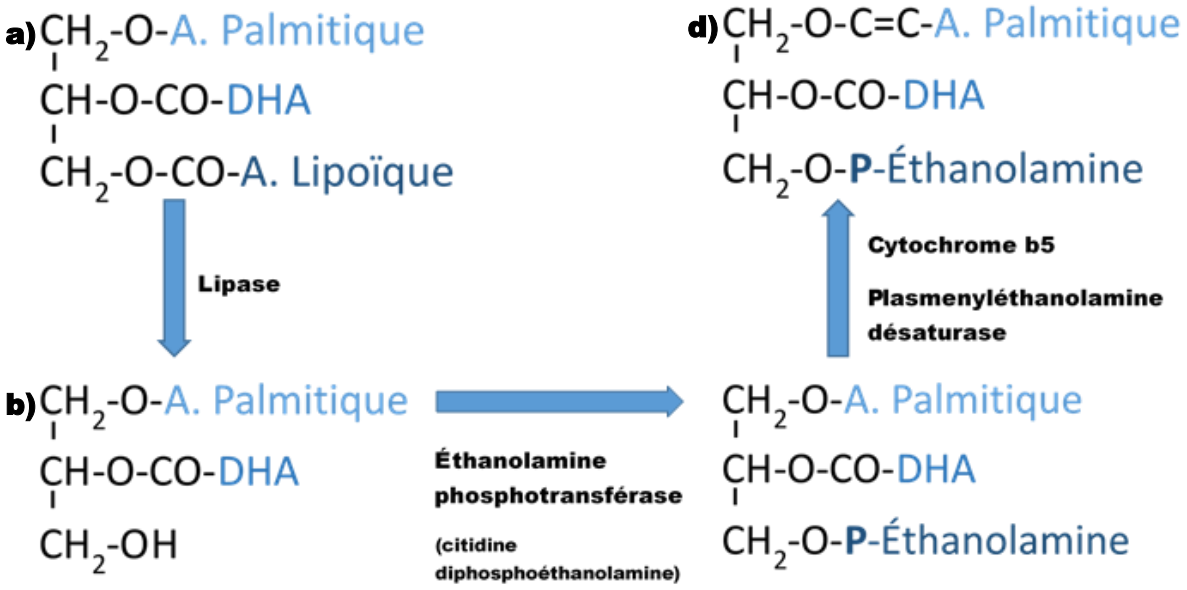


Figure 1.20 : Représentation des étapes de la biosynthèse des plasmalogènes dans le réticulum endoplasmique à partir du PPI-1011. a) PPI-1011 (C16:0, C22:6), b) 1-O-alkyle-2-acyle-glycérol, c) 1-O-alkyl-2-acyl-sn-GPEtn et d) plasmalogène (C16:0, C22:6) (Adaptée de Wood et coll, 2011)[285]

Une étude réalisée chez le lapin a rapporté que 10 heures après l'administration de PPI-1011, un pic de plasmalogènes et de DHA était observé dans le plasma[285]. Les niveaux de plasmalogènes étaient par la suite maintenus jusqu'à au moins 50 heures, alors que les niveaux de DHA ont diminués[285].

Une autre caractéristique qui rend le modèle MPTP tout indiqué pour l'évaluation des effets neuroprotecteurs du PPI-1011 est la diminution significative des plasmalogènes dans le plasma chez la souris[286]. L'administration du précurseur oral permet de maintenir les niveaux de plasmalogènes aux niveaux contrôles (Figure 2.1).

Effets neuroprotecteurs

Les effets neuroprotecteurs du PPI-1011 ont déjà été rapportés dans le cerveau chez les mêmes souris utilisées pour ce projet[286]. Dans le protocole de neuroprotection, les doses de 10 et 50 mg/kg ont permis de protéger les niveaux de DA dans le striatum[286]. Les niveaux des transporteurs DAT et vésiculaires monoaminergiques 2 (VMAT2) ont également été maintenu à des niveaux contrôles, mais seulement avec la dose de 50 mg/kg[286]. La dose de 200 mg/kg n'a pas donné d'effets. Dans le protocole de neuroprotection post-lésion, seule la dose de 50 mg/kg du PPI-1011 a protégé partiellement les niveaux de DA dans le striatum[286]. Aussi, bien que cette dose n'ait que partiellement protégé les niveaux de VMAT2, les niveaux de DAT se sont maintenu aux niveaux contrôles dans le striatum[286].

Effets anti-dyskinétiques

La dyskinésie est l'effet secondaire le plus important de la L-DOPA, tel qu'abordé précédement. Une étude a comparée l'effet anti-dyskinétique du PPI-1011 à celui du DHA, un oméga-3[287] chez des singes ayant reçu du MPTP et de la L-DOPA pour reproduire la dyskinésie[288]. La dose de 100 mg/kg de DHA présentait un effet antidyskinétique au jour 10 comparativement au jours deux pour la dose de 50 mg/kg de PPI-1011, suggérant les plasmalogènes comme cible thérapeutique de premier choix pour la prise en charge des dyskinésies chez les patients parkinsoniens. Une seconde étude a permis de rapporter que l'effet antidyskinétique du PPI-1011 n'affecte pas l'effet antiparkinsonien de la L-DOPA chez le singe [289]. De plus, ses effets anti-dyskynétiques persistaient après l'arrêt de l'apport en PPI-1011[289].

1.4 Les acides gras oméga 3

Les oméga-3 sont des acides gras polyinsaturés qui font partie des acides gras essentiels[290]. L'organisme humain n'est pas en mesure de les produire et doit donc les assimiler via

l'alimentation[290]. Les trois principaux oméga-3 sont, l'acide alpha linolénique (ALA) (C18:3), l'acide eicosapentaénoïque (EPA) (C20:5) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) (C22:6) [291]. Les ALA se retrouvent dans plusieurs aliments, tels que l'huile et les graines de lin, le colza, le chia, le lin, les noix, le soja, les germes de blé, les légumes à feuilles vertes, les fruits, les fruits secs et les algues[292]. De leur côté l'EPA et le DHA sont uniquement d'origine aquatique[290]. Certains poissons gras en contiennent en grandes quantités, tels que le saumon, le maquereau, la sardine et la truite[292]. Bien que ces poissons ne produisent pas ces acides gras, ils l'accumulent dans leurs tissus en consommant des micros-algues et des plus petits poissons qui en ont eux-mêmes consommé et accumulé[293,294]. Néanmoins, le foie possède les mécanismes nécessaires à la conversion de l'ALA en EPA et en DHA[295-297]. Leur étude est intéressante, puisqu'ils sont beaucoup plus abordables que les produits de synthèse. L'ALA et l'EPA ne peuvent pas s'accumuler dans le cerveau contrairement au DHA[295-297].

1.4.1 DHA

À ce jour, plusieurs effets neuroprotecteurs du DHA ont été rapportés entre autres dans le modèle MPTP chez la souris[298,299] et chez le rat[300]. Ces effets seraient attribuables à sont activité antioxydante[279,301-303], à sa capacité d'augmenter l'activité de la glutathion réductase[301] et de la glutathion peroxydase favorisant une diminution de l'accumulation de protéines oxydées[279,304] ainsi qu'à sa capacité d'inhibition des processus apoptotiques des neurones[279,305-307]. Le DHA a également des effets anti-inflammatoires[303,306,308,309] pouvant provenir à la fois de sa forme originale et de ces différents dérivés.

Effets neuroprotecteurs

Une étude de 2008 utilisant le modèle MPTP chez la souris a comparé les effets neuroprotecteurs de deux diètes au niveau du cerveau, soit une riche en omega-6 et l'autre riche en oméga-3[299]. Chez le groupe de souris ayant reçu une diète riche en oméga-6, 30% des neurones DAergiques de la substance noire ont dégénéré[299]. Au contraire, chez les souris ayant reçu des une diète riche en oméga-3, aucun signe de mort cellulaire n'a été observé et les concentrations de DA dans le striatum étaient significativement plus élevées que chez les souris avec la diète riche en oméga-6, suggérant un rôle neuroprotecteur des oméga-3 dans le modèle MPTP chez la souris. Cet effet serait attribuable au DHA, dont la concentration était nettement augmentée dans le cerveau, puisque les niveaux d'EPA n'y étaient pas modulés[299].

Une étude parue en 2011 a investigué les mécanismes antioxydants du DHA impliqués dans la neuroprotection, au niveau cérébral, dans le modèle MPTP chez la souris [310]. Le niveau de stress oxydatifs évalués par le dosage de thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) était significativement plus élevé chez les souris traitées au MPTP comparativement aux souris contrôles. Toutefois, le DHA n'a permis d'observer qu'une tendance non significative du stress oxydatif malgré un effet neuroprotecteur. Étrangement, cette étude rapporte aussi une diminution du nombre de neurones DAergiques chez les souris contrôles n'ayant reçues que le DHA, contrairement à l'étude précédente qui n'avait observé aucune différence[299]. Deux autres études, une dans un modèle d'ischémie cérébrale chez la souris[311] et l'autre dans un modèle de lésion oxydative *in vitro*[312] ont observé une association entre l'activation du gène «Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2» Nrf2 et la conversion du DHA en 4-hydroxy-hexenal (4-HHE). Le Nrf2 est un facteur de transcription impliqué dans les mécanismes de défense de la cellule face au stress oxydatif [313]. De plus, dans un modèle d'ischémie rénale chez la souris, une étude a rapporté une augmentation de l'expression de l'oxydoréductase Hème-oxygénase 1 (HO-1) sous l'action de deux autres dérivés du DHA, soit le 17-HDHA et la neuroprotectine D1[314]. Le HO-1 protégerait les neurones contre le stress oxydatif[315].

En parallèle, plusieurs études se sont penchées sur les propriétés anti-apoptotiques du DHA et de ses dérivés en lien avec ses effets neuroprotecteurs. Les mécanismes anti-apoptotiques impliqués incluent entre autres la protéine kinase B ou Akt, la voie de signalisation MAPK/ERK et l'activation de Bcl-2. L'une d'elles a observé une diminution de l'activité de la caspase-3 jumelée à une réduction de la mort neuronale sur des cellules en culture avec pour stress une carence en sérum[282]. Akt est impliqué dans la signalisation favorisant la survie de la cellule. Alors que la carence de sérum a réduit la phosphorylation et l'activation d'Akt, l'ajout de DHA a permis de prévenir partiellement cette réponse cellulaire. Cet effet pourrait être lié à la phosphorylation de BAD, un facteur pro-apoptotique de la famille Bcl-2 et ainsi inhiber ce mécanisme de mort cellulaire. Il pourrait également être lié avec l'augmentation de l'expression de la phosphatidylinositide 3-kinases (PI3K) favorisant la transcription de gènes anti-apoptotiques[282]. Deux autres études, une dans un modèle d'ischémie chez le rat[284] et l'autre dans un modèle *in vitro* de la maladie d'Alzheimer[283] ont rapporté une augmentation de la phosphorylation d'ERK suite à l'ajout de DHA. Cette dernière est une kinase impliquée dans la croissance et dans la prolifération cellulaire. La conversion du DHA en neuroprotectine D1 est un autre mécanisme qui serait impliqué dans la neuroprotection. Par exemple, une étude réalisée sur des neurones et des cellules gliales en

cultures a démontré l'action inhibitrice du NPD1 dans l'inhibition de la neurotoxicité induite par Ab42, un marqueur potentiel de la maladie d'Alzheimer, en agissant sur l'expression du facteur Bcl-2[316]. Enfin, la modulation de l'expression du facteur neurotrophique BDNF par les oméga-3[317] est un autre mécanisme potentielement impliqué dans l'effet neuroprotecteur du DHA.

Effets neurorestorateurs

Le DHA est également étudié dans les maladies neurodégénératives pour son potentiel neurorestorateur. Une étude de 2009 réalisée sur des cellules souches en culture a observé une augmentation de la neurogenèse, soit la différenciation des cellules neurales en neurones, suite à l'ajout de DHA[318] et d'EPA[319]. Cette étude a observé une augmentation de l'expression de «hairy and enhancer of split 1» (Hes1) lequel induirait une élévation de p27kip1, un inhibiteur de la «cyclin kinase inhibitor» (CDK). Cette dernière serait impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire faisant passer le mode de la cellule de proliférative vers sa différenciation. Cette équipe c'est également intéressée aux niveaux de «helix-loop-helix transcription factor» (NeuroD) et de «microtubule-associated protein 2» (MAP2) qui étaient augmentés suite à l'ajout de DHA et d'EPA. Le premier est un facteur de transcription impliqué entre autres dans la différenciation du système nerveux. Le deuxième comme son nom l'indique est impliqué, au niveau des microtubules, dans l'assemblage de ces structures essentielles aux neurones.

Une autre étude plus récente de 2016, réalisée dans le modèle 6-OHDA chez la souris a également rapporté un effet partiellement neurorestaurateur[320]. Trois semaines se sont écoulées suite à l'injection de 6-OHDA, après quoi les souris ont reçu la diète enrichie en oméga-3 durant les six semaines suivantes. Bien qu'aucune amélioration significative des symptômes moteurs n'a été observée, la diète riche en oméga-3 a permis une augmentation de 111% des niveaux de DA ainsi qu'une augmentation de 89% des niveaux de TH dans le striatum. Le nombre de neurones positifs à la TH n'a pas augmenté suite à la diète chez les souris lésées. Toutefois, une augmentation de l'aire et du périmètre des corps des neurones DAergiques a été observée.

Effets anti-inflammatoires

Certaines enzymes, dont la cyclo-oxygénase (COX) et la lipoxygénase (LOX) peuvent convertir le DHA en différentes formes de métabolites [321] [322]. Ceux-ci comprennent entre autres les résolvines, les protectines, aussi appelées neuroprotectines lorsqu'elles sont à l'intérieur des tissus neuronaux

et les maresines[321-325]. Leur rôle anti-inflammatoire et leur implication dans la résolution de l'inflammation ont plusieurs fois été rapportés[321-325]. Il est à noter que leur synthèse augmente avec l'ajout d'oméga-3 dans l'alimentation chez la souris[326] et chez l'humain[327]. Les résolvines E1 et D1 ainsi que la protectine D1 par exemple inhibent la migration transendothéliale des neutrophiles vers les sites inflammatoires [321-324]. Trois modes d'action interreliés permettraient d'expliquer cette fonction biologique, soit la régulation des cytokines inflammatoires, la diminution de l'expression des protéines d'adhésion et la modulation des facteurs de transcription pro- et anti-inflammatoires.

Deux études réalisées sur des cellules endothéliales humaines en présence de lipopolisaccharides (LPS) ont observé une diminution de la production de IL-6 et de IL-8 suite à l'ajout de DHA[328 329]. Cet effet a également été rapporté chez la souris, où la production de TNF, de IL-1β et de IL-6 par les macrophages est atténuée en présence de LPS [330-332] ainsi que la diminution de leurs niveaux dans le sang[333]. L'action des résolvines est entre autres médiée par des récepteurs spécifiques couplés aux protéines G[334]. Leurs effets anti-inflammatoires et protecteurs a déjà été rapporté dans quelques modèles de pathologies inflammatoires chez l'animal, dont l'artrite[335], la colite[336] et l'asthme[337-339 340]. Au niveau intestinal, une étude a rapporté la synthèse significative de ces médiateurs lipidiques dans un modèle d'inflammation du colon chez la souris[341].

Outre, la régulation des cytokines, le DHA agirait également sur les protéines d'adhésion des cellules endothéliales et des leucocytes, nécessaires par exemple à la migration des monocytes sanguins vers le site d'inflammation[328]. En présence d'un stress, tel qu'une endotoxine, ces types cellulaires vont surexprimer ces protéines [328]. Ces protéines sont non seulement associées à certaines conditions inflammatoires[342-347], mais seraient nécessaire à leur mise en place, puisque leur blocage via des anticorps réduit ou prévient certaines conditions pathologiques [348 349]. Quelques études réalisées sur des modèles des cellules endothéliales[328,350,351] ainsi que sur des monocytes[352] ont rapportées une diminution de l'expression des molécules d'adhésion suite à l'exposition au DHA[328]. Cet effet a également été rapporté dans les macrophages[353] et les lymphocytes[354] chez le rat ayant reçu une diète enrichie d'oméga-3.

Enfin, tel que démontré sur des macrophages[355] et des cellules dendritiques[356 357] en culture, en présence de LPS le DHA permet de réduire l'activation de «nuclear factor kappa-B» (NF-κB) via trois différents mécanismes. L'un d'entre eux est intéressant, puisqu'il implique un récepteur abondamment exprimé dans l'intestin, le GPR120[358]. Une étude réalisée sur des macrophages en culture a rapporté la capacité du DHA à agir comme agoniste du récepteur membranaire GPR120[336].

Une fois activé, ce récepteur d'acides gras se lie à la beta-arrestin-2 bloquant ainsi la liaison entre TAK-1 et TAB-1, ce qui permet l'inhibition de la voie pro-inflammatoire induite par le NF-κB[359]. Ce récepteur est toutefois présent en concentration très faible dans le cerveau[358] (Figure 1.21).

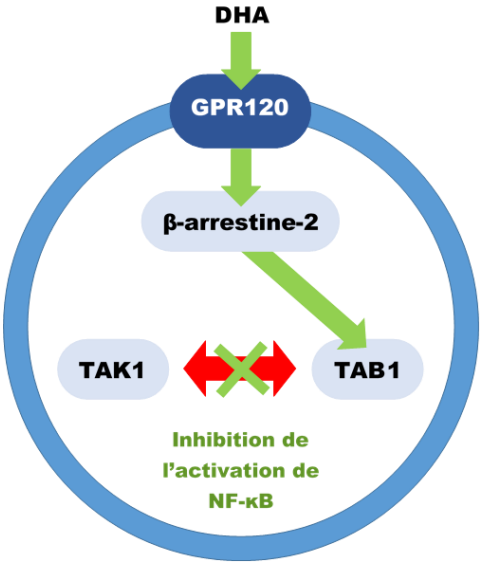


Figure 1.21 : Représentation schématique de l'effet anti-inflammatoire du DHA via l'inhibition de la voie NF-κB par sa liaison avec le récepteur membranaire GPR120[359].

1.5 Projet de recherche

1.5.1 Problématique

La période qui s'échelonne sur plusieurs années avant l'apparition tardive des symptômes moteurs dans le développement de la MP est particulièrement intéressante pour le développement d'agents neuroprotecteurs. Aussi, les processus biologiques qui sont suspectés d'entrainer l'altération des neurones DAergiques, tels qu'un dysfonctionnement mitochondrial, l'accumulation de protéines neurotoxiques, le stress oxydatif et l'inflammation sont des cibles de choix dans l'élaboration de ces agents neuroprotecteurs.

Parmi les symptômes non-moteurs précoces de la maladie se trouve les troubles gastro-intestinaux qui peuvent survenir jusqu'à 10 ans avant l'apparition des symptômes moteurs[28,29]. Cette dysfonction du système digestif serait causée par une perturbation du système DAergiques entérique[297]. Le SNE est lié au système nerveux central, entre autres, par les connexions parasympathiques du nerf vague. De plus, une étude épidémiologique a constaté qu'une altération

du nerf vague interrompait le processus pathologique de la MP consolidant ainsi l'hypothèse de Braak[360]. De ce fait, la présence de corps de Lewy dans le colon associé à la capacité de diffusion des aggrégats d'α-synucléine suggère une origine pathologique intestinale[213302].

La MP est associée à une baisse des niveaux de plasmalogènes dans le cerveau et le sang[276,277]. Ceux-ci jouent un rôle important au niveau de la structure fonctionnelle membranaire des cellules via la médiation de divers mécanismes, tels que le transport des vésicules lors de la neurotransmission, l'activité des protéines membranaires, le stockage d'acides gras polyinsaturés neuroprotecteurs et l'élimination des radicaux libres[218,235,259-261]. Ainsi, mon projet porte sur une nouvelle approche thérapeutique basée sur l'augmentation de plasmalogène dans les membranes cellulaires.

1.5.2 Hypothèses

Basé sur les résultats prometteurs obenues au niveau du SNC [286], nos hypotheses étaient qu'une augmentation en précurseurs de PGE chez la souris lésée par la neurotoxine MPTP entrainera :

1) une protection des neurones DAergiques du plexus myentérique,

2) une protection post-lésion des neurones DAergiques du plexus myentériques et

3) un effet anti-inflammatoire au niveau du SNE.

1.5.3 Objectifs

Dans ce projet, nous avons étudié chez des souris MPTP les effets de l'administration du PPI-1011 sur l'altération des neurones DA myentériques et sur la réponse immunitaire innée intestinale. Cette étude vise à orienter le traitement des patients parkinsonniens en vue de trouver des biomarqueurs précoces pour la MP.

CHAPITRE 2

Neuroprotection and immunomodulation in the gut of parkinsoninan mice with a plasmalogen precursor

Jordan Nadeau[1,2], Tara Smith [3], Mélanie Bourque [1], Sara Al Sweidi [1], Jérôme Lamontagne-Proulx[1,2], Dushmanthi Jayasinghe [3], Shawn Ritchie[3], Thérèse Di Paolo [1,2,*], Denis Soulet [1,2,*].

[1]Neuroscience Research Unit, Centre de Recherche du CHU de Québec, CHUL, 2705 Boulevard Laurier, Quebec City, Qc, Canada, G1V 4G2

[2]Faculty of Pharmacy, Laval University, 1050, avenue de la Médecine, Québec City, Qc, Canada, G1V 0A6

[3]Med-Life Discoveries LP, 104-407 Downey Road, Saskatoon, SK, Canada, S7N 4L8

[*]Shared corresponding authors

Conflict of interest statement

JN, SAS, MC, TDP and DS have no conflict of interest. TS, DJ and SR are employees of [3]Med-Life Discoveries.

Key words: Anti-inflammation, dopaminergic neurons, Parkinson's disease, plasmalogens, PPI-1011, neuroprotection, macrophages

2.1 Résumé

La MP est la deuxième maladie neurodégénérative la plus répandue à travers le monde. Elle est typiquement associée à des symptômes moteurs causés par la dégénérescence des neurones DAergiques de la voie nigro-striée. Les phases précoces de la maladie ont été associées à une altération de la production de DA par les neurones DAergiques de l'intestin associée à de l'inflammation. Une diminution des niveaux de plasmalogènes dans le plasma a été rapportée chez les patients parkinsoniens. Les plasmalogènes jouent un rôle dans le transport des vésicules lors de la neurotransmission, dans le stockage d'acides gras polyinsaturés neuroprotecteurs, tels que le DHA et dans l'élimination des radicaux libres, mettant en lumière un potentiel thérapeutique. Le DHA joue un role important au niveau du système nerveux central ainsi qu'en périphérie. De plus, il s'agit d'un précurseur de plusieurs molécules impliquées dans la résolution de l'inflammation. Cette étude a investigué les propriétés neuroprotectrices et anti-inflammatoires d'un précurseur de plasmalogène, le PPI-1011 contenant du DHA, dans l'intestin chez des souris traitées au MPTP. Le PPI-1011 a prévenu la diminution des niveaux de PlsEtn et la perte de l'expression de la TH en plus de réduire l'infiltration de macrophages dans le plexus myentérique induits par la neurotoxine. Les effets protecteurs du PPI-1011 ont été observés avec des traitements administrés avant ou après la lésion induite par le MPTP. Ces résultats suggèrent que le PPI-1011 a des propriétés neuroprotectrices et anti-inflammatoires dans l'intestin et pourrait être considéré comme traitement des phases précoces et tardives de la MP.

2.2 Abstract

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease worldwide. It is typically associated with motor symptoms originating from the degeneration of nigrostriatal dopamine (DA) neurons. Early stages of PD have been associated with an alteration in DA production in intestinal DAergic neurons along with inflammation. Interestingly, decreased serum concentrations of ethanolamine plasmalogens (PlsEtn) have been reported in PD patients. PlsEtn play a role in vesicular fusion and release during neurotransmission, act as storage of neuroprotective polyunsaturated fatty acids, such as docohexaenoic acid (DHA) and strong anti-oxidants, highlighting a potential therapeutic interest. DHA is known to play important roles in the central nervous system as well as in peripheral systems, as well as acts as a precursor of several molecules that regulate the resolution of inflammation. The present study investigated the neuroprotective, and the anti-inflammatory properties of the DHA-containing PlsEtn precursor, PPI-1011 in the intestine of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mice. PPI-1011 treatment prevented the MPTP-induced decease in PlsEtn levels, as well as the loss of tyrosine hydroxylase (TH) expression and reduced the infiltration of macrophages in the myenteric plexus in MPTP-treated mice. The protective effects of PPI-1011 were observed regardless of whether it was administered pre- or post- MPTP treatment. These results suggest that PPI-1011 has neuroprotective and anti-inflammatory properties in the gut and indicate it should be considered as a treatment for both early and more advanced stages of PD.

2.3 Introduction

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder worldwide. This disease is typically associated with motor symptoms such as resting tremors, muscle rigidity and bradykinesia. PD is associated with a deficiency in dopamine (DA) caused by the slow and progressive loss of DAergic neurons in the nigrostriatal pathway and 2). The histopathological hallmark of the disease includes the presence of fibrillar aggregates called Lewy bodies (LBs) in neurons of the central nervous system (CNS)[1]. LBs are aggregates mainly composed of α-synuclein, a protein that is naturally present in presynaptic terminals.

The early stage of PD is often characterized by non-motor symptoms, including gastrointestinal disorders, which appear long before the onset of motor symptoms[2]. Similar to the DAergic neurons of the substantia nigra, several neurons of the enteric nervous system (ENS) also produce DA that regulates the intestinal motility[3]. Various results have been reported about the actual state of dopaminergic neurons in the gastrointestinal tract of parkinsonian patients. While Singaram *et al* observed a decrease in DA levels[4], Annerino and coworkers reported that there was no significant difference in the count of dopaminergic neurons in PD in an elderly population[5]. However, the presence of Lewy bodies in those neurons[6-9] suggest that these alterations may be responsible for the gastro-intestinal non-motor symptoms.

The ENS is linked to the CNS by the parasympathetic connections of the vagus nerve. Studies from Braak have demonstrated a spatiotemporal evolution of the Lewy bodies from

the dorsal motor nucleus to the substantia nigra and then further into the neocortex which correlates with the severity of motor symptoms[6]. Since the dorsal motor nucleus is connected to the vagus nerve, which innervates the gastrointestinal tract, it suggests that the synucleinopathy could propagate from the ENS to the CNS. Moreover, additional evidence supports the hypothesis that the disease spreads to the CNS from the ENS by trans-synaptic transmission from cell to cell via the vagus nerve[10]. In addition, epidemiological studies have found that an alteration of the vagus nerve interrupted the disease process thus consolidating Braak's hypothesis of PD[11].

Signs of inflammation were present in post-mortem studies in PD patients, such as activated microglial cells in the basal ganglia and elevated levels of proinflammatory cytokines in the substantia nigra, the putamen and the cerebrospinal fluid (interleukin (IL) -1, IL-2, IL-4, IL-6 and tumor necrosis factor alpha (TNF-α))[12,13]. Of great interest, recent studies suggest that inflammation observed in the enteric nervous system in PD patients and mouse model could be involved in the initiation and/or progression of the disease[14,15]. Indeed, levels of pro-inflammatory cytokines such as TNF-α, interferon gamma, IL-6, IL-1 beta and glial marker Sox-10 were negatively correlated with disease duration[14]. In addition, it has been reported that PD subjects exhibit significantly greater intestinal permeability than healthy subjects, suggesting an alteration of the gut-brain axis in patients[16]. Of importance, there is a significant correlation between the intestinal hyperpermeability α-synuclein expression in PD subjects[16]. Moreover, it has been shown in a mouse model of PD that the partial depletion of proinflammatory monocytes and a depletion in the myeloid differentiation primary response gene 88 pro-inflammatory

signaling pathway prevented the alteration of DA neurons in the ENS, specifically in the myenteric plexus[15,17]. Taken altogether, these data suggest that pro-inflammatory events are major contributors in the loss of tyrosine hydroxylase (TH) expression in myenteric neurons.

PlsEtn are a class of glycerophospholipids present in tissues throughout the body representing 15-20% of the total phospholipid content of the cellular membrane. They are characterized by their vinyl-ether bond at the sn-1 position. PlsEtn are a key component of the cellular membrane that play critical roles in membrane structure-mediated functions, membrane protein activity. In addition, they act as a storage pool of polyunsaturated fatty acids, including docohexahenoic acid (DHA) and have strong antioxidant properties. Decreased serum PlsEtn levels have been linked to neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease and PD[18]. While it remains unknown whether the loss of PlsEtn is a contributing factor or consequence of the pathology[19], plasmalogen augmentation represents a novel therapeutic strategy in PD.

In the present work, PPI-1011 compound was tested as a PlsEtn precursor, comprising a palmityl alcohol at sn-1, DHA at sn-2, and lipoic acid at sn-3 of the glycerol backbone (see Supplemental Figure 1 for structures). Previous reports have confirmed the oral bioavailability of the compound, and shown that following treatment there is augmentation of PlsEtn levels as well as DHA (sn-2) and lipoic acid (sn-3)[18,20]. Studies have demonstrated that 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) treatment decreased the serum PlsEtn levels in mice and this decrease was prevented with oral

administration of PPI-1011[21]. Additionally, PPI-1011 treatment prevented the MPTP-induced reductions in the neurotransmitters dopamine and serotonin, as well as their metabolites[21].

Currently, there are several drugs to treat motor symptoms in PD, but these treatments have important long-term side effects, such as dyskinesia. Importantly, none of these treatments have been shown to slow down the progression or cure the disease[22]. The number of therapeutic options to support non-motor symptoms are limited[23]. Although symptomatic treatments for gastrointestinal dysfunctions in PD are available, clinical management remains challenging[24]. Here we report for the first time the ability of a PlsEtn precursor to protect DAergic neurons in the myenteric plexus following either pre- or post-MPTP treatment with PPI-1011. Since the primary effect of MPTP treatment in the myenteric plexus is mediated via a strong immune response[15,17], the neuroprotective effect of PPI-1011 is largely expected to be the result of a decreased inflammation post-treatment.

2.4 Materials and methods

Animals and Treatments

C57BL/6 male mice (10 weeks of age) were purchased from Charles River Canada (Montreal, QC, Canada). The Laval University Animal Care Committee approved all the animal studies, and mice were handled in accordance with approved institutional guidelines. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of mice used. Med-Life Discoveries LP (Saskatoon, SK, Canada) provided PPI-1011 formulated in soybean oil (1, 50 and 200 mg/kg). Experimental workflow and timeline are described in Supplemental Figure 2.

Dose-response of PPI-1011 pre-treatment neuroprotection experiment

Mice were treated with either 0.1 ml vehicle (soybean oil) or PPI-1011 (10, 50 and 200 mg/kg, formulated in soybean oil), administered by gavage once daily in the morning for 10 days (n=10). On day 5, mice received four intraperitoneal (i.p.) injections of saline solution or freshly diluted MPTP (6.5 mg/kg, Sigma Chemical, St. Louis, MO), dissolved in saline 0.9%, at 2-h intervals. This dose of MPTP was chosen to reproduce a moderate loss of striatal DA contents, representative of an early stage of PD[25,26]. On day 11, mice were euthanized under deep anaesthesia with ketamine/xylazine. Ileum was taken and fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 24 h and kept at 4°C in PBS 1X (BioShop, Burlington, ON, Canada) for conservation.

PPI-1011 pre-treatment for the neuroprotection experiment

To confirm the neuroprotection of PPI-1011 in MPTP treated animals and investigate the effects of PPI-1011 treatment alone, mice received treatment with either 0.1 ml of vehicle (soybean oil) or PPI-1011 (10 and 50 mg/kg, formulated in soybean oil), administered by gavage once daily in the morning, for 10 days. On day 5, half of the mice on each treatment (vehicle, 10 mg/kg PPI-1011and 50 mg/kg PPI-1011) received four intraperitoneal (i.p.) injections of saline solution, while the other half were injected with freshly diluted MPTP (6.5 mg/kg, Sigma Chemical, St. Louis, MO), dissolved in saline 0.9%, at 2 h intervals. This dose of MPTP was chosen to reproduce a moderate loss of striatal DA contents, representative of an early stage of PD[25,26]. On day 11, mice were killed under deep anesthesia with ketamine/xylazine. Ileum were taken and fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 24 h and kept at 4°C in PBS 1X (BioShop, Burlington, ON, Canada) for conservation. Each experimental group included 10 mice.

PPI-1011 post-treatment for the neuroprotection post-lesion experiment

Mice received treatment with 0.1 ml of vehicle (soybean oil) or PPI-1011 (10 and 50 mg/kg, formulated in soybean oil), administered by gavage once daily in the morning, for 5 days. On day 1, mice received four i.p. injections of saline solution or freshly diluted MPTP (6.5 mg/kg, Sigma Chemical, St. Louis, MO), dissolved in saline 0.9%. The day of MPTP administration, one PPI-1011 gavage was given 1 h after the first MPTP injection and another 1 h after the last MPTP injection. On day 6, mice were killed under deep anesthesia with ketamine/xylazine. Ileum was taken and fixed in PFA for 24 h before being

kept at 4°C in PBS 1X (BioShop, Burlington, ON, Canada) for conservation. Each experimental group included 10 mice.

Tissue preparation

Distal ileum sample was excised and microdissected according to previously published methods[15,17,27,28]. Briefly, the longitudinal muscle layer was peeled off from the circular muscle layer. The myenteric plexus, the region investigated, remained stuck on the longitudinal layer.

Immunohistochemistry and analysis

The sections of myenteric plexus were mounted on glass slides in Cuprolinic blue (Polysciences Inc., PA, USA) for a counterstaining as a marker for myenteric neurons[29]. The assembly covered with a coverslip was incubated for 60 min in a humid chamber at 37°C and then rinse in KPBS 1X for 5 min in a free-floating manner. Then, a polyclonal TH antibody (Table 1) was used to label DA neurons. All following steps were performed on a stirring plate at medium speed. Free-floating samples of myenteric plexus were incubated for 30 min in a blocking buffer made of phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), 4% goat serum and 1% Triton X-100. The samples were incubated overnight in the same buffer solution with the primary antibody (see Table 1 for list of antibodies and dilutions). at 4°C. After that, samples were rinsed in PBS for 5 min. They were then incubated in biotinylate-conjugated goat secondary antibody (See Table 1) for 120 min, followed by a subsequent rinsing in PBS for 5 min. Sections of myenteric plexus were incubated in avidin-biotin complex (ABC, Vector Laboratories Inc.) for 60 min to amplify the signal intensity, followed by a subsequent rinsing in PBS for 5 min. The peroxidase

was developed by incubating the samples in 3–3′diaminobenzidine (DAB, Vector Laboratories Inc., ON, Canada) for brightfield microscopy. After a last wash in PBS for 5 min, samples were mounted onto SuperFrost slides (Fisher Scientific, ON, Canada) and coverslipped with DPX (Sigma–Aldrich, ON, Canada). Images were acquired with a Nikon C80i microscope equipped with a Retiga Exi camera (Qimaging Inc., Surrey, BC, Canada).

Histological analysis was done with Stereo Investigator software 6.0 (Microbrightfield, VT, USA) as described previously [17]. The observer was blind to treatment groups. Section contours on the image were traced to delimit the myenteric plexus. The total neurons and TH^+ neurons stained with DAB were counted through a 40× objective lens inside of this perimeter. Total neurons and TH^+ neurons density were calculated as the number of cell divided by the traced area in squared millimeters.

Immunofluorescence

The macrophages were labeled using ionized calcium-binding adapter molecule 1(Iba-1) antibody as a pan-macrophage marker (Table 1). Iba-1 is a protein specifically expressed in macrophages and microglia. M1 macrophages, i.e. with a pro-inflammatory immunophenotype, were labeled targeting major histocompatibility complex class II (MHC II). Free floating sections of myenteric plexus were incubated for 30 min in a blocking buffer containing PBS (pH 7.4), 4% donkey serum and 1% Triton X-100. The samples were incubated overnight in the same buffer solution with the primary antibody against MHC II for the label of M1 macrophages (Table 1) at 4°C. After rinsing 3 × 5 min in PBS, the samples were incubated in blocking buffer with the secondary antibodies

(Table 1) and then rinse 3 × 5 min. DAPI 0.022% (Invitrogen Corporation, CA, USA) in PBS was used to counterstain nuclei for 7 min at room temperature and rinsed 3 × 5 min. Each step was performed on a stirring plate at medium speed. Slides were mounted and coversliped with fluoromount (Southern Biotech, AL, USA). The same protocol was used to labeled GPR120 protein and DA neurons targeting TH antibody except for the DAPI staining in the supplementary figure (Table 1).

Confocal laser scanning microscopy and analysis

A confocal laser-scanning microscope (Olympus IX81-FV1000; ON, Canada) equipped with the Fluoview SV500 imaging software 4.3 (Olympus America, Inc., Melville, NY) was used for the acquisition of images in sequential scanning mode. The pictures were stacked and maximum intensity projections were generated.

One observer blind to the treatment status performed quantitative histological analyses. The z-series images were exported in ImageJ Software (Wayne Rasband, MD, USA). Section contours on the image were traced to delimit the myenteric plexus. The macrophages were counted through a 40× objective lens inside of this perimeter. The density of macrophages was calculated as the number of cell divided by the traced area in squared millimeters.

Quantification of plasmalogens and metabolites in serum

Blood samples were collected in serum tubes and centrifuged (10 min, 1000g). Serum samples were stored at -80°C until thawed for analysis. Lipid extraction was performed in

methanol containing stable isotope internal standards[30]. Quantification of plasmalogens and their metabolites was performed as previously reported[21].

Statistical analysis

All data collected was used to perform the statistical analyses. To study the effects of treatments with PPI-1011 on the total neurons density, the TH^+ neurons density and the macrophages density following MPTP administration, data was analyzed with a one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Holm-Sidak's multiple comparison test using Prism 6 (GraphPad Software Inc., CA, USA). All data are presented as mean ± SEM. A $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Plasmalogen augmentation following pre-treatment with PPI-1011 in MPTP-treated animals

MPTP treated animals showed a decrease in PlsEtn levels, with the 16:0 (sn-1), 18:0 (sn-1) and total PlsEtn pools all decreasing following MPTP treatment (Fig. 1). Pre-treatment with PPI-1011 resulted in a dosage dependent increase in the levels of the 16:0 PlsEtn pool compared to MPTP treatment alone. The 16:0/22:6, the target of PPI-1011, was protected against the MPTP-induced decrease and showed a clear dose-response increase (Fig. 1a). The 18:0 pool and the total PlsEtn pool levels were also protected against the MPTP-induced decreases, however these were not dosage dependent. Pre-treatment with PPI-1011 resulted in an increase in the levels of the total PlsEtn pool compared to MPTP treatment alone, returning to control levels (Fig. 1c).

Pre-treatment with PPI-1011 protected tyrosine hydroxylase positive (TH^+) neurons from MPTP-induced lesion in the myenteric plexus

Examples of sections from the distal ileum processed to label neuronal cell bodies (blue) and TH^+ neurons (brown DAB staining) in the myenteric plexus of saline, MPTP and MPTP + PPI-1011 (50 mg/kg) treated mice are shown in Fig 2. The density of total neurons following administration of MPTP or MPTP + PPI-1011 (10, 50 and 200 mg/kg) remained unchanged (Fig 2b). Based on previous studies demonstrating that PPI-1011 protected DA levels in the striatum of mice treated with MPTP, we further investigated the levels of TH^+ neurons. The density of TH^+ neurons was decreased following MPTP treatment by 47% (Fig 2c) compared to control mice. The 10 mg/kg dose of PPI-1011 did not protect

significantly TH^+ neurons, while the 50 and 200 mg/kg doses protected approximately 84% and 100% of DA neurons respectively (Fig 2c). Similar results were observed with the ratio of TH^+ / total neurons (Fig 2d).

Pre-treatment with PPI-1011 prevented macrophage infiltration induced by MPTP in the myenteric plexus

We next investigated the relationship between the neuroprotective effect of PPI -1011 (50 and 200 mg/kg) observed in the myenteric plexus and the inflammation present in these mice. A stereological count of ionized calcium-binding adapter molecule 1 $(Iba\text{-}1)^+$ cells following an immunofluorescence (Fig. 3a) showed an increase of about 27% in the density of macrophages in the myenteric plexus of MPTP-treated mice compared to control mice (Fig. 3b). This increase has previously been reported and suggested to be the result of infiltration of monocytes from blood vessels[17]. The 10 mg/kg dose of PPI-1011 was again insufficient to provide protection against increased density of macrophages in MPTP-treated mice. The 50 and 200 mg/kg doses however prevented 88% and 79% of the macrophage infiltration respectively (Fig. 3b). Regression analysis using the control, MPTP and 50 mg/kg (most effective dose) groups showed that total PlsEtn levels were inversely correlated with macrophage density ($r^2 = 0.145$, $p < 0.05$).

Effect of PPI-1011 in the neurons of the myenteric plexus of intact and MPTP-lesioned mice

To confirm the neuroprotective role of PPI-1011 and determine if it had an effect on TH^+ neurons or macrophage density in non-MPTP treated animals, we repeated the above

experiment using the 10 and 50 mg/kg doses, and added a group without MPTP treatment. The density of total neurons following administration of MPTP, PPI-1011 (10 and 50 mg/kg) or both remained unchanged (Fig. 4a). Neither the 10 nor 50 mg/kg dose of PPI-1011 affected the density of TH^+ cells in non-MPTP treated mice (Fig. 4c). In mice treated with MPTP, TH^+ neurons density decreased by 36% (Fig 4c) compared to control mice. The 10 mg/kg dose of PPI-1011 was again insufficient to significantly protect TH^+ neurons (Fig. 4c) while the 50 mg/kg doses protected approximately 88% of DAergic neurons (Fig. 4c). Similar results were observed with the ratio of TH^+ / total neurons (Fig. 4d).

Effect of PPI-1011 in the macrophages of the myenteric plexus of intact and MPTP-lesioned mice

A stereological count of ionized calcium-binding adapter molecule 1 $(Iba\text{-}1)^+$ cells (Fig. 4c) following an immunofluorescence showed an increase of about 51% in the density of macrophages in the myenteric plexus of MPTP-treated mice compared to control mice (Fig. 4c). Neither dose of PPI-1011 had an effect on macrophage density in MPTP naïve animals (Fig. 4c). The results of the initial experiment were confirmed, with the 10 mg/kg dose of PPI-1011 having no effect, while the 50 mg/kg dose prevented 88% of the macrophage infiltration in MPTP treated animals.

Pre-treatment with PPI-1011 inhibited the increase of pro-inflammatory (M1) macrophages induced by MPTP in the myenteric plexus

Staining for major histocompatibility complex II (MHC II) was used to identify activated macrophages (Fig. 5a) [31]. MHC II positive macrophages showed an increase of 75% (Fig.

5b) in MPTP-lesioned mice that was not prevented by PPI-1011 at 10 mg/kg. However, pre-treatment with PPI-1011 (50 mg/kg) of MPTP-lesioned mice inhibited approximately 63% of the pro-inflammatory macrophages compared to MPTP-lesioned mice (Fig. 5b). Treatments at 10 and 50 mg/kg of PPI-1011 in non-MPTP treated mice had no effect on MHC II^+ macrophages density (Fig. 5b).

Post-MPTP treatment with PPI-1011 protected the TH^+ neurons from MPTP-induced lesion in the myenteric plexus

As for the pre-treatment experiment, stereological counting was made after an immunohistochemistry with cuprolinic blue coloration and TH antibody. The density of total neurons following the administration of MPTP, PPI-1011 (5, 10 and 50 mg/kg) or both remained unchanged (Fig. 6a). Treatment with 5, 10 and 50 mg/kg of PPI-1011 left unchanged the TH^+ neurons density in saline-treated mice, confirming PPI-1011 alone is not responsible for the treatment effects when administered before or after the MPTP lesion. The dose of 50 mg/kg protected about 86% of TH^+ neurons compared to mice treated with MPTP alone whereas the doses of 5 and 10 mg/kg were not effective (Fig. 6b). Similar results were observed with the ratio of TH^+ / total neurons (Fig 6c), except that doses of 5 and 10 mg/kg did not prevent against the MPTP toxicity (significantly different vs MPTP).

Post-treatment with PPI-1011 reduced the macrophages infiltration induced by MPTP in the myenteric plexus

A stereological count of Iba-1$^+$ cells showed an increase of 36% (Fig. 6d) in the macrophage density within the myenteric plexus of MPTP-treated mice compared to saline control mice. Although the doses 5 and 10 mg/kg of PPI -1011 did not have a significant effect on the density of macrophages in mice treated with MPTP, the 50 mg/kg dose inhibited approximately 92% of the infiltration process (Fig. 6d) compared to the mice treated with MPTP alone. The 5 mg/kg doses of PPI-1011 did not alter the density of macrophages in MPTP-treated mice (Fig. 6d).

2.5 Discussion

We report for the first time the ability of a PlsEtn precursor treatment, PPI-1011, to protect the TH$^+$ neurons in the gut against MPTP toxicity, through a reduction in the inflammatory response. This effect was observed when PPI-1011 treatment was started pre-MPTP injections and continued for 5 days post-treatment, or when treatment with PPI-1011 begun concomitantly with MPTP treatment.

MPTP neurotoxin is an extensively used model of PD, which has primarily served to study the CNS effects of PD. There is an increasing interest in the non-motor symptoms of PD, many of which have been shown to precede the onset of motor symptoms by as many as 10 years[32-35]. Gastrointestinal dysfunction is a common non-motor symptom and includes symptoms such as drooling, dysphagia, nausea and constipation[36-39]. MPTP administration has been shown to lead to GI dysfunction[40] and as such is a valuable model for studying the GI alterations in PD. Confirming earlier reports, our results showed a decrease in the density of TH$^+$ neurons and an increase in macrophage density in the myenteric plexus following MPTP administration. The innate immune response following MPTP treatment

has been shown to be a requirement for the increased infiltration of macrophages and the reduction of TH^+ neurons[17]. MPTP treatment induced a decrease in Arginase 1 expression and an increase in MHC II expression, suggesting a macrophage polarization towards M1 immunophenotype[17]. Prevention of a pro-inflammatory response with a therapeutic agent should therefore prevent the loss of DAergic neurons. Of importance, TH^+ cell bodies in the mouse myenteric plexus are likely dopaminergic neurons in the distal ileum since these cells do not express the noradrenergic marker dopamine beta-hydroxylase (DBH), which is in agreement with previously published results[41]. Indeed, contrary to noradrenergic neurons from the *locus coeruleus*, DBH is only expressed in extrinsic sympathetic axonal projections and not in myenteric neuron cell bodies (see Supplemental Fig. 4-6).

MPTP is known to result in increased oxidative stress and lipid peroxidation [42], which leads to a pro-inflammatory environment. The increase in lipid peroxidation is likely the main cause of the MPTP-induced decrease in serum PlsEtn content. The reduction in PlsEtn is in agreement with reports of reduced serum and brain PlsEtn in patients with PD[18,43]. PPI-1011 is a plasmalogen precursor which by passes the peroxisomal steps in the PlsEtn synthesis pathway. Previous studies have demonstrated the oral bioavailability of PPI-1011, and the increased serum and tissue levels of the target PlsEtn following administration. In addition, the ether backbone was utilized to increase levels of a variety of PlsEtn species, predominantly those with the same sn-1 (16:0) constituent[20]. Treatment with PPI-1011 further resulted in augmentation of DHA (sn-2) and lipoic acid (sn-3) levels[20].

PPI-1011 has been previously investigated in the MPTP mouse model and shown to augment PlsEtn levels and to induce a neuroprotective effect in the CNS [21]. Here we demonstrate that at a sufficient dosage (50 or 200 mg/kg), PPI-1011 protected against the MPTP-induced decrease in the density of TH^+ neurons in the myenteric plexus, illustrating the ability of PPI-1011 to protect DAergic neurons against MPTP toxicity in the CNS is reproduced in the ENS. PPI-1011 treatment did not have a significant effect on the density of TH^+ neurons in control mice, confirming that the effect of PPI-1011 was not through enhancing neurons to express TH or stimulating the proliferation of TH^+ neurons. PPI-1011 treatment also completely prevented the infiltration of macrophages in the distal ileum following MPTP treatment, again without having an effect in saline controls. These results were true regardless of when the PPI-1011 treatment began. Together the data clearly illustrate that PPI-1011 has a neuroprotective role in the gut of MPTP-treated animals and that this effect is present whether animals are pre-treated with PPI-1011 or begin treatment concurrent with MPTP.

The loss of MPTP toxicity on DA neurons in absence of inflammation[15], strongly suggests that inhibition of inflammation is responsible, at least in part, for the neuroprotective effect observed in the myenteric plexus of PPI-1011 treated mice. The anti-inflammatory mechanisms of PPI-1011 are multifaceted, with a number of pathways likely playing a role in its function. For example, PlsEtn have been shown to act as strong anti-oxidants, due to the nature of their characteristic vinyl ether bond at sn-1 [44,45]. PPI-1011 also induces an increase in lipoic acid levels upon release from the s-3. Lipoic acid is known to stimulate the expression of glutathione, a molecule involved in the regulation of oxidative stress [46]

could affect the inflammation induced by MPTP. DHA, which is released from the sn-2 position of PPI-1011 also acts as an anti-oxidant and has been demonstrated to be neuroprotective in MPTP-treated mice[47]. Moreover, a recent study reported the anti-inflammatory mechanism of DHA mediated by activation of the G protein-coupled receptor 120 (GPR120)[48]. This receptor is highly expressed in the caecum and in the proximal colon in mice and its activation has been showed to block the expression of NF-κB and thus plays an anti-inflammatory role[49]. Interestingly, GPR120 have been shown to be expressed in myenteric neurons in the present study (Suppl. Fig. 1). Additionally, studies have reported important roles of DHA in the central nervous system as well as in peripheral systems. It is also a precursor of several molecules that regulate resolution of inflammation, such as resolvins, docosatrienes and neuroprotectins[50,51]. Taken together PPI-1011 treatment likely provides abundant protection against the oxidative stress generated following MPTP treatment. The ability to protect cells from the damage of oxidative stress should minimize the pro-inflammatory environment in the distal ileum preventing the immune response and protecting the DAergic neurons.

Chronic inflammation has also been reported in the peripheral nervous system in human PD patients and was suggested to play a role in the degeneration of DA neurons. Additionally, inflammatory markers such as activated microglia and pro-inflammatory cytokines have been reported to be elevated upon post mortem analysis in the brain and cerebrospinal fluid of PD patients[14,15]. Conservation of the role of inflammation in PD between mice and humans supports the translation of PPI-1011 neuroprotection into humans.

In conclusion, the present results are the first to show protection with a pre- and post-lesion PPI-1011 treatment of DA neurons in the gut of MPTP-treated mice. This represents a novel approach as both prophylactic and neuroprotective treatment against onset and progression of PD, in both the CNS and ENS.

2.6 Author contributions

JN performed the immune staining, the analysis of the tissues and the interpretation; JPL performed the experiments related to dopamine beta-hydroxylase; MB and SAS performed the animal manipulations; TS, DJ and SR were responsible for PPI-1011 preparation and analyses; DS and TDP were responsible for the project design; DS, JN, TDP and TS wrote the manuscript that was reviewed and approved by all authors.

2.7 Acknowledgments

This study was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to T.D.P and D.S., and the Canadian Funds for Innovation (D.S.). J.P.L. and J.N. held a studentship form the Fonds de l'enseignement et de la recherche (FER) of the Faculty of Pharmacy, Laval University. J.P.L. holds a Didier Mouginot scholarship from Fondation du CHU de Québec. Med-Life Discoveries provided the PPI-1011. D.S. holds a Junior 2 career award from Les Fonds de recherche en Santé du Québec (FRQ-S).

2.8 References

1 Hayes, M. W., Fung, V. S., Kimber, T. E. & O'Sullivan, J. D. Current concepts in the management of Parkinson disease. *The Medical journal of Australia* **192**, 144-149 (2010).

2 Szabo, G., Benyo, I. & Sandor, J. The effect of haemorrhage on gastric circulation and acid output in the dog. *Injury* **10**, 190-193 (1979).

3 Eaker, E. Y., Bixler, G. B., Dunn, A. J., Moreshead, W. V. & Mathias, J. R. Dopamine and norepinephrine in the gastrointestinal tract of mice and the effects of neurotoxins. *J Pharmacol Exp Ther* **244**, 438-442 (1988).

4 Singaram, C. *et al.* Dopaminergic defect of enteric nervous system in Parkinson's disease patients with chronic constipation. *Lancet* **346**, 861-864 (1995).

5 Annerino, D. M. *et al.* Parkinson's disease is not associated with gastrointestinal myenteric ganglion neuron loss. *Acta Neuropathol* **124**, 665-680, doi:10.1007/s00401-012-1040-2 (2012).

6 Braak, H., Rub, U., Gai, W. P. & Del Tredici, K. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm* **110**, 517-536, doi:10.1007/s00702-002-0808-2 (2003).

7 Pouclet, H. *et al.* A comparison between colonic submucosa and mucosa to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neurogastroenterol Motil* **24**, e202-205, doi:10.1111/j.1365-2982.2012.01887.x (2012).

8 Pouclet, H. *et al.* A comparison between rectal and colonic biopsies to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* **45**, 305-309, doi:10.1016/j.nbd.2011.08.014 (2012).

9 Beach, T. G. *et al.* Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol* **119**, 689-702, doi:10.1007/s00401-010-0664-3 (2010).

10 Tyson, T., Steiner, J. A. & Brundin, P. Sorting out release, uptake and processing of alpha-synuclein during prion-like spread of pathology. *J Neurochem* **139 Suppl 1**, 275-289, doi:10.1111/jnc.13449 (2016).

11 Svensson, E. *et al.* Vagotomy and subsequent risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol* **78**, 522-529, doi:10.1002/ana.24448 (2015).

12 Mogi, M., Harada, M., Kondo, T., Riederer, P. & Nagatsu, T. Interleukin-2 but not basic fibroblast growth factor is elevated in parkinsonian brain. Short communication. *J Neural Transm (Vienna)* **103**, 1077-1081, doi:10.1007/BF01291792 (1996).

13 Hu, Y. *et al.* Parkinson disease with REM sleep behavior disorder: features, alpha-synuclein, and inflammation. *Neurology* **84**, 888-894, doi:10.1212/WNL.0000000000001308 (2015).

14 Devos, D. *et al.* Colonic inflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* **50**, 42-48, doi:10.1016/j.nbd.2012.09.007 (2013).

15 Cote, M. *et al.* Partial depletion of the proinflammatory monocyte population is neuroprotective in the myenteric plexus but not in the basal ganglia in a MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Brain Behav Immun* **46**, 154-167, doi:10.1016/j.bbi.2015.01.009 (2015).

16 Forsyth, C. B. *et al.* Increased intestinal permeability correlates with sigmoid mucosa alpha-synuclein staining and endotoxin exposure markers in early Parkinson's disease. *PLoS One* **6**, e28032, doi:10.1371/journal.pone.0028032 (2011).
17 Cote, M., Drouin-Ouellet, J., Cicchetti, F. & Soulet, D. The critical role of the MyD88-dependent pathway in non-CNS MPTP-mediated toxicity. *Brain Behav Immun* **25**, 1143-1152, doi:10.1016/j.bbi.2011.02.017 (2011).
18 Dragonas, C., Bertsch, T., Sieber, C. C. & Brosche, T. Plasmalogens as a marker of elevated systemic oxidative stress in Parkinson's disease. *Clin Chem Lab Med* **47**, 894-897, doi:10.1515/CCLM.2009.205 (2009).
19 Braverman, N. E. & Moser, A. B. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim Biophys Acta* **1822**, 1442-1452, doi:10.1016/j.bbadis.2012.05.008 (2012).
20 Wood, P. L. *et al.* Oral bioavailability of the ether lipid plasmalogen precursor, PPI-1011, in the rabbit: a new therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Lipids Health Dis* **10**, 227, doi:10.1186/1476-511X-10-227 (2011).
21 Miville-Godbout, E. *et al.* Plasmalogen Augmentation Reverses Striatal Dopamine Loss in MPTP Mice. *PLoS One* **11**, e0151020, doi:10.1371/journal.pone.0151020 (2016).
22 Lennert, B., Bibeau, W., Farrelly, E., Sacco, P. & Schoor, T. Assessment of Treatment Patterns and Patient Outcomes in Levodopa-Induced Dyskinesias (ASTROID): A US Chart Review Study. *Am Health Drug Benefits* **5**, 347-358 (2012).
23 Chaudhuri, K. R., Healy, D. G., Schapira, A. H. & National Institute for Clinical, E. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol* **5**, 235-245, doi:10.1016/S1474-4422(06)70373-8 (2006).
24 Poirier, A. A. *et al.* Gastrointestinal Dysfunctions in Parkinson's Disease: Symptoms and Treatments. *Parkinsons Dis* **2016**, 6762528, doi:10.1155/2016/6762528 (2016).
25 Bourque, M., Morissette, M., Cote, M., Soulet, D. & Di Paolo, T. Implication of GPER1 in neuroprotection in a mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* **34**, 887-901, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2012.05.022 (2013).
26 Bourque, M., Dluzen, D. E. & Di Paolo, T. Signaling pathways mediating the neuroprotective effects of sex steroids and SERMs in Parkinson's disease. *Front Neuroendocrinol* **33**, 169-178, doi:10.1016/j.yfrne.2012.02.003 (2012).
27 Cote, M. *et al.* GPER1-mediated immunomodulation and neuroprotection in the myenteric plexus of a mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* **82**, 99-113, doi:10.1016/j.nbd.2015.05.017 (2015).
28 Poirier, A. A. *et al.* Neuroprotective and immunomodulatory effects of raloxifene in the myenteric plexus of a mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* **48**, 61-71, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2016.08.004 (2016).
29 Holst, M. C. & Powley, T. L. Cuprolinic blue (quinolinic phthalocyanine) counterstaining of enteric neurons for peroxidase immunocytochemistry. *J Neurosci Methods* **62**, 121-127 (1995).
30 Wood, P. L., Ball, B. A., Scoggin, K., Troedsson, M. H. & Squires, E. L. Lipidomics of equine amniotic fluid: Identification of amphiphilic (O-acyl)-omega-hydroxy-fatty acids. *Theriogenology* **105**, 120-125, doi:10.1016/j.theriogenology.2017.09.012 (2018).
31 Lawrence, T. & Natoli, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol* **11**, 750-761, doi:10.1038/nri3088 (2011).
32 Chaudhuri, K. R. & Schapira, A. H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurol* **8**, 464-474, doi:10.1016/S1474-4422(09)70068-7 (2009).

33 Goldman, J. G. & Postuma, R. Premotor and nonmotor features of Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* **27**, 434-441, doi:10.1097/WCO.0000000000000112 (2014).
34 Park, A. & Stacy, M. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *J Neurol* **256 Suppl 3**, 293-298, doi:10.1007/s00415-009-5240-1 (2009).
35 Sauerbier, A. & Ray Chaudhuri, K. Non-motor symptoms: the core of multi-morbid Parkinson's disease. *Br J Hosp Med (Lond)* **75**, 18-24 (2014).
36 Barone, P. *et al.* The PRIAMO study: A multicenter assessment of nonmotor symptoms and their impact on quality of life in Parkinson's disease. *Mov Disord* **24**, 1641-1649, doi:10.1002/mds.22643 (2009).
37 Bernal-Pacheco, O., Limotai, N., Go, C. L. & Fernandez, H. H. Nonmotor manifestations in Parkinson disease. *Neurologist* **18**, 1-16, doi:10.1097/NRL.0b013e31823d7abb (2012).
38 Dubow, J. S. Autonomic dysfunction in Parkinson's disease. *Dis Mon* **53**, 265-274, doi:10.1016/j.disamonth.2007.02.004 (2007).
39 Lyons, K. E. & Pahwa, R. The impact and management of nonmotor symptoms of Parkinson's disease. *Am J Manag Care* **17 Suppl 12**, S308-314 (2011).
40 Natale, G. *et al.* MPTP-induced parkinsonism extends to a subclass of TH-positive neurons in the gut. *Brain research* **1355**, 195-206, doi:10.1016/j.brainres.2010.07.076 (2010).
41 Li, Z. S., Pham, T. D., Tamir, H., Chen, J. J. & Gershon, M. D. Enteric dopaminergic neurons: definition, developmental lineage, and effects of extrinsic denervation. *J Neurosci* **24**, 1330-1339, doi:10.1523/JNEUROSCI.3982-03.2004 (2004).
42 Li, L. *et al.* Changes in blood anti-oxidation enzyme levels in MPTP-treated monkeys. *Neuroscience letters* **649**, 93-99, doi:10.1016/j.neulet.2017.04.004 (2017).
43 Fabelo, N. *et al.* Severe alterations in lipid composition of frontal cortex lipid rafts from Parkinson's disease and incidental Parkinson's disease. *Mol Med* **17**, 1107-1118, doi:10.2119/molmed.2011.00119 (2011).
44 Farooqui, A. A. & Horrocks, L. A. Plasmalogens: workhorse lipids of membranes in normal and injured neurons and glia. *Neuroscientist* **7**, 232-245, doi:10.1177/107385840100700308 (2001).
45 Kuczynski, B. & Reo, N. V. Evidence that plasmalogen is protective against oxidative stress in the rat brain. *Neurochemical research* **31**, 639-656, doi:10.1007/s11064-006-9061-7 (2006).
46 Bharat, S. *et al.* Pre-treatment with R-lipoic acid alleviates the effects of GSH depletion in PC12 cells: implications for Parkinson's disease therapy. *Neurotoxicology* **23**, 479-486 (2002).
47 Bousquet, M. *et al.* Beneficial effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acid on toxin-induced neuronal degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **22**, 1213-1225, doi:10.1096/fj.07-9677com (2008).
48 Oh, D. Y. *et al.* GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* **142**, 687-698, doi:10.1016/j.cell.2010.07.041 (2010).
49 Hirasawa, A. *et al.* Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med* **11**, 90-94, doi:10.1038/nm1168 (2005).
50 Hong, S., Gronert, K., Devchand, P. R., Moussignac, R. L. & Serhan, C. N. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *J Biol Chem* **278**, 14677-14687, doi:10.1074/jbc.M300218200 (2003).

51 Serhan, C. N. Novel chemical mediators in the resolution of inflammation: resolvins and protectins. *Anesthesiol Clin* **24**, 341-364 (2006).

Table 2.1: List of antibodies

	Antibody	Host	Company	Cat. Number	Dilution
Primary:	- Ionized calcium binding adaptor molecule 1(IBA1)	Rabbit	Cedarlane	019-19741	1/500
	- MHCII	Rat	BD Pharmingen	556999	1/500
	- Tyrosine Hydroxylase (TH)	Rabbit	Cedarlane	P40101-0	1/1000
	- GPR120	Rabbit	Lifespan Biosciences	LS-B11842	1/1000
	- Tyrosine Hydroxylase (TH)	Sheep	Abcam	Ab113	1/1000
Secondary :	- Mouse Alexa Fluor 488	Donkey	Invitrogen	A21202	1/250
	- Rabbit Alexa Fluor 546	Donkey	Invitrogen	A10040	1/500
	- Rabbit Alexa Fluor 633	Donkey	Invitroge	A21082	1/500
	- Rabbit biotinylated	Goat	Cedarlane	BA-1000	1/1000
	- Rat Alexa 488	Goat	Molecular Probes	A11006	1/1000
	- Rabbit Alexa Fluor 555	Donkey	Life technologies	A31572	1/1000
	- Sheep Alexa Fluor 488	Donkey	Life technologies	A11015	1/1000

Figure legends

Figure 2.1 PlsEtn levels following PPI-1011 (10, 50 and 200 mg/kg) in plasma in MPTP-treated-mice compared to saline-treated controls. (a) Quantitative comparison of levels of PlsEtn species 16:0 (sn-1). (b) Levels of PlsEtn species 18:0 (sn-1). (c) Quantitative comparison of levels of total PlsEtn. The total PlsEtn level decreased in the MPTP-treated mice and remained at control level with PPI-1011 (10, 50 and 200 mg/kg) treatments. Values shown are the ratio to the ^{13}C internal standard ± S.E.M. of 10 mice per condition. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs saline-treated mice, # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$ vs MPTP-treated mice. One-way ANOVA followed by a Holm-Sidak's multiple comparison test.

Figure 2.2 Dose-response effect of PPI-1011 (10, 50 and 200 mg/kg) on total myenteric neurons and TH^+ neurons in MPTP-treated mice compared to saline-treated controls. (a) Representative microphotographs of sections from the distal ileum illustrating the myenteric neurons (blue) and TH^+ neurons (brown DAB staining) in the myenteric plexus of saline, MPTP- and MPTP + PPI-1011 (50 mg/kg) -treated mice. White arrowheads show TH^+ cell bodies in ganglions. Scale bars = 4 μm. (b) Quantitative comparison of total neurons in myenteric plexus of mice showed no difference between each treatment. (c) Quantitative comparison of the TH^+ neurons densities in the myenteric plexus of mice. The density of TH^+ neurons decreased in the MPTP-treated mice and remained at control level with PPI-1011 (50 and 200 mg/kg) treatments. Values shown are the means of densities ± S.E.M. of 10 mice per condition. (d) Ratios of TH^+ neurons over total neurons in percent.

ns, non-significant difference; *** $p<0.001$ vs saline-treated mice, # $p<0.05$, ## $p<0.01$, #### $p<0.0001$ vs MPTP-treated mice, ΨΨ $p<0.01$, ΨΨΨ $p<0.001$, ΨΨΨΨ $p<0.0001$ vs MPTP + PPI-1011 (10 mg/kg) treated mice. One-way ANOVA followed by a Holm-Sidak's multiple comparison test.

Figure 2.3 Dose-response effect of PPI-1011 (10, 50 and 200 mg/kg) on macrophages density in MPTP-treated mice compared to saline-treated controls. (a) Representative microphotographs of sections from the distal ileum following an immunofluorescence with an antibody raised against Iba-1 to identify myenteric macrophages (green staining) and DAPI staining to see nuclei (blue) in saline, MPTP and MPTP + PPI-1011 (50 mg/kg)-treated mice. Scale bars = 4 μm. (b) Quantitative comparison of macrophages density in myenteric plexus of mice is shown. Macrophages density was increased in MPTP-treated mice and was maintained to control level with PPI-1011 (50 and 200 mg/kg) treatments. Values shown are the means of densities ± S.E.M. of 10 mice per condition. ** $p<0.01$ vs saline-treated mice, # $p<0.05$ vs MPTP-treated mice, Ψ $p<0.05$ vs MPTP + PPI-1011 (10 mg/kg) treated mice. One-way ANOVA followed by a Holm-Sidak's multiple comparison test.

Figure 2.4 Effect of PPI-1011 (10 and 50 mg/kg) treatment on neurons of MPTP-lesioned compared to non-MPTP mice controls. (a) Quantitative comparison of total neurons in myenteric plexus of mice showed no difference between each treatment. (b) Quantitative comparison of the TH^+ neurons densities in the myenteric plexus of mice. The density of TH^+ neurons was decreased in MPTP-treated mice and was maintained at control level

with PPI-1011 (50 mg/kg) treatment. (c) Ratios of TH^+ neurons over total neurons in percent. (d) Quantitative comparison of the density of myenteric macrophages in myenteric plexus of mice in different conditions. The macrophages density increased in the MPTP-treated mice compared to the saline control. The macrophages density was maintained at control level with PPI-1011 (50 mg/kg) in MPTP-treated mice. Values shown are the means of densities ± S.E.M. of 10 mice per condition. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs Saline-treated mice, # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$ vs MPTP-treated mice. Two-way ANOVA followed by a Holm-Sidak's multiple comparison test.

Figure 2.5 Effect of PPI-1011 (10 and 50 mg/kg) treatment on macrophages of MPTP-lesioned compared to non-MPTP mice controls. (a) Representative microphotographs of sections from the distal ileum following an immunofluorescence with an antibody raised against MHC II to identify myenteric pro-inflammatory macrophages (green staining) and DAPI staining to see nuclei (blue) in saline, MPTP and PPI-1011 (50 mg/kg) with MPTP-treated mice. Scale bars = 4 μm. (b) Comparative quantification of MHC II^+ macrophages density is shown. MPTP induced an increase of pro-inflammatory macrophages compared to control. PPI-1011 (50 mg/kg) prevented this augmentation in MPTP-treated mice. Values shown are the means of proportions ± S.E.M. of 10 mice per condition. *** $p<0.001$ vs Saline-treated mice, # $p<0.05$ vs MPTP-treated mice. Two-way ANOVA followed by a Holm-Sidak's multiple comparison test.

Figure 2.6 Effect of PPI-1011 (5, 10 and 50 mg/kg) administration post MPTP lesion on total myenteric neurons, in TH^+ neurons and on macrophages in MPTP-treated mice

compared to saline-treated controls. (a) Quantitative comparison of total neurons in myenteric plexus of mice in different conditions showing no difference. (b) Quantitative comparison of density of TH^+ neurons in myenteric plexus of mice in different conditions. The density of the TH^+ neurons decreased in the MPTP mice and was protected with the PPI-1011 (50 mg/kg) treatment. (c) Ratios of TH^+ / total neurons in % (d) Quantitative comparison of the density of macrophages in myenteric plexus of mice in different conditions is shown. The macrophages density increased significantly in the MPTP-treated mice compared to saline controls. The macrophages density was maintained to control level with the PPI-1011 (50 mg/kg) treatment. Values shown are the means of densities ± S.E.M. of 10 mice per condition. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs Saline-treated mice, # $p<0.05$ vs MPTP. One-way ANOVA followed by a Holm-Sidak's multiple comparison test.

Figure 2.1

PlsEtn levels in dose-response experiment

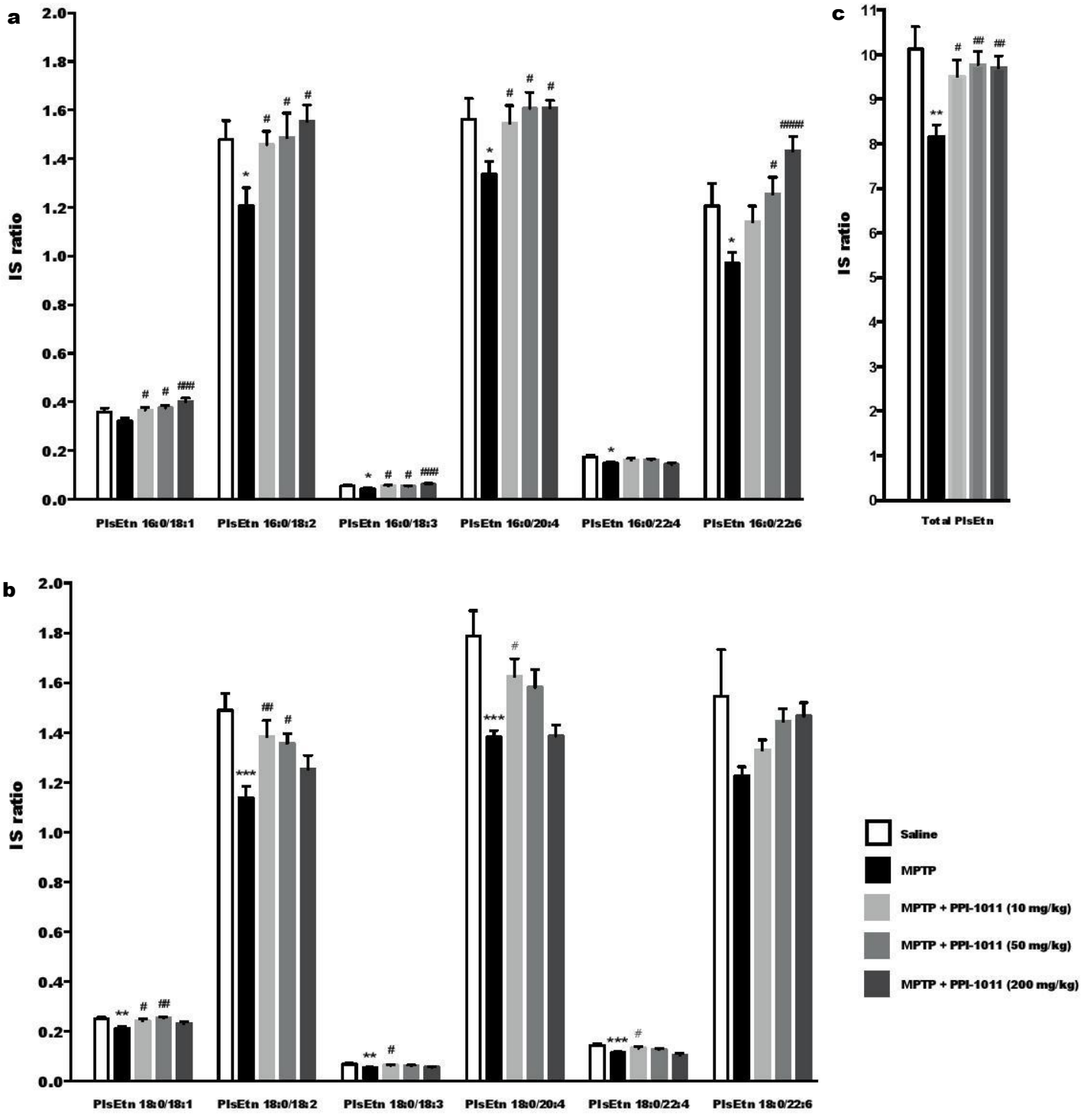


Figure 2.2

Dose-response of PPI-1011 neuroprotection in myenteric neurons

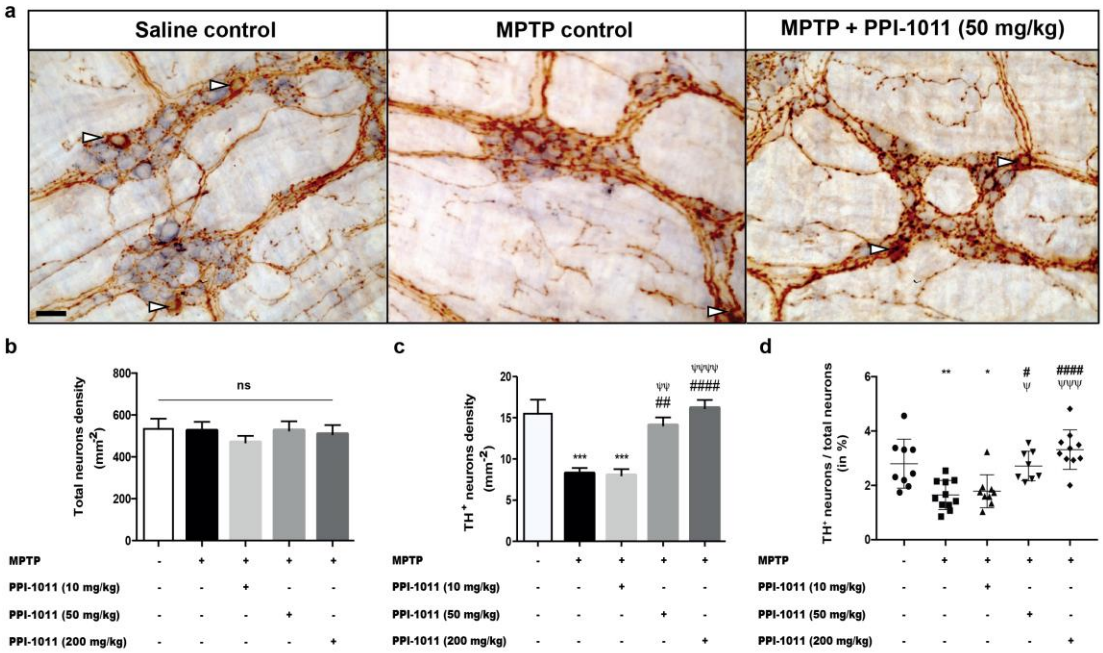


Figure 2.3

Dose-response of PPI-1011 neuroprotection in myenteric macrophages

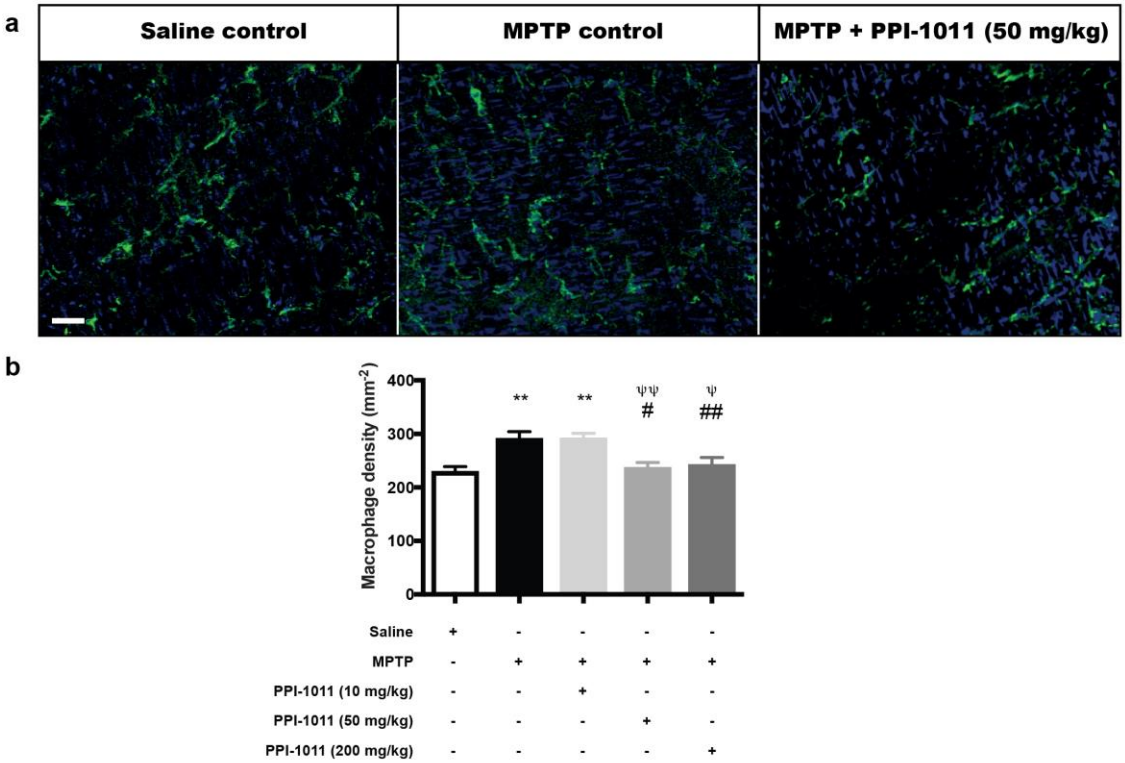


Figure 2.4

Effect of PPI-1011 in in myenteric neurons of intact and lesioned mice

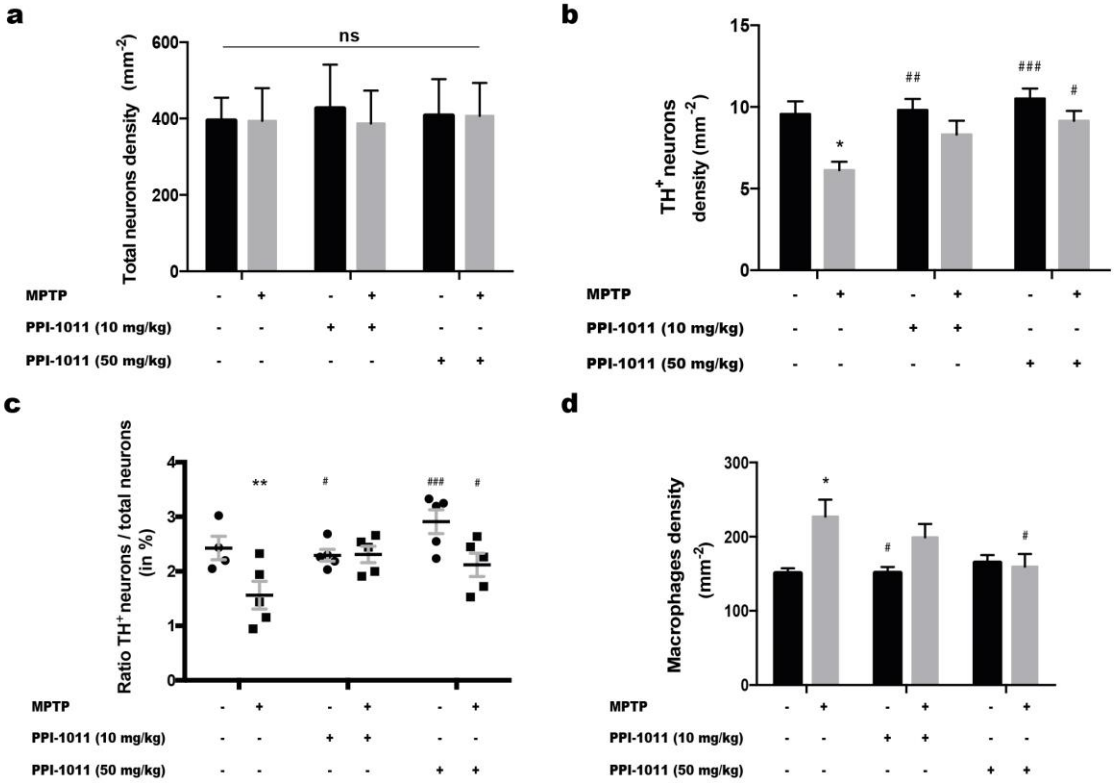


Figure 2.5

Effect of PPI-1011 in in myenteric pro-inflammatory macrophages of intact and lesioned mice

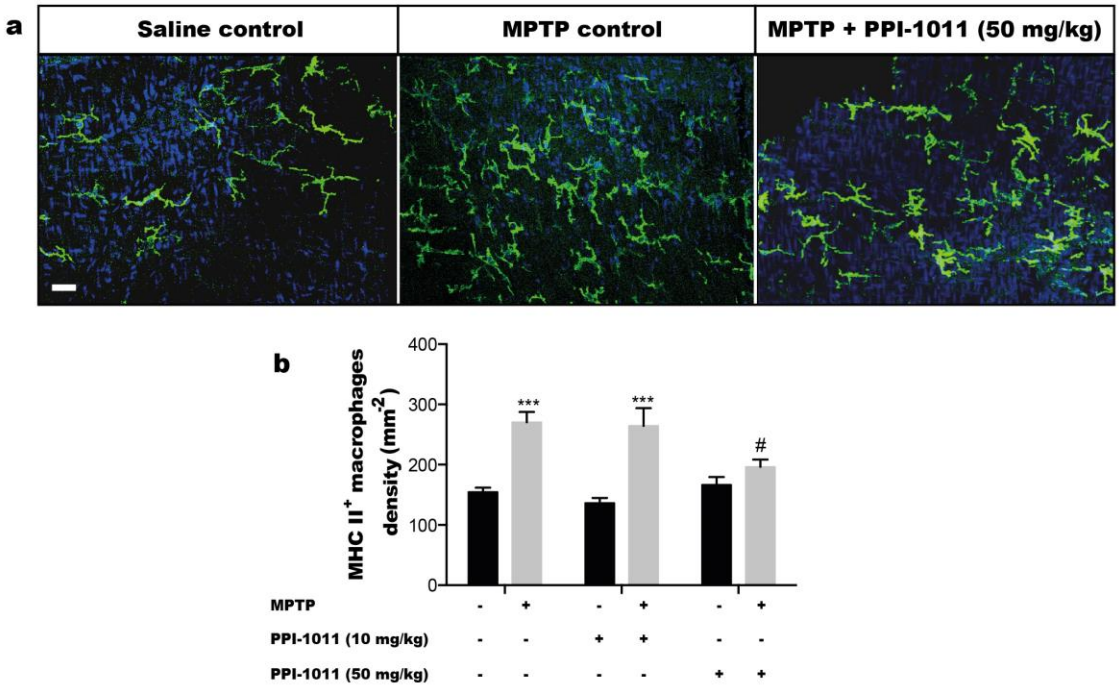
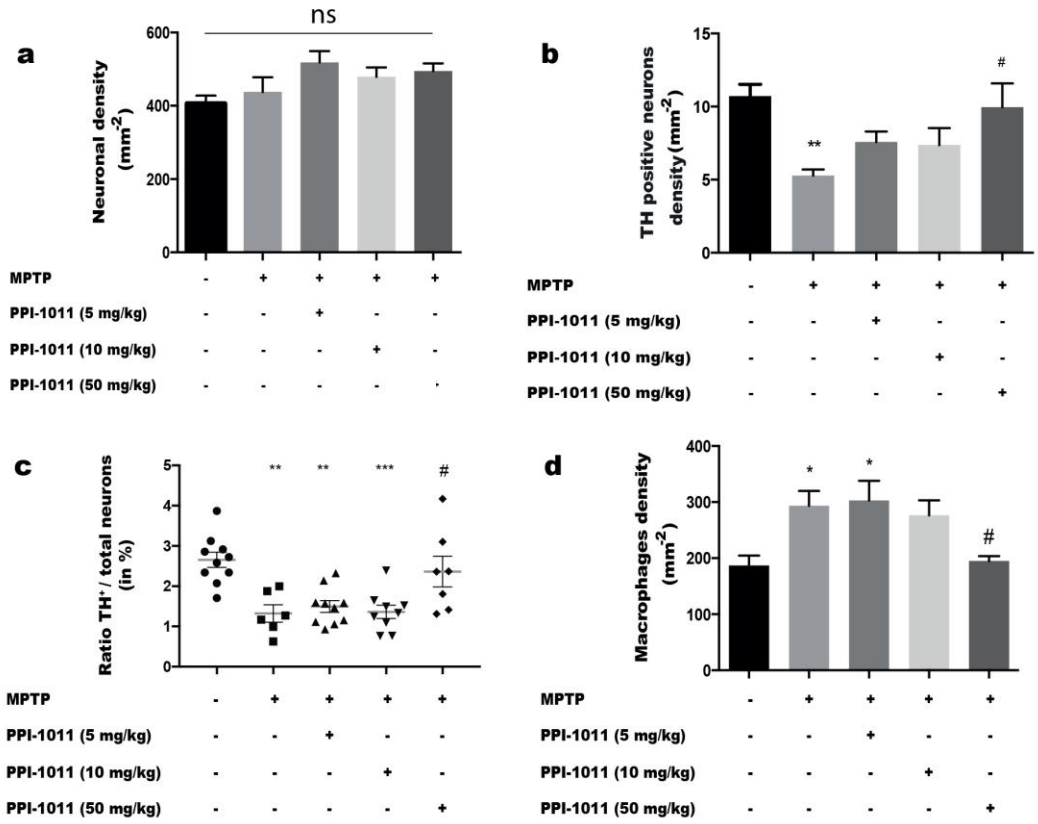


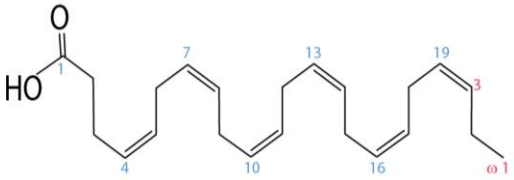
Figure 2.6

Effect of PPI-1011 administered post-lesion on myenteric neurons and macrophages

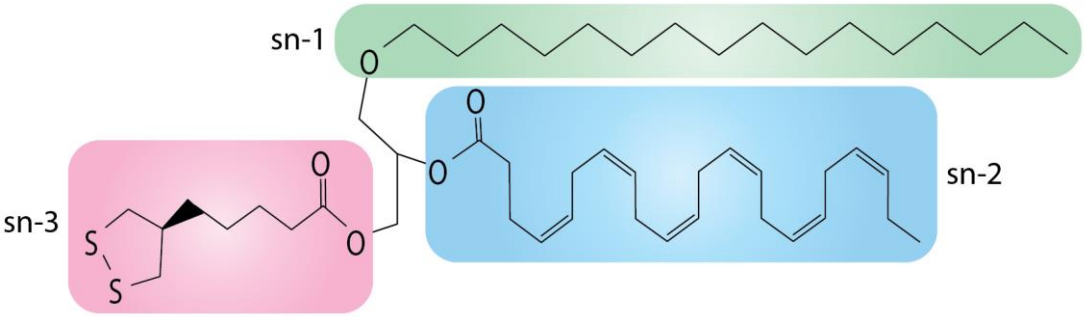


Supplemental Figure 2. 1: Structural formulas

Structure of **docosahexaenoic acid** (DHA):

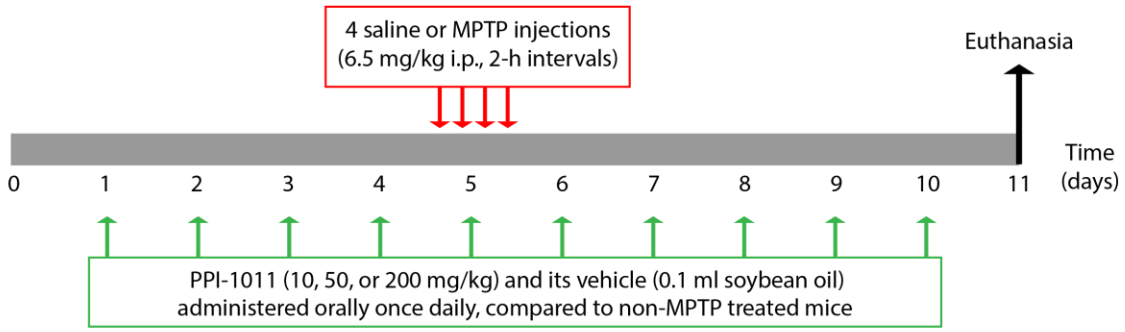


PPI-1011 is an alkyl-diacyl plasmalogen precursor with palmitic acid at sn-1, DHA at sn-2 and lipoic acid at sn-3:

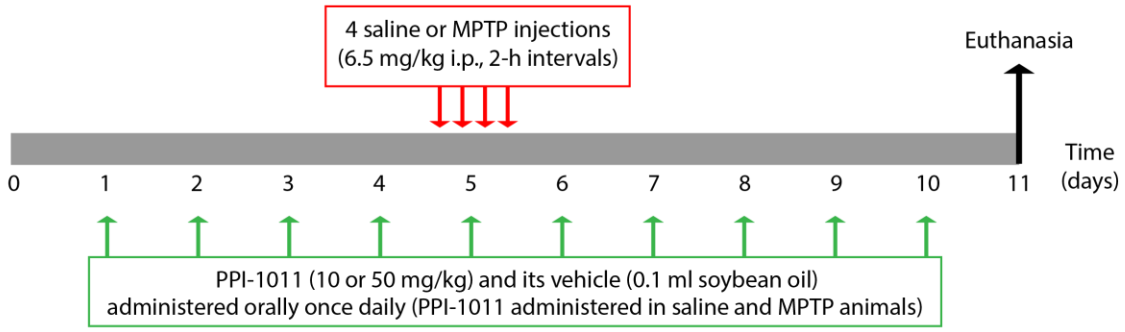


Supplemental Figure 2. 2: Experimental design and timeline

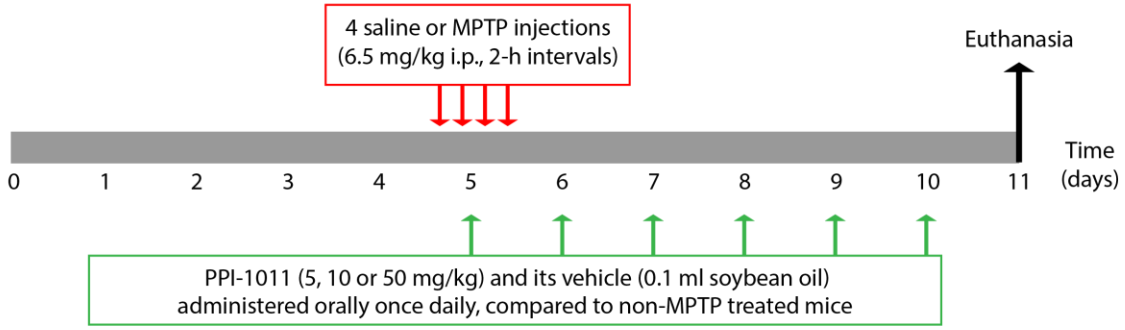
a) Pre-MPTP neuroprotection experiment — PPI-1011 dose-finding (one-way ANOVA, Holm-Sidak's multiple comparisons)



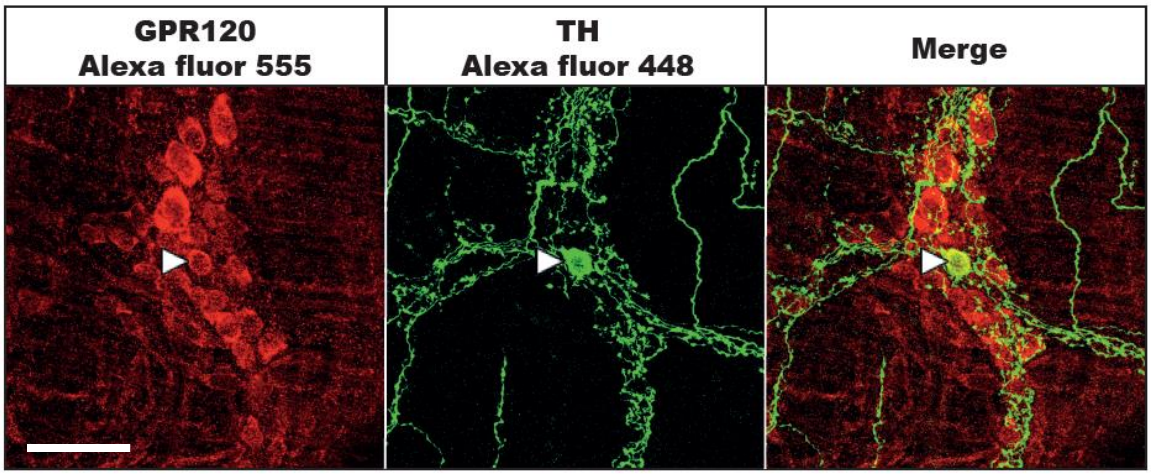
b) Experiment of pre-MPTP neuroprotection at optimal doses in MPTP and non-MPTP treated mice (two-way ANOVA, Holm-Sidak's multiple comparisons)



c) Experiment with PPI-1011 administered post-MPTP to assess neurorestoration (one-way ANOVA, Holm-Sidak's multiple comparisons)

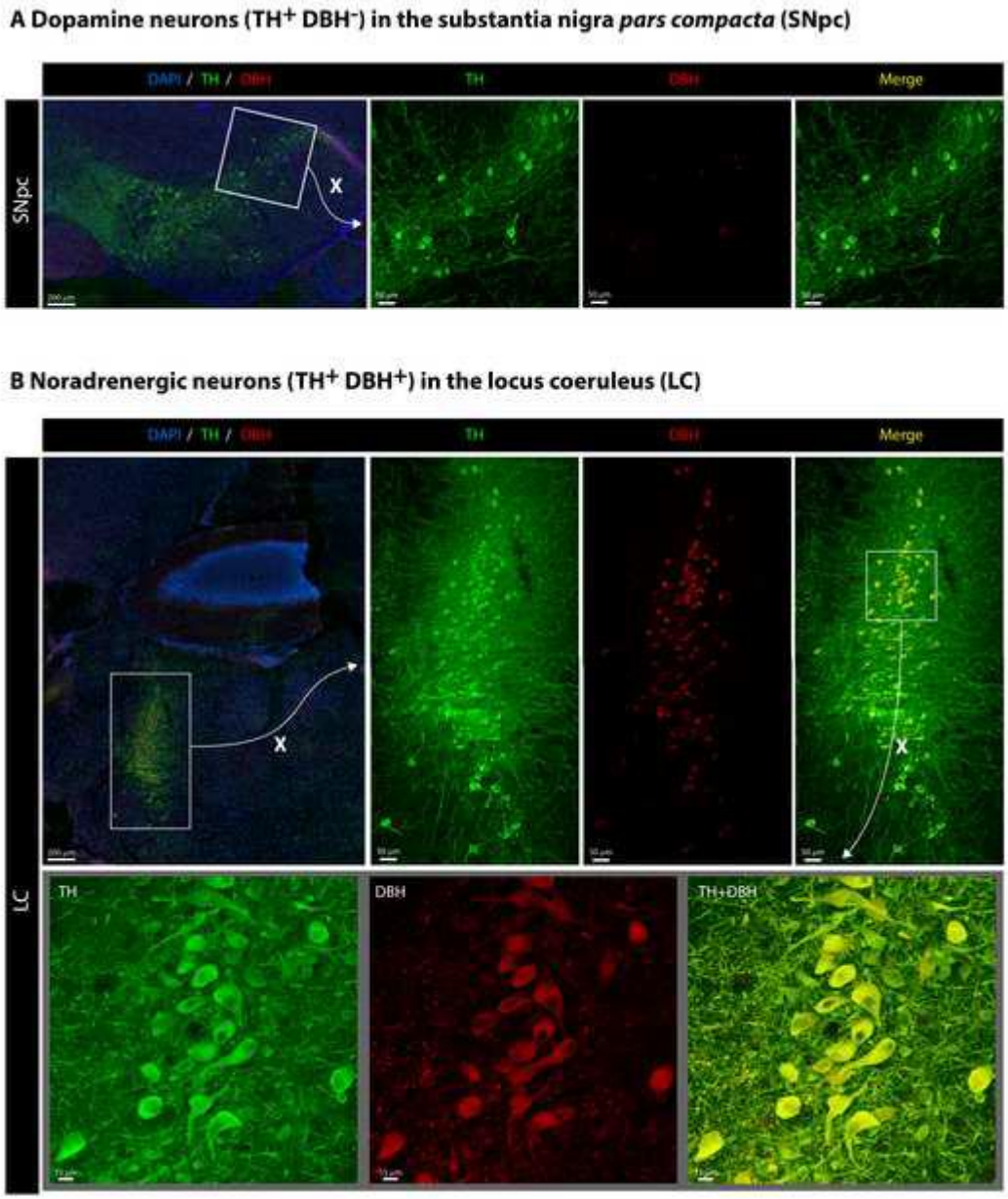


Supplemental Figure 2. 3



Representative microphotographs of sections from the distal ileum illustrating the GPR120 protein (red) and TH^+ neurons (green) in the myenteric plexus of mice. White arrowheads show a TH^+ cell body in ganglion. Scale bars =4 μm. These microphotographs show that GPR120 is expressed in myenteric neurons including TH^+ neurons.

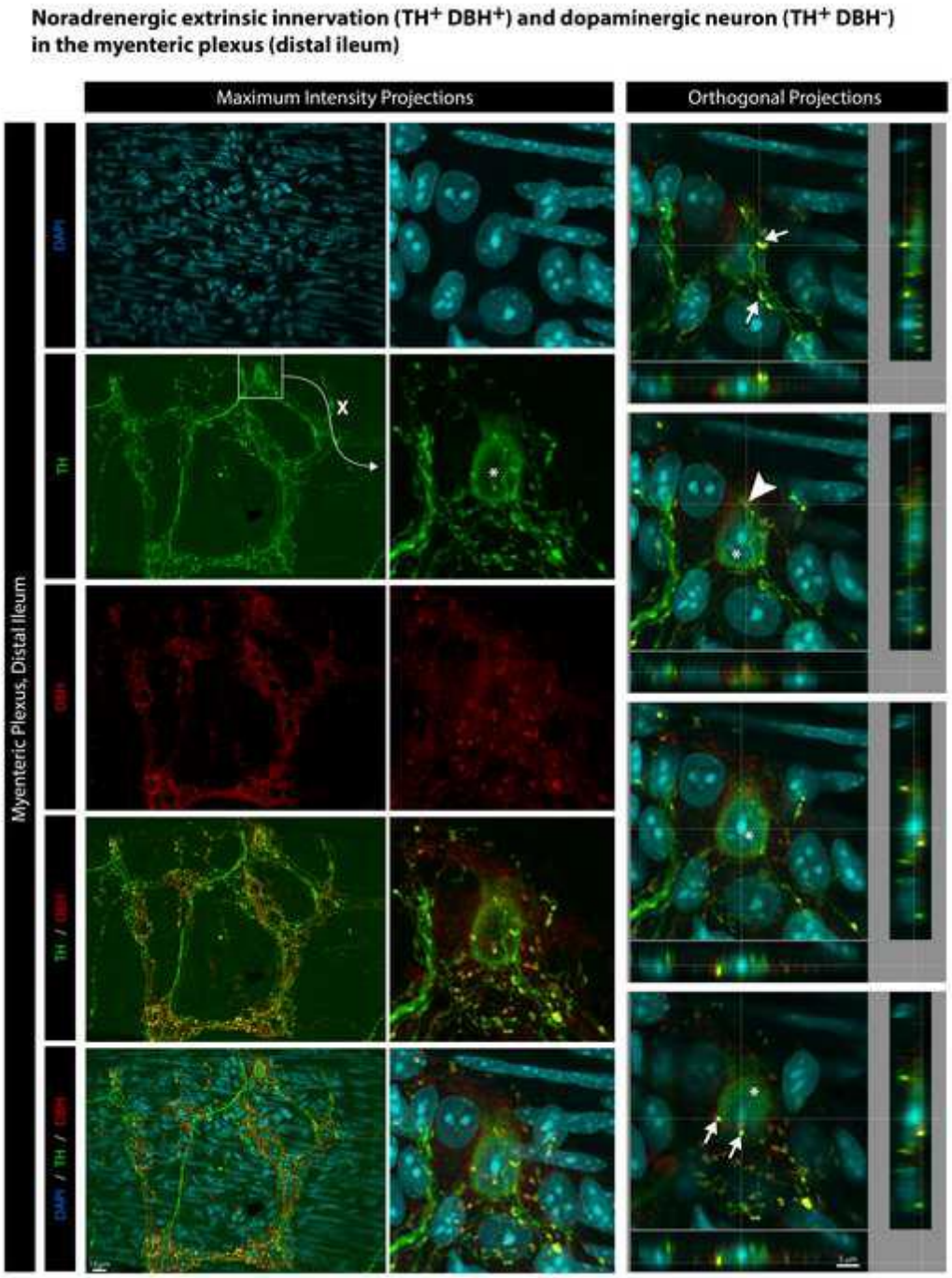
Supplemental Figure 2. 4



Representative confocal microphotographs of mouse brain sections from the *substantia nigra* (A) and the *locus coeruleus* (B) showing the expressing of dopamine beta-hydroxylase (DBH) protein (red), a marker of noradrenergic neurons, and TH^+ neurons (green). As control experiments, these microphotographs show that neurons in the

substantia nigra are dopaminergic TH^+ neurons while neurons in the *locus coeruleus* are mostly noradrenergic (red and green labeling overlapping), hence validating the quality of the immunofluorescence labeling.

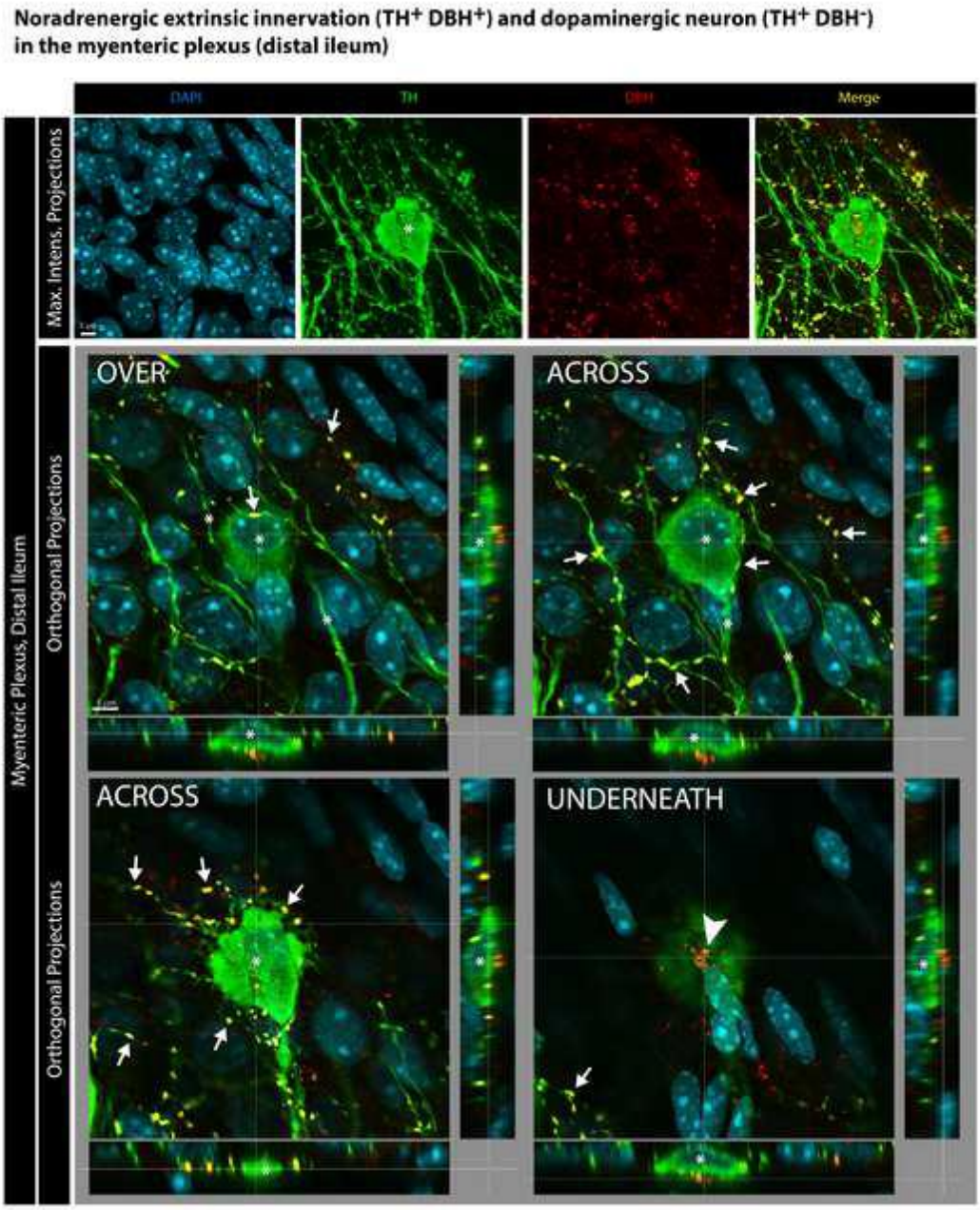
Supplemental Figure 2. 5



Representative confocal microphotographs showing the expressing of dopamine beta-hydroxylase (DBH) protein (red), a marker of noradrenergic neurons, and TH^+ neurons (green) in a whole mount preparation of myenteric plexus (distal ileum). All observed TH^+

neuronal cell bodies are DBH^-, suggesting that intrinsic these myenteric neurons are dopaminergic neurons. Moreover, DBH immunoreactivity is observed only in varicosities outside of neuronal cell bodies (i.e. not in the same confocal plane, see orthogonal projections), suggesting that noradrenergic innervation is of extrinsic origin. *, dopaminergic neuron cell body; white arrows, DBH^+/TH^+ varicosities; white arrowhead, DBH^+/TH^- varicosity.

Supplemental Figure 2. 6



A second set of representative confocal microphotographs showing the expressing of dopamine beta-hydroxylase (DBH) protein (red), a marker of noradrenergic innervation, and TH^+ neurons (green) in a whole mount preparation of myenteric plexus (distal ileum). The neuron cell bodies in the center of the picture is both TH^+ and DBH^-, suggesting that

these type of myenteric neurons are dopaminergic neurons but not noradrenergic neurons. Moreover, DBH immunoreactivity is observed only in varicosities outside of neuronal cell bodies (i.e. not in the same confocal plane, see orthogonal projections), suggesting that noradrenergic innervation is of extrinsic origin. *, dopaminergic neuron cell body; white arrows, DBH^+/TH^+ varicosities; white arrowhead, DBH^+/TH^- varicosity.

CHAPITRE 3

Discussion

Ce projet a permis d'observer la capacité du PPI-1011, un précurseur de PGE, à protéger les neurones DAergiques au niveau intestinal chez les souris lésées par la neurotoxine MPTP en limitant la réponse inflammatoire. Ces effets ont été observés dans le protocole de prétraitement aux doses de 50 et 200 mg/kg de PPI-1011 ainsi que dans le protocole post-traitement avec la dose de 50 mg/kg de PPI-1011.

3.1 Niveaux des différentes espèces de plasmalogènes dans le protocole dose-réponse

La neurotoxine MPTP a entraîné une diminution du niveau total de plasmalogènes dans le plasma. Ainsi, il reproduit la diminution de plasmalogènes présents dans le plasma et le cerveau chez les parkinsoniens. L'administration de PPI-1011 permet de rétablir les niveaux de plasmalogènes totaux dans le plasma.

Les niveaux de PGE (16:0/22:6) dans le plasma qui est l'espèce cible du précurseur sont ceux qui semblent correspondre le mieux aux doses administrées au souris. (Fig 2.1) Si les espèces de PGE (16:0) sont généralement cohérentes avec les doses de PPI-1011 administrées, les espèces de PGE (18:0) présentent un tout autre portrait. La plus forte dose de PPI-1011 (200 mg/kg) ne permet dans aucun cas de rétablir les niveaux des espèces de PGE (18:0) chez les souris lésées par la neurotoxine MPTP.

Il n'est pas surprenant que les niveaux de PGE (16:0/22:6) soient les plus représentatifs des doses de PPI-1011 administré, puisque le PPI-1011 n'a que trois réactions a subir pour passer à cette forme de plasmalogène[285]. Aussi, il ne nécessite que la présence de cytidines phosphoéthanolamines en plus de quelques enzymes[285]. (Fig 1.19)

Les autres espèces 16:0 sont elles aussi généralement représentatives des doses de PPI-1011 administrées. La conversion des PGE (16:0/22:6) nécessite l'action de la phospholipase A2[218]. Celle-ci hydrolyse sélectivement le carbone 2 du glycérol des plasmalogènes[218]. Suite au

détachement du DHA du carbone 2 du glycérol, des lysophospholipides acyltransférases vont remplacer cette chaine carbonée par une autre [285]. Son activité est également plus élevée dans le foie et dans l'intestin grêle[255]. L'activité de cette enzyme explique fort probablement la corrélation entre les doses de PPI-1011 et les espèces de PGE (16:0) (Figure 1.18).

Les niveaux des espèces de PGE (18:0) de leur côté ne corrèlent pas avec les doses administrées. Deux raisons majeures permettent d'expliquer cette observation. D'abord, le PGE (16:0/22:6) ne peut pas changer son alcool gras saturé par un autre avec les enzymes de la voie de biosynthèse abordé dans la section sur les plasmalogènes. Parallèlement, l'augmentation de plasmalogènes entraine une rétroinhibition de l'enzyme FAR1[258]. Celle-ci convertit les acides gras en alcools gras qui sont nécessaires à la synthèse des plasmalogènes endogènes[244]. Ainsi, l'administration du PPI-1011 à forte dose (200 mg/kg) pourrait avoir pour effet d'augmenter les niveaux de plasmalogènes totaux suffisamment pour entrainer la dégradation de l'enzyme FAR1. La question qui reste à savoir concerne l'augmentation du niveau des espèces de PGE (18:0) pour la dose de 50 mg/kg de PPI-1011. Deux hypothèses permettraient d'expliquer leur augmentation. La première est que les PGE (16:0) présents en plus grande quantité en raison du précurseur PPI-1011 puissent protéger les PGE (18:0) de l'oxydation. La deuxième qui pourrait être liée à la première est l'existence de mécanismes de remodelages enzymatiques qui n'auraient pas été abordés dans ce mémoire.

Selon les résultats de neuroprotection avec le PPI-1011 obtenus au cerveau, la dose de 200 mg/kg n'avait plus d'effets neuroprotecteurs contrairement aux doses de 10 et 50 mg/kg. Il se pourrait que ce système de rétroinhibition via l'enzyme FAR1 y cause une diminution de la production des plasmalogènes endogènes à partir du DHAP pouvant expliquer ce phénomène. Le PPI-1011 est à une étape ultérieure à l'enzyme FAR1 et les niveaux de PGE (16:0) augmentent dans le cerveau. Il se peut que certaines espèces de plasmalogènes soient nécessaires à l'effet observé au niveau central et que le précurseur administré ne cause une baisse de ces espèces endogènes en raison d'une dégradation de l'enzyme FAR1. Selon cette hypothèse, certaines espèces de plasmalogènes pourraient être nécessaires spécifiquement au niveau central et non au niveau périphérique, ce qui expliquerait que les effets neuroprotecteurs soient observés avec une dose de 200 mg/kg au niveau intestinal et non au niveau central.

3.1 Effets neuroprotecteurs du PPI-1011 dans les protocoles de prétraitement et post-traitement

En plus d'être largement utilisé au niveau du SNC, le modèle MPTP reproduit certaines dysfonctions gastro-intestinales retrouvées chez les parkinsoniens[385], ce qui en fait un modèle de choix pour l'étude de la MP au niveau du SNE.

L'administration de PPI-1011 (50 et 200 mg/kg) a protégé les neurones positifs à la TH dans le SNE contre la neurotoxine MPTP chez la souris. Ce résultat confirme une étude précédente réalisée sur les mêmes souris, mais au niveau du SNC, qui avait constaté un effet neuroprotecteur avec une dose de 50 mg/kg[286]. Considérant que la molécule doit circuler dans le réseau sanguin, puis traverser la BHE pour atteindre le SNC, une dose efficace plus faible était attendue dans le plexus myentérique. Bien que nous n'ayons pas mesuré les niveaux de plasmalogènes dans l'intestin pour ce projet, on peut supposer que la forte activité de la lysoplasmalogénase spécifique au foie et à l'intestin grêle[255,256] soit impliquée dans cette observation. Tel que mentionné précédemment, cette enzyme catalyse spécifiquement le clivage de la liaison vinyle-éther sur le carbone un des plasmalogènes[232]. Ainsi, les plasmalogènes qui n'ont pas rejoint la circulation sanguine, mais intégré les membranes des cellules intestinales sont probablement affectés par cette enzyme. L'effet neuroprotecteur observé suggère que la dose de 50 mg/kg permet de saturer ce système de régulation des plasmalogènes dans l'intestin.

Le DHA présent sur le carbone deux du glycérol peut être relâché par l'hydrolyse de ce dernier via la phospholipase A2[218]. Une augmentation des niveaux de DHA a d'ailleurs été rapportée suite à l'administration orale de PPI-1011 dans le plasma chez le lapin[285]. Suite au détachement du DHA du carbone 2 du glycérol, des lysophospholipides acyltransférases vont remplacer cette chaine carbonée par une autre. L'activité de la phospholipase A2 est également plus élevée dans le foie et dans l'intestin grêle[255]. Ainsi, on peut facilement supposer que le DHA puisse lui aussi jouer un rôle dans l'effet neuroprotecteur observé, tel qu'abordé dans la section sur le DHA.

Aucun changement significatif n'a été observé chez les souris contrôles ayant reçu seulement le PPI-1011, indiquant que le précurseur de PGE ne stimule ni l'expression de TH par les neurones, ni la prolifération des neurones positifs à la TH en situation physiologique. De plus la densité des neurones totaux dans le plexus myentérique n'a pas changé entre les différentes conditions testées.

3.2 Effets anti-inflammatoires du PPI-1011 dans les protocoles de prétraitement et post-traitement

Le modèle MPTP est également caractérisé par une augmentation du stress oxydatif et de la peroxydation des lipides[386]. Ces deux éléments favorisent un état pro-inflammatoire et sont probablement responsables de la diminution des PGE dans le plasma et dans le cerveau chez les patients[276,277] ainsi que dans le modèle MPTP[286]. Une inflammation chronique est observée au niveau du SNC et du SNE chez les parkinsoniens et pourrait être impliquée dans la dégénérescence des neurones DAergiques. Cette activité excessive du système immunitaire est donc une cible intéressante dans le traitement de la MP.

L'administration de PPI-1011 (50 et 200 mg/kg) a complètement inhibé l'infiltration des macrophages dans le plexus myentérique induite par la neurotoxine MPTP chez la souris. Une étude antérieure avait rapporté l'absence de toxicité de la neurotoxine MPTP sur les neurones DAergiques en absence d'inflammation[197]. Ainsi, cet effet anti-inflammatoire est certainement impliqué dans l'effet neuroprotecteur observé dans le SNE chez la souris MPTP.

Le rôle le plus évident des PGE dans la médiation de l'inflammation est leur capacité à limiter le stress oxydatif, en raison de leur liaison vinyl éther[241,387]. Cette liaison les rend préférentiellement oxydables par rapport aux autres acides gras insaturés. On peut supposer que cette protection des acides gras insaturés tels que le DHA leur permettra par la suite d'être transformés en médiateurs lipidiques qui régulueront l'inflammation. De fait, plusieurs des effets anti-inflammatoires liés au plasmalogènes sont en fait associés à la relâche des groupes attachés au squelette de glycérol.

Dans le cas présent, l'acide lipoïque sur le carbone trois du glycérol est clivé du plasmalogène par une lipase intestinale[285]. Une augmentation des niveaux d'acide lipoïque dans le plasma a été observée suite à l'administration de PPI-1011 chez le lapin[285]. L'acide lipoïque est connu pour stimuler l'expression du glutathion, un antioxydant important pour les cellules[388]. Par ce fait même, l'acide lipoique pourrait réduire le stress oxydatif et inhiber l'inflammation induite par le MPTP.

Le DHA est quant à lui bien connu pour ses effets anti-inflammatoires. Une fois relâché par la phospholipase A2, cet acide gras polyinsaturé peut être métabolisé pour former des dérivés dont les résolvines, les docosatriènes et les neuroprotectines[326,389], dont les effets ont été abordés

précédemment. Le DHA peut également agir directement le récepteur membranaire GPR120 pour inhiber l'activation de NF-κB[359]. Ce récepteur membranaire est hautement exprimé dans le caecum et dans la partie proximale du colon chez la souris[358]. Des études ont rapportées la présence préférencielle du GPR120 dans la muqueuse à proximité de la lumière intestinale [390]. Tel que présenté dans la figure supplémentaire, le GPR120 est exprimé dans les neurones du plexus myentérique, suggérant l'implication des neurones dans le contrôle de la réponse inflammatoire médiée par le DHA.

Chez les souris contrôles, le PPI-1011 n'a pas induit de diminution du nombre de macrophages dans l'iléon distal. Les niveaux de PGE sont diminués chez les souris lésées par la neurotoxine MPTP et sont maintenus avec le PPI-1011. Chez les souris contrôles n'ayant reçu que le PPI-1011, cet excès de PGE n'induit pas d'effet anti-inflammatoire dans cette région de l'intestin.

3.3 Réflexions sur mon projet de recherche de maitrise

La cause de la perte de l'expression de TH n'est pas bien comprise. Pourtant, dans le modèle MPTP cette perte représente le principal élément observé pour vérifier l'altération des neurones DAergique. Supposons que cette perte ne soit pas une conséquence de la MP, mais soit plutôt un mécanisme de protection de la cellule en réponse à une agression, le stress oxydatif par exemple. L'organisme humain est en mesure de s'adapter à de très nombreuses situations que se soit au niveau musculaire ou cellulaire pour favoriser la survie, et ce parfois aux dépens de la fonction. La perte de TH observée en périphérie dans le modèle MPTP pourrait n'être qu'un mécanisme de protection pour protéger les neurones qui avaient la fonction de produire la DA. Ce neurotransmetteur peut s'auto-oxydé et ainsi amplifier le stress oxydatif [149,150]. L'utilisation de la L-DOPA pour suppléer le manque de DA dans les neurones DAergiques pourrait donc avoir pour effet d'aggraver le stress oxydatif dans les cellules. D'ailleurs, il a été démontré que l'utilisation de L-DOPA entraine des modification dans la composition lipidique[176], possiblement en lien avec l'oxydation des lipides. Après le retrait du MPTP, il a été démontré que ces neurones reprenaient leur capacité à produire de la DA[391]. Autrement dit, la production de DA pourrait être influencée par la présence de ROS ou de tout autre acteur du stress oxydatif. Une étude sur des neurones DAergiques humains a d'ailleurs observé une augmentation de la production de DA suite à l'ajout de vitamine C qui peut agir comme antioxydant[392]. Chez les parkinsoniens, au niveau du système nerveux central, il est bien documenté qu'il y a une mort des neurones DAergiques. Néanmoins, des neurones qui n'accomplissent plus leur fonction sont portés à dégénérer faute d'inactivité

électrique [393]. La baisse de plasmalogènes pourrait également favoriser cette inactivité. Les chaînes carbonées en position 1 et 2 sur le glycérol du plasmalogènes sont presque parallèles, ce qui augmente leur longueur et l'ordre dans la membrane en diminuant sa fluidité. Cette caractéristique favorise la formation de phase mono couche à des températures moins élevées qui sont nécessaires à la fusion et à la fission cellulaires[229,230]. Ces mécanismes sont essentiels à la formation des vésicules lors de la neurotransmission, par exemple[229,230].

CHAPITRE 4

Conclusion

En conclusion, les présents résultats sont les premiers à rapporter un effet neuroprotecteur pré- et post-lésion des neurones DAergiques du précurseur oral de PGE dans l'intestin chez la souris lésée par la neurotoxine MPTP. Considérant que la diminution de la densité des neurones positifs à la TH dans le plexus myentérique est impliquée dans la dysfonction du système digestif chez les parkinsoniens, ce traitement pourrait être utilisé pour prendre en charge les symptômes non moteurs. L'administration de PPI-1011 a également permis d'observer un effet anti-inflammatoire dans l'intestin dans le modèle MPTP chez la souris. De plus ce traitement a permis de rétablir les niveaux de PGE (16:0) dans le plasma. Considérant que chaque individu est différent, nous n'en sommes pas rendus à pouvoir normaliser chacune des composantes augmentées ou diminuées chez les parkinsoniens. Néanmoins, les propriétés des plasmalogènes en font un acteur potentiellement majeur dans la protection des patients à risque ou en phase précoce de la maladie. Cette nouvelle approche pourrait être utilisée pour prévenir et retarder l'initiation et la progression de la MP.

CHAPITRE 5

Perspectives

5.1 Mécanismes impliquées dans les effets neuroprotecteurs et anti-inflammatoire du PPI-1011

Il serait intéressant de vérifier si les effets neuroprotecteurs du PPI-1011 sur les neurones DAergiques sont directs ou passe par l'inhibition des mécanismes inflammatoires tels que l'infiltration des macrophages. Une étude *in vitro* réalisée au sein du laboratoire du Dr Soulet a démontrée le rôle essentiel de facteurs pro-inflammatoires produits par les monocytes dans l'altération des neurones DAergiques [197]. Cette expérience pourrait être adapté pour vérifier les cibles efficaces du PPI-1011. Pour ce faire, du PPI-1011 devrait dabord être ajouté au milieu de culture cellulaire de neurones DAergiques. Par la suite, le milieu de culture cellulaire de macrophages pro-inflammatoires induits par la neurotoxine MPP^+ pourrait être introduit dans le milieu de neurones DAergiques en présence de MPP^+. Cette étude permettrait de vérifier si l'action du PPI-1011 passe principalement par les neurones DAergiques ou si son effet anti-inflammatoire sur les monocytes est nécessaire à la protection des neurones. La première possibilité est intéressante lorsqu'on sait que le récepteur GPR120 qui peut être activé par le DHA est exprimé sur les neurones du plexus myentérique. Rappelons que l'activation du GPR120 peut inhiber l'activation de NF-κB lequel peut réguler la dynamique des mitochondries [394].

Advenant un effet neuroprotecteur direct, il serait alors pertinent de vérifier si les effets du PPI-1011 passent par le GPR120 et l'inhibition de la voie NF-κB *in vitro*. Des ARN interférants pourraient être utilisés pour bloquer l'expression du GPR120. Le DHA serait utilisé comme contrôle positif. Une inhibition du GPR120 permettrait de voir si les effets observés passent par cette protéine.

Rappelons tout de même que le GPR120 est très faiblement exprimé dans le cerveau[358]. Ainsi, l'effet neuroprotecteur du PPI-1011 rapporté au niveau central suggère que le GPR120 ne soit pas le seul médiateur impliqué dans l'effet neuroprotecteur observé au niveau intestinal. Il n'en demeure pas moins intéressant, considérant l'importance de l'inflammation dans l'altération des neurones DAergiques au niveau intestinal[196].

Il se pourrait que l'effet neuroprotecteur passe à la fois par la liaison du DHA au GPR120 et par l'action antioxydante des plasmalogènes, il pourrait donc être intéressant de vérifier si un autre agent antioxydant prévient l'altération des neurones DAergiques en présence de MPP+. Pour ce faire, des neurones DAergiques pourrait être placé en présence de MPP^+ et de surnageant de macrophages pro-inflammatoire auquel aurait été ajouter de la vitamine C[392].

Enfin, considérant le rôle anti-inflammatoire du PPI-1011, il serait intéressant de vérifier *in vitro* comment agis le PPI-1011. Pour ce faire, le dosages des niveaux de cytokines pro-inflammatoires modulées par le PPI-1011 en présence de LPS et de MPP+ *in vitro* pourrait être réalisé.

5.2 Effet du PPI-1025 chez la souris en comparaison avec le PPI-1011

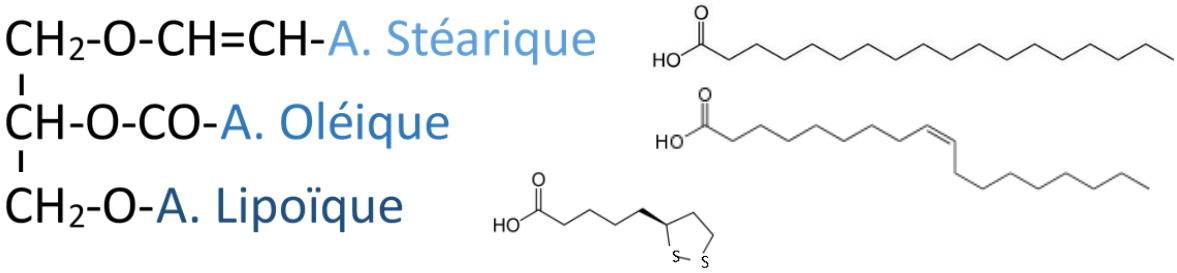


Figure 1. 22 : Structure chimique du PPI-1025, de l'acide stéarique, de l'acide oléique et de l'acide lipoïque [395]

Ce deuxième analogue de PPI également développé par la compagnie Med Life Discoveries, antérieurement Phenomenome Discoveries Inc., pourrait lui aussi être testé au niveau intestinal. Il a lui aussi permis d'observer un effet neuroprotecteur au niveau du SNC dans le modèle MPTP chez la souris[395], mais de façon moins prononcée que le PPI-1011 [286]. Le PPI-1025 est intéressant, puisqu'il contient l'acide oléique plutôt que le DHA. L'acide oléique est impliqué dans différentes voies signalitiques[396]. Sa caractéristique la plus notable par rapport à un effet neuroprotecteur est son implication dans la régulation du récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR), lequel peut intervenir au niveau de l'oxydation des lipides[397,398]. Cette expérience permettrait de vérifier l'implication des plasmalogènes dans l'effet neuroprotecteur observé.

5.3 Effet du PPI-1011 dans un modèle de la maladie de Crohn

Considérant les effets anti-inflammatoires observés au niveau intestinal dans le modèle MPTP chez la souris, il serait particulièrement intéressant de vérifier si le PPI-1011 a des effets bénéfiques dans d'autres maladies inflammatoires de l'intestin, tel que la maladie de Crohn [399]. Le modèle «T Cell Transfer Model of Colitis[400]» est le plus largement utilisé dans l'étude des colites[401].

5.4 Effet des plasmalogènes dans le vieillissement

Une étude préliminaire réalisée dans le laboratoire du Dr Soulet a rapportée une différence au niveau des densités de neurones TH^+ et de macrophages dans l'intestin entre les souris jeunes et les souris vieilles[62]. Les souris jeunes se caractérisaient par une densité élevée de neurones TH^+ et une densité faible de macrophages. De leur côté, les souris vieille présentaient le patron inverse. Il serait donc intéressant de vérifier si le PPI-1011 permettrait de diminuer, voir de prévenir ce profil inflammatoire et cette altération des neurones DAergiques chez les souris lors du vieillissement.

Références

1 Hirtz, D., Thurman, D. J., Gwinn-Hardy, K., Mohamed, M., Chaudhuri, A. R. & Zalutsky, R. How common are the "common" neurologic disorders? *Neurology* **68**, 326-337, doi:10.1212/01.wnl.0000252807.38124.a3 (2007).

2 Wong, S. L., Gilmour, H. & Ramage-Morin, P. L. Parkinson's disease: Prevalence, diagnosis and impact. *Health Rep* **25**, 10-14 (2014).

3 Miller, D. B. & O'Callaghan, J. P. Biomarkers of Parkinson's disease: present and future. *Metabolism* **64**, S40-46, doi:10.1016/j.metabol.2014.10.030 (2015).

4 Organismes caritatifs neurologiques du Canada (OCNC), Santé Canada, Agence de la santé publique du Canada (ASPC), Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC). Établir les connexions : Mieux comprendre les affections neurologiques au Canada. **p. 72.** (Sept. 2014).

5 Canada, Statistique Canada et Agence de la santé publique du 'POHEM – affections neurologiques ', (Tableau 3-5 : Prévalence projetée, selon l'affection neurologique sélectionnée, Canada, 2011, 2016, 2021, 2026 et 2031, Projet – Microsimulation),p. 72.

6 Canada, Statistique Canada et Agence de la santé publique du 'POHEM – affections neurologiques ', (Tableau 3-5 : Prévalence projetée, selon l'affection neurologique sélectionnée, Canada, 2011, 2016, 2021, 2026 et 2031, Projet – Microsimulation),p. 42.

7 Canada, Dépliant de la Société Parkinson (2003), 'Les faits sur le Parkinson'.

8 Canada, Santé Canada et Société Parkinson (2003), 'La maladie de Parkinson : ses répercussions sociales et économiques'.

9 de Lau, L. M. & Breteler, M. M. Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet. Neurology* **5**, 525-535, doi:10.1016/S1474-4422(06)70471-9 (2006).

10 Gelb, D. J., Oliver, E. & Gilman, S. Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Archives of neurology* **56**, 33-39 (1999).

11 Grabli, D. *Presse Med* **46**, 187-194, doi:10.1016/j.lpm.2017.01.003 (2017).

12 Gowers, W. A manual of disease of the nervous system. *J.A.Churchill.* **2** (1886).

13 Albin, R. L., Young, A. B. & Penney, J. B. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* **12**, 366-375 (1989).

14 DeLong, M. R. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci* **13**, 281-285 (1990).

15 Schapira, A. H. Science, medicine, and the future: Parkinson's disease. *BMJ* **318**, 311-314 (1999).

16 Azulay, J. P. & Tranchant, C. *Presse Med* **46**, 174, doi:10.1016/j.lpm.2017.02.001 (2017).

17 Pal, P. K., Calne, S., Samii, A. & Fleming, J. A. A review of normal sleep and its disturbances in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* **5**, 1-17 (1999).

18 Menza, M., Dobkin, R. D., Marin, H. & Bienfait, K. Sleep disturbances in Parkinson's disease. *Mov Disord* **25 Suppl 1**, S117-122, doi:10.1002/mds.22788 (2010).

19 Goetz, C. G., Tanner, C. M., Levy, M., Wilson, R. S. & Garron, D. C. Pain in Parkinson's disease. *Mov Disord* **1**, 45-49, doi:10.1002/mds.870010106 (1986).

20 Ford, B. Pain in Parkinson's disease. *Clin Neurosci* **5**, 63-72 (1998).

21 Giuffrida, R., Vingerhoets, F. J., Bogousslavsky, J. & Ghika, J. [Pain in Parkinson's disease]. *Rev Neurol (Paris)* **161**, 407-418 (2005).

22 Dewey, R. B., Jr. Autonomic dysfunction in Parkinson's disease. *Neurol Clin* **22**, S127-139, doi:10.1016/j.ncl.2004.05.006 (2004).

23 Muller, B., Larsen, J. P., Wentzel-Larsen, T., Skeie, G. O., Tysnes, O. B. & Parkwest Study, Group. Autonomic and sensory symptoms and signs in incident, untreated Parkinson's disease: frequent but mild. *Mov Disord* **26**, 65-72, doi:10.1002/mds.23387 (2011).
24 Micieli, G., Tosi, P., Marcheselli, S. & Cavallini, A. Autonomic dysfunction in Parkinson's disease. *Neurol Sci* **24 Suppl 1**, S32-34, doi:10.1007/s100720300035 (2003).
25 Edwards, L. L., Pfeiffer, R. F., Quigley, E. M., Hofman, R. & Balluff, M. Gastrointestinal symptoms in Parkinson's disease. *Mov Disord* **6**, 151-156, doi:10.1002/mds.870060211 (1991).
26 Edwards, L. L., Quigley, E. M. & Pfeiffer, R. F. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease: frequency and pathophysiology. *Neurology* **42**, 726-732 (1992).
27 Brefel-Courbon, C. [Digestive disturbances in Parkinson disease]. *Rev Neurol (Paris)* **165 Spec No 2**, F63-65 (2009).
28 Wolters, ECh & Braak, H. Parkinson's disease: premotor clinico-pathological correlations. *J Neural Transm Suppl*, 309-319 (2006).
29 Siderowf, A. & Lang, A. E. Premotor Parkinson's disease: concepts and definitions. *Mov Disord* **27**, 608-616, doi:10.1002/mds.24954 (2012).
30 Dickson, D. W., Braak, H., Duda, J. E., Duyckaerts, C., Gasser, T., Halliday, G. M., Hardy, J., Leverenz, J. B., Del Tredici, K., Wszolek, Z. K. & Litvan, I. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *The Lancet. Neurology* **8**, 1150-1157, doi:10.1016/S1474-4422(09)70238-8 (2009).
31 Purves, Augustine, Fitzpatrick, Hall, Lamantia, White. *Neurosciences*. (2015).
32 Dauer, W. & Przedborski, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* **39**, 889-909 (2003).
33 Sauleau, P., Dragomir S., Kuchenbuch M., «Neurophysiologie», [En ligne] <https://sites.google.com/site/aphysionado/home/orgsn/ngc>, Consultée le 10 juillet, 2017.
34 Parent, A. & Hazrati, L. N. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev* **20**, 91-127 (1995).
35 Middleton, F. A. & Strick, P. L. Basal ganglia output and cognition: evidence from anatomical, behavioral, and clinical studies. *Brain Cogn* **42**, 183-200, doi:10.1006/brcg.1999.1099 (2000).
36 Temel, Y., Blokland, A., Steinbusch, H. W. & Visser-Vandewalle, V. The functional role of the subthalamic nucleus in cognitive and limbic circuits. *Prog Neurobiol* **76**, 393-413, doi:10.1016/j.pneurobio.2005.09.005 (2005).
37 Mink, J. W. The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Prog Neurobiol* **50**, 381-425 (1996).
38 Bjarkam, C. R. & Sorensen, J. C. Therapeutic strategies for neurodegenerative disorders: emerging clues from Parkinson's disease. *Biol Psychiatry* **56**, 213-216, doi:10.1016/j.biopsych.2003.12.025 (2004).
39 Linazasoro, G. Recent failures of new potential symptomatic treatments for Parkinson's disease: causes and solutions. *Mov Disord* **19**, 743-754, doi:10.1002/mds.20120 (2004).
40 Anderson, J. P., Walker, D. E., Goldstein, J. M., de Laat, R., Banducci, K., Caccavello, R. J., Barbour, R., Huang, J., Kling, K., Lee, M., Diep, L., Keim, P. S., Shen, X., Chataway, T., Schlossmacher, M. G., Seubert, P., Schenk, D., Sinha, S., Gai, W. P. & Chilcote, T. J. Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. *J Biol Chem* **281**, 29739-29752, doi:10.1074/jbc.M600933200 (2006).

41 Hayes, M. W., Fung, V. S., Kimber, T. E. & O'Sullivan, J. D. Current concepts in the management of Parkinson disease. *The Medical journal of Australia* **192**, 144-149 (2010).
42 Branco, D. M., Arduino, D. M., Esteves, A. R., Silva, D. F., Cardoso, S. M. & Oliveira, C. R. Cross-talk between mitochondria and proteasome in Parkinson's disease pathogenesis. *Front Aging Neurosci* **2**, 17, doi:10.3389/fnagi.2010.00017 (2010).
43 Braak, H., Ghebremedhin, E., Rub, U., Bratzke, H. & Del Tredici, K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* **318**, 121-134, doi:10.1007/s00441-004-0956-9 (2004).
44 Spillantini, M. G. Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies and multiple system atrophy are alpha-synucleinopathies. *Parkinsonism Relat Disord* **5**, 157-162 (1999).
45 Shults, C. W. Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1661-1668, doi:10.1073/pnas.0509567103 (2006).
46 Emanuele, M. & Chieregatti, E. Mechanisms of alpha-synuclein action on neurotransmission: cell-autonomous and non-cell autonomous role. *Biomolecules* **5**, 865-892, doi:10.3390/biom5020865 (2015).
47 Murphy, D. D., Rueter, S. M., Trojanowski, J. Q. & Lee, V. M. Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J Neurosci* **20**, 3214-3220 (2000).
48 Scott, D. & Roy, S. alpha-Synuclein inhibits intersynaptic vesicle mobility and maintains recycling-pool homeostasis. *J Neurosci* **32**, 10129-10135, doi:10.1523/JNEUROSCI.0535-12.2012 (2012).
49 Yavich, L., Tanila, H., Vepsalainen, S. & Jakala, P. Role of alpha-synuclein in presynaptic dopamine recruitment. *J Neurosci* **24**, 11165-11170, doi:10.1523/JNEUROSCI.2559-04.2004 (2004).
50 Waxman, E. A. & Giasson, B. I. Molecular mechanisms of alpha-synuclein neurodegeneration. *Biochimica et biophysica acta* **1792**, 616-624, doi:10.1016/j.bbadis.2008.09.013 (2009).
51 Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R. A., Jansen Steur, E. N. & Braak, E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* **24**, 197-211 (2003).
52 Del Tredici, K., Hawkes, C. H., Ghebremedhin, E. & Braak, H. Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* **119**, 703-713, doi:10.1007/s00401-010-0665-2 (2010).
53 Beach, T. G., White, C. L., Hamilton, R. L., Duda, J. E., Iwatsubo, T., Dickson, D. W., Leverenz, J. B., Roncaroli, F., Buttini, M., Hladik, C. L., Sue, L. I., Noorigian, J. V. & Adler, C. H. Evaluation of alpha-synuclein immunohistochemical methods used by invited experts. *Acta Neuropathol* **116**, 277-288, doi:10.1007/s00401-008-0409-8 (2008).
54 Beach, T. G., Adler, C. H., Sue, L. I., Vedders, L., Lue, L., White Iii, C. L., Akiyama, H., Caviness, J. N., Shill, H. A., Sabbagh, M. N., Walker, D. G. & Arizona Parkinson's Disease, Consortium. Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol* **119**, 689-702, doi:10.1007/s00401-010-0664-3 (2010).
55 Beach, T. G., White, C. L., 3rd, Hladik, C. L., Sabbagh, M. N., Connor, D. J., Shill, H. A., Sue, L. I., Sasse, J., Bachalakuri, J., Henry-Watson, J., Akiyama, H., Adler, C. H. & Arizona Parkinson's Disease, Consortium. Olfactory bulb alpha-synucleinopathy has high

specificity and sensitivity for Lewy body disorders. *Acta Neuropathol* **117**, 169-174, doi:10.1007/s00401-008-0450-7 (2009).
56 Prigent, A., Lionnet, A., Corbille, A. G. & Derkinderen, P. [Neuropathology and pathophysiology of Parkinson's disease: Focus on alpha-synuclein]. *Presse Med* **46**, 182-186, doi:10.1016/j.lpm.2016.11.010 (2017).
57 Adler, C. H. & Beach, T. G. Neuropathological basis of nonmotor manifestations of Parkinson's disease. *Mov Disord* **31**, 1114-1119, doi:10.1002/mds.26605 (2016).
58 Dickson, D. W., Fujishiro, H., Orr, C., DelleDonne, A., Josephs, K. A., Frigerio, R., Burnett, M., Parisi, J. E., Klos, K. J. & Ahlskog, J. E. Neuropathology of non-motor features of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord* **15 Suppl 3**, S1-5, doi:10.1016/S1353-8020(09)70769-2 (2009).
59 Annerino, D. M., Arshad, S., Taylor, G. M., Adler, C. H., Beach, T. G. & Greene, J. G. Parkinson's disease is not associated with gastrointestinal myenteric ganglion neuron loss. *Acta Neuropathol* **124**, 665-680, doi:10.1007/s00401-012-1040-2 (2012).
60 Corbille, A. G., Coron, E., Neunlist, M., Derkinderen, P. & Lebouvier, T. Appraisal of the dopaminergic and noradrenergic innervation of the submucosal plexus in PD. *J Parkinsons Dis* **4**, 571-576, doi:10.3233/JPD-140422 (2014).
61 Lebouvier, T., Neunlist, M., Bruley des Varannes, S., Coron, E., Drouard, A., N'Guyen, J. M., Chaumette, T., Tasselli, M., Paillusson, S., Flamand, M., Galmiche, J. P., Damier, P. & Derkinderen, P. Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PloS one* **5**, e12728, doi:10.1371/journal.pone.0012728 (2010).
62 Martina Pinto, Andrée-Anne Poirier, Mélissa Côté, Thérèse Di Paolo, Denis Soulet. 184, 185 (11th AnnualCanadian Neuroscience Meeting 2017, 2017).
63 Borghi, R., Marchese, R., Negro, A., Marinelli, L., Forloni, G., Zaccheo, D., Abbruzzese, G. & Tabaton, M. Full length alpha-synuclein is present in cerebrospinal fluid from Parkinson's disease and normal subjects. *Neurosci Lett* **287**, 65-67 (2000).
64 El-Agnaf, O. M., Salem, S. A., Paleologou, K. E., Cooper, L. J., Fullwood, N. J., Gibson, M. J., Curran, M. D., Court, J. A., Mann, D. M., Ikeda, S., Cookson, M. R., Hardy, J. & Allsop, D. Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB J* **17**, 1945-1947, doi:10.1096/fj.03-0098fje (2003).
65 Lee, H. J., Patel, S. & Lee, S. J. Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *J Neurosci* **25**, 6016-6024, doi:10.1523/JNEUROSCI.0692-05.2005 (2005).
66 Emmanouilidou, E., Melachroinou, K., Roumeliotis, T., Garbis, S. D., Ntzouni, M., Margaritis, L. H., Stefanis, L. & Vekrellis, K. Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *J Neurosci* **30**, 6838-6851, doi:10.1523/JNEUROSCI.5699-09.2010 (2010).
67 Emmanouilidou, E., Elenis, D., Papasilekas, T., Stranjalis, G., Gerozissis, K., Ioannou, P. C. & Vekrellis, K. Assessment of alpha-synuclein secretion in mouse and human brain parenchyma. *PloS one* **6**, e22225, doi:10.1371/journal.pone.0022225 (2011).
68 Tyson, T., Steiner, J. A. & Brundin, P. Sorting out release, uptake and processing of alpha-synuclein during prion-like spread of pathology. *J Neurochem* **139 Suppl 1**, 275-289, doi:10.1111/jnc.13449 (2016).
69 Angot, E., Steiner, J. A., Hansen, C., Li, J. Y. & Brundin, P. Are synucleinopathies prion-like disorders? *The Lancet. Neurology* **9**, 1128-1138, doi:10.1016/S1474-4422(10)70213-1 (2010).

70 Li, J. Y., Englund, E., Holton, J. L., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A. J., Lashley, T., Quinn, N. P., Rehncrona, S., Bjorklund, A., Widner, H., Revesz, T., Lindvall, O. & Brundin, P. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med* **14**, 501-503, doi:10.1038/nm1746 (2008).
71 Kordower, J. H., Chu, Y., Hauser, R. A., Freeman, T. B. & Olanow, C. W. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med* **14**, 504-506, doi:10.1038/nm1747 (2008).
72 Braak, H., Rub, U., Gai, W. P. & Del Tredici, K. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm (Vienna)* **110**, 517-536, doi:10.1007/s00702-002-0808-2 (2003).
73 Frost, B. & Diamond, M. I. Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* **11**, 155-159, doi:10.1038/nrn2786 (2010).
74 Aguzzi, A. & Rajendran, L. The transcellular spread of cytosolic amyloids, prions, and prionoids. *Neuron* **64**, 783-790, doi:10.1016/j.neuron.2009.12.016 (2009).
75 Colby, D. W. & Prusiner, S. B. Prions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, a006833, doi:10.1101/cshperspect.a006833 (2011).
76 Jang, A., Lee, H. J., Suk, J. E., Jung, J. W., Kim, K. P. & Lee, S. J. Non-classical exocytosis of alpha-synuclein is sensitive to folding states and promoted under stress conditions. *J Neurochem* **113**, 1263-1274, doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06695.x (2010).
77 Desplats, P., Lee, H. J., Bae, E. J., Patrick, C., Rockenstein, E., Crews, L., Spencer, B., Masliah, E. & Lee, S. J. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 13010-13015, doi:10.1073/pnas.0903691106 (2009).
78 Hansen, C., Angot, E., Bergstrom, A. L., Steiner, J. A., Pieri, L., Paul, G., Outeiro, T. F., Melki, R., Kallunki, P., Fog, K., Li, J. Y. & Brundin, P. alpha-Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. *J Clin Invest* **121**, 715-725, doi:10.1172/JCI43366 (2011).
79 Gousset, K., Schiff, E., Langevin, C., Marijanovic, Z., Caputo, A., Browman, D. T., Chenouard, N., de Chaumont, F., Martino, A., Enninga, J., Olivo-Marin, J. C., Mannel, D. & Zurzolo, C. Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread. *Nat Cell Biol* **11**, 328-336, doi:10.1038/ncb1841 (2009).
80 Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Schapira, A. H., Gardiner, C., Sargent, I. L., Wood, M. J. & Cooper, J. M. Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. *Neurobiol Dis* **42**, 360-367, doi:10.1016/j.nbd.2011.01.029 (2011).
81 Wakabayashi, K., Takahashi, H., Takeda, S., Ohama, E. & Ikuta, F. Lewy bodies in the enteric nervous system in Parkinson's disease. *Arch Histol Cytol* **52 Suppl**, 191-194 (1989).
82 Braak, H., de Vos, R. A., 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. *Neurosci Lett* **396**, 67-72, doi:10.1016/j.neulet.2005.11.012 (2006).
83 Dick, F. D. Parkinson's disease and pesticide exposures. *Br Med Bull* **79-80**, 219-231, doi:10.1093/bmb/ldl018 (2006).
84 Mouradian, M. M. Recent advances in the genetics and pathogenesis of Parkinson disease. *Neurology* **58**, 179-185 (2002).

85 Ferreira, M. & Massano, J. An updated review of Parkinson's disease genetics and clinicopathological correlations. *Acta Neurol Scand* **135**, 273-284, doi:10.1111/ane.12616 (2017).
86 International Parkinson Disease Genomics, Consortium, Nalls, M. A., Plagnol, V., Hernandez, D. G., Sharma, M., Sheerin, U. M., Saad, M., Simon-Sanchez, J., Schulte, C., Lesage, S., Sveinbjornsdottir, S., Stefansson, K., Martinez, M., Hardy, J., Heutink, P., Brice, A., Gasser, T., Singleton, A. B. & Wood, N. W. Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet* **377**, 641-649, doi:10.1016/S0140-6736(10)62345-8 (2011).
87 Polymeropoulos, M. H., Higgins, J. J., Golbe, L. I., Johnson, W. G., Ide, S. E., Di Iorio, G., Sanges, G., Stenroos, E. S., Pho, L. T., Schaffer, A. A., Lazzarini, A. M., Nussbaum, R. L. & Duvoisin, R. C. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science* **274**, 1197-1199 (1996).
88 Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I. & Nussbaum, R. L. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* **276**, 2045-2047 (1997).
89 Lazaro, D. F., Rodrigues, E. F., Langohr, R., Shahpasandzadeh, H., Ribeiro, T., Guerreiro, P., Gerhardt, E., Krohnert, K., Klucken, J., Pereira, M. D., Popova, B., Kruse, N., Mollenhauer, B., Rizzoli, S. O., Braus, G. H., Danzer, K. M. & Outeiro, T. F. Systematic comparison of the effects of alpha-synuclein mutations on its oligomerization and aggregation. *PLoS Genet* **10**, e1004741, doi:10.1371/journal.pgen.1004741 (2014).
90 Singleton, A. B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., Lincoln, S., Crawley, A., Hanson, M., Maraganore, D., Adler, C., Cookson, M. R., Muenter, M., Baptista, M., Miller, D., Blancato, J., Hardy, J. & Gwinn-Hardy, K. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* **302**, 841, doi:10.1126/science.1090278 (2003).
91 Chartier-Harlin, M. C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., Levecque, C., Larvor, L., Andrieux, J., Hulihan, M., Waucquier, N., Defebvre, L., Amouyel, P., Farrer, M. & Destee, A. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* **364**, 1167-1169, doi:10.1016/S0140-6736(04)17103-1 (2004).
92 Ibanez, P., Bonnet, A. M., Debarges, B., Lohmann, E., Tison, F., Pollak, P., Agid, Y., Durr, A. & Brice, A. Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet* **364**, 1169-1171, doi:10.1016/S0140-6736(04)17104-3 (2004).
93 Hernandez, D. G., Reed, X. & Singleton, A. B. Genetics in Parkinson disease: Mendelian versus non-Mendelian inheritance. *J Neurochem* **139 Suppl 1**, 59-74, doi:10.1111/jnc.13593 (2016).
94 Dawson, T. M. & Dawson, V. L. The role of parkin in familial and sporadic Parkinson's disease. *Mov Disord* **25 Suppl 1**, S32-39, doi:10.1002/mds.22798 (2010).
95 Lin, M. K. & Farrer, M. J. Genetics and genomics of Parkinson's disease. *Genome Med* **6**, 48, doi:10.1186/gm566 (2014).
96 Martin, I., Dawson, V. L. & Dawson, T. M. Recent advances in the genetics of Parkinson's disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **12**, 301-325, doi:10.1146/annurev-genom-082410-101440 (2011).

97 Fujioka, S. & Wszolek, Z. K. Update on genetics of parkinsonism. *Neurodegener Dis* **10**, 257-260, doi:10.1159/000334285 (2012).
98 Alberio, T., Lopiano, L. & Fasano, M. Cellular models to investigate biochemical pathways in Parkinson's disease. *FEBS J* **279**, 1146-1155, doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08516.x (2012).
99 Ritz, B., Ascherio, A., Checkoway, H., Marder, K. S., Nelson, L. M., Rocca, W. A., Ross, G. W., Strickland, D., Van Den Eeden, S. K. & Gorell, J. Pooled analysis of tobacco use and risk of Parkinson disease. *Archives of neurology* **64**, 990-997, doi:10.1001/archneur.64.7.990 (2007).
100 Breckenridge, C. B., Berry, C., Chang, E. T., Sielken, R. L., Jr. & Mandel, J. S. Association between Parkinson's Disease and Cigarette Smoking, Rural Living, Well-Water Consumption, Farming and Pesticide Use: Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS one* **11**, e0151841, doi:10.1371/journal.pone.0151841 (2016).
101 Chin-Chan, M., Navarro-Yepes, J. & Quintanilla-Vega, B. Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Front Cell Neurosci* **9**, 124, doi:10.3389/fncel.2015.00124 (2015).
102 Costa, J., Lunet, N., Santos, C., Santos, J. & Vaz-Carneiro, A. Caffeine exposure and the risk of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *J Alzheimers Dis* **20 Suppl 1**, S221-238, doi:10.3233/JAD-2010-091525 (2010).
103 Farrer, M. J. Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. *Nat Rev Genet* **7**, 306-318, doi:10.1038/nrg1831 (2006).
104 Tanner, C. M., Ottman, R., Goldman, S. M., Ellenberg, J., Chan, P., Mayeux, R. & Langston, J. W. Parkinson disease in twins: an etiologic study. *JAMA* **281**, 341-346 (1999).
105 Schapira, A. H. Disease modification in Parkinson's disease. *The Lancet. Neurology* **3**, 362-368, doi:10.1016/S1474-4422(04)00769-0 (2004).
106 Moore, D. J., West, A. B., Dawson, V. L. & Dawson, T. M. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* **28**, 57-87, doi:10.1146/annurev.neuro.28.061604.135718 (2005).
107 Dhillon, A. S., Tarbutton, G. L., Levin, J. L., Plotkin, G. M., Lowry, L. K., Nalbone, J. T. & Shepherd, S. Pesticide/environmental exposures and Parkinson's disease in East Texas. *J Agromedicine* **13**, 37-48, doi:10.1080/10599240801986215 (2008).
108 Postuma, R. B., Iranzo, A., Hogl, B., Arnulf, I., Ferini-Strambi, L., Manni, R., Miyamoto, T., Oertel, W., Dauvilliers, Y., Ju, Y. E., Puligheddu, M., Sonka, K., Pelletier, A., Santamaria, J., Frauscher, B., Leu-Semenescu, S., Zucconi, M., Terzaghi, M., Miyamoto, M., Unger, M. M., Carlander, B., Fantini, M. L. & Montplaisir, J. Y. Risk factors for neurodegeneration in idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder: a multicenter study. *Ann Neurol* **77**, 830-839, doi:10.1002/ana.24385 (2015).
109 Chen, J. F., Xu, K., Petzer, J. P., Staal, R., Xu, Y. H., Beilstein, M., Sonsalla, P. K., Castagnoli, K., Castagnoli, N., Jr. & Schwarzschild, M. A. Neuroprotection by caffeine and A(2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. *J Neurosci* **21**, RC143 (2001).
110 Beal, M. F. Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* **2**, 325-334, doi:10.1038/35072550 (2001).
111 Betarbet, R., Sherer, T. B. & Greenamyre, J. T. Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays* **24**, 308-318, doi:10.1002/bies.10067 (2002).
112 Dawson, T., Mandir, A. & Lee, M. Animal models of PD: pieces of the same puzzle? *Neuron* **35**, 219-222 (2002).

113 Canada, Gouvernement du, «Note de réévaluation REV2015-10, Examen spécial du paraquat : projet de décision aux fins de consultation», [En ligne] <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/securite-produits-consommation/pesticides-lutte-antiparasitaire/public/consultations/notes-reevaluation/2015/examen-special-paraquat/document.html>, Consultée le 10 juillet, 2017.
114 Canada, Gouvernement du, «Listes des substances permises», [En ligne] <https://www.tpsgc-pwgsc.gc.ca/ongc-cgsb/programme-program/normes-standards/internet/bio-org/permises-permitted-fra.html>, Consultée le 10 juillet, 2017.
115 Canada, Gouvernement du, «Utilisation de pesticides et pratiques de lutte antiparasitaire des viticulteurs canadiens en 2005 (4 de 6)», [En ligne] <http://www.agr.gc.ca/fra/a-propos-de-nous/bureaux-et-emplacements/lutte-antiparasitaire-en-agriculture/ressources-en-matiere-de-lutte-antiparasitaire-en-agriculture/resultats-de-l-enquete-sur-la-protection-des-cultures-au-canada/utilisation-de-pesticides-et-pratiques-de-lutte-antiparasitaire-des-viticulteurs-canadiens-en-2005-1-de-6/utilisation-de-pesticides-et-pratiques-de-lutte-antiparasitaire-des-viticulteurs-canadiens-en-2005-4-de-6/?id=1313590639591>, Consultée le 10 juillet, 2017.
116 Canada, Gouvernement du, «Traitement à la roténone de lacs et de cours d'eau, PN de la Mauricie, Parcs Canada (5P300-17-5065)», [En ligne] <https://achatsetventes.gc.ca/donnees-sur-l-approvisionnement/appels-d-offres/PW-17-00775786>, Consultée le 10 juillet, 2017.
117 Riederer, P., Sofic, E., Rausch, W. D., Schmidt, B., Reynolds, G. P., Jellinger, K. & Youdim, M. B. Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. *J Neurochem* **52**, 515-520 (1989).
118 Zecca, L., Tampellini, D., Gatti, A., Crippa, R., Eisner, M., Sulzer, D., Ito, S., Fariello, R. & Gallorini, M. The neuromelanin of human substantia nigra and its interaction with metals. *J Neural Transm (Vienna)* **109**, 663-672, doi:10.1007/s007020200055 (2002).
119 Stohs, S. J. & Bagchi, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* **18**, 321-336 (1995).
120 Brice, A. Genetics of Parkinson's disease: LRRK2 on the rise. *Brain* **128**, 2760-2762, doi:10.1093/brain/awh676 (2005).
121 Gasser, T. Genetics of Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* **18**, 363-369 (2005).
122 Feany, M. B. New genetic insights into Parkinson's disease. *N Engl J Med* **351**, 1937-1940, doi:10.1056/NEJMp048263 (2004).
123 Frédéric Calon, Francesca Cicchetti. Can we prevent Parkinson's disease with n-3 polyunsaturated fatty acids? *Future Medicine Ltd* **Future Lipidol.**, 133–137 (2008).
124 Agim, Z. S. & Cannon, J. R. Dietary factors in the etiology of Parkinson's disease. *Biomed Res Int* **2015**, 672838, doi:10.1155/2015/672838 (2015).
125 de Lau, L. M., Bornebroek, M., Witteman, J. C., Hofman, A., Koudstaal, P. J. & Breteler, M. M. Dietary fatty acids and the risk of Parkinson disease: the Rotterdam study. *Neurology* **64**, 2040-2045, doi:10.1212/01.WNL.0000166038.67153.9F (2005).
126 Simpson, J. L., Bailey, L. B., Pietrzik, K., Shane, B. & Holzgreve, W. Micronutrients and women of reproductive potential: required dietary intake and consequences of dietary deficiency or excess. Part I--Folate, Vitamin B12, Vitamin B6. *J Matern Fetal Neonatal Med* **23**, 1323-1343, doi:10.3109/14767051003678234 (2010).
127 in *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health* (1998).

128 Abbott, R. A., Cox, M., Markus, H. & Tomkins, A. Diet, body size and micronutrient status in Parkinson's disease. *Eur J Clin Nutr* **46**, 879-884 (1992).
129 Golbe, L. I., Farrell, T. M. & Davis, P. H. Follow-up study of early-life protective and risk factors in Parkinson's disease. *Mov Disord* **5**, 66-70, doi:10.1002/mds.870050116 (1990).
130 Akaneya, Y., Takahashi, M. & Hatanaka, H. Involvement of free radicals in MPP+ neurotoxicity against rat dopaminergic neurons in culture. *Neurosci Lett* **193**, 53-56 (1995).
131 Abbott, R. D., Ross, G. W., White, L. R., Sanderson, W. T., Burchfiel, C. M., Kashon, M., Sharp, D. S., Masaki, K. H., Curb, J. D. & Petrovitch, H. Environmental, life-style, and physical precursors of clinical Parkinson's disease: recent findings from the Honolulu-Asia Aging Study. *J Neurol* **250 Suppl 3**, III30-39, doi:10.1007/s00415-003-1306-7 (2003).
132 Etminan, M., Gill, S. S. & Samii, A. Intake of vitamin E, vitamin C, and carotenoids and the risk of Parkinson's disease: a meta-analysis. *The Lancet. Neurology* **4**, 362-365, doi:10.1016/S1474-4422(05)70097-1 (2005).
133 Miyake, Y., Fukushima, W., Tanaka, K., Sasaki, S., Kiyohara, C., Tsuboi, Y., Yamada, T., Oeda, T., Miki, T., Kawamura, N., Sakae, N., Fukuyama, H., Hirota, Y., Nagai, M. & Fukuoka Kinki Parkinson's Disease Study, Group. Dietary intake of antioxidant vitamins and risk of Parkinson's disease: a case-control study in Japan. *Eur J Neurol* **18**, 106-113, doi:10.1111/j.1468-1331.2010.03088.x (2011).
134 Spencer, J. P. Flavonoids: modulators of brain function? *Br J Nutr* **99 E Suppl 1**, ES60-77, doi:10.1017/S0007114508965776 (2008).
135 Waterhouse, A. L., Shirley, J. R. & Donovan, J. L. Antioxidants in chocolate. *Lancet* **348**, 834, doi:10.1016/S0140-6736(05)65262-2 (1996).
136 Ramassamy, C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *Eur J Pharmacol* **545**, 51-64, doi:10.1016/j.ejphar.2006.06.025 (2006).
137 Gao, X., Cassidy, A., Schwarzschild, M. A., Rimm, E. B. & Ascherio, A. Habitual intake of dietary flavonoids and risk of Parkinson disease. *Neurology* **78**, 1138-1145, doi:10.1212/WNL.0b013e31824f7fc4 (2012).
138 Chen, H., Zhang, S. M., Hernan, M. A., Willett, W. C. & Ascherio, A. Dietary intakes of fat and risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol* **157**, 1007-1014 (2003).
139 Gao, X., Chen, H., Fung, T. T., Logroscino, G., Schwarzschild, M. A., Hu, F. B. & Ascherio, A. Prospective study of dietary pattern and risk of Parkinson disease. *Am J Clin Nutr* **86**, 1486-1494 (2007).
140 Mochizuki, H., Goto, K., Mori, H. & Mizuno, Y. Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* **137**, 120-123 (1996).
141 Wojcik, C. Regulation of apoptosis by the ubiquitin and proteasome pathway. *J Cell Mol Med* **6**, 25-48 (2002).
142 Mattson, M. P. Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell* **6**, 337-350, doi:10.1111/j.1474-9726.2007.00275.x (2007).
143 Parker, W. D., Jr., Boyson, S. J. & Parks, J. K. Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol* **26**, 719-723, doi:10.1002/ana.410260606 (1989).
144 Schapira, A. H., Cooper, J. M., Dexter, D., Clark, J. B., Jenner, P. & Marsden, C. D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* **54**, 823-827 (1990).
145 Sian, J., Dexter, D. T., Lees, A. J., Daniel, S., Agid, Y., Javoy-Agid, F., Jenner, P. & Marsden, C. D. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other

neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol* **36**, 348-355, doi:10.1002/ana.410360305 (1994).
146 Godbout, J. P., Berg, B. M., Kelley, K. W. & Johnson, R. W. alpha-Tocopherol reduces lipopolysaccharide-induced peroxide radical formation and interleukin-6 secretion in primary murine microglia and in brain. *J Neuroimmunol* **149**, 101-109, doi:10.1016/j.jneuroim.2003.12.017 (2004).
147 Asanuma, M., Miyazaki, I. & Ogawa, N. Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: the role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotox Res* **5**, 165-176 (2003).
148 Cadet, J. L. & Brannock, C. Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. *Neurochem Int* **32**, 117-131 (1998).
149 Graham, D. G. Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol* **14**, 633-643 (1978).
150 Stokes, A. H., Hastings, T. G. & Vrana, K. E. Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *J Neurosci Res* **55**, 659-665, doi:10.1002/(SICI)1097-4547(19990315)55:6<659::AID-JNR1>3.0.CO;2-C (1999).
151 Weiss, U. Inflammation. *Nature* **454**, 427, doi:10.1038/454427a (2008).
152 Uematsu, S. & Fujimoto, K. The innate immune system in the intestine. *Microbiol Immunol* **54**, 645-657, doi:10.1111/j.1348-0421.2010.00267.x (2010).
153 Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G. & Geissmann, F. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* **317**, 666-670, doi:10.1126/science.1142883 (2007).
154 Leuschner, F., Rauch, P. J., Ueno, T., Gorbatov, R., Marinelli, B., Lee, W. W., Dutta, P., Wei, Y., Robbins, C., Iwamoto, Y., Sena, B., Chudnovskiy, A., Panizzi, P., Keliher, E., Higgins, J. M., Libby, P., Moskowitz, M. A., Pittet, M. J., Swirski, F. K., Weissleder, R. & Nahrendorf, M. Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopoiesis. *J Exp Med* **209**, 123-137, doi:10.1084/jem.20111009 (2012).
155 Mowat, A. M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature reviews. Immunology* **3**, 331-341, doi:10.1038/nri1057 (2003).
156 Kigerl, K. A., Gensel, J. C., Ankeny, D. P., Alexander, J. K., Donnelly, D. J. & Popovich, P. G. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci* **29**, 13435-13444, doi:10.1523/JNEUROSCI.3257-09.2009 (2009).
157 Hao, N. B., Lu, M. H., Fan, Y. H., Cao, Y. L., Zhang, Z. R. & Yang, S. M. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol* **2012**, 948098, doi:10.1155/2012/948098 (2012).
158 Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A. & Locati, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* **25**, 677-686, doi:10.1016/j.it.2004.09.015 (2004).
159 Woollard, K. J. & Geissmann, F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol* **7**, 77-86, doi:10.1038/nrcardio.2009.228 (2010).
160 Nahrendorf, M., Swirski, F. K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J. L., Libby, P., Weissleder, R. & Pittet, M. J. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* **204**, 3037-3047, doi:10.1084/jem.20070885 (2007).

161 Kannarkat, G. T., Boss, J. M. & Tansey, M. G. The role of innate and adaptive immunity in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* **3**, 493-514, doi:10.3233/JPD-130250 (2013).
162 Chen, H., O'Reilly, E. J., Schwarzschild, M. A. & Ascherio, A. Peripheral inflammatory biomarkers and risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol* **167**, 90-95, doi:10.1093/aje/kwm260 (2008).
163 Mogi, M., Harada, M., Kondo, T., Riederer, P. & Nagatsu, T. Interleukin-2 but not basic fibroblast growth factor is elevated in parkinsonian brain. Short communication. *J Neural Transm (Vienna)* **103**, 1077-1081, doi:10.1007/BF01291792 (1996).
164 Nagatsu, T., Mogi, M., Ichinose, H. & Togari, A. Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, 277-290 (2000).
165 Devos, D., Lebouvier, T., Lardeux, B., Biraud, M., Rouaud, T., Pouclet, H., Coron, E., Bruley des Varannes, S., Naveilhan, P., Nguyen, J. M., Neunlist, M. & Derkinderen, P. Colonic inflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* **50**, 42-48, doi:10.1016/j.nbd.2012.09.007 (2013).
166 Hasegawa, Y., Inagaki, T., Sawada, M. & Suzumura, A. Impaired cytokine production by peripheral blood mononuclear cells and monocytes/macrophages in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* **101**, 159-164 (2000).
167 Beyer, M. K., Herlofson, K., Arsland, D. & Larsen, J. P. Causes of death in a community-based study of Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* **103**, 7-11 (2001).
168 D'Amelio, M., Ragonese, P., Morgante, L., Reggio, A., Callari, G., Salemi, G. & Savettieri, G. Long-term survival of Parkinson's disease: a population-based study. *J Neurol* **253**, 33-37, doi:10.1007/s00415-005-0916-7 (2006).
169 Arai, H., Furuya, T., Mizuno, Y. & Mochizuki, H. Inflammation and infection in Parkinson's disease. *Histol Histopathol* **21**, 673-678, doi:10.14670/HH-21.673 (2006).
170 Vérin, Luc Defebvre Marc. *La maladie de Parkinson*. (Elsevier Masson, 2015).
171 Defebvre, L. & Moreau, C. [Medical and surgical treatment of Parkinson's disease]. *Presse Med* **46**, 218-224, doi:10.1016/j.lpm.2017.01.018 (2017).
172 Canada, Parkinson, «Médicament», [En ligne] <http://www.parkinson.ca/site/c.jpIMKWOBJoG/b.6725359/k.5799/M233dicament.htm>, Consultée le 10 juillet, 2017.
173 Canada, Gouvernement du, «Registre des médicaments et des produits de santé», [En ligne] <https://hpr-rps.hres.ca/index.php>, Consultée le 10 juillet, 2017.
174 Fahn, S. The spectrum of levodopa-induced dyskinesias. *Ann Neurol* **47**, S2-9; discussion S9-11 (2000).
175 Huot, P., Johnston, T. H., Koprich, J. B., Fox, S. H. & Brotchie, J. M. The pharmacology of L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Pharmacol Rev* **65**, 171-222, doi:10.1124/pr.111.005678 (2013).
176 Julien, C., Berthiaume, L., Hadj-Tahar, A., Rajput, A. H., Bedard, P. J., Di Paolo, T., Julien, P. & Calon, F. Postmortem brain fatty acid profile of levodopa-treated Parkinson disease patients and parkinsonian monkeys. *Neurochem Int* **48**, 404-414, doi:10.1016/j.neuint.2005.12.002 (2006).
177 Defebvre, Fraix V. Traitement chirurgical. In:, L, Vérin M, editors. La maladie de Parkinson., 3e édition. Monographies de neurologies & 2015., Elsevier Masson;.
178 Sarkar, S., Raymick, J. & Imam, S. Neuroprotective and Therapeutic Strategies against Parkinson's Disease: Recent Perspectives. *Int J Mol Sci* **17**, doi:10.3390/ijms17060904 (2016).

179 Esposito, E., Di Matteo, V., Benigno, A., Pierucci, M., Crescimanno, G. & Di Giovanni, G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease. *Exp Neurol* **205**, 295-312, doi:10.1016/j.expneurol.2007.02.008 (2007).
180 Chen, H., Zhang, S. M., Hernan, M. A., Schwarzschild, M. A., Willett, W. C., Colditz, G. A., Speizer, F. E. & Ascherio, A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. *Archives of neurology* **60**, 1059-1064, doi:10.1001/archneur.60.8.1059 (2003).
181 Chen, H., Jacobs, E., Schwarzschild, M. A., McCullough, M. L., Calle, E. E., Thun, M. J. & Ascherio, A. Nonsteroidal antiinflammatory drug use and the risk for Parkinson's disease. *Ann Neurol* **58**, 963-967, doi:10.1002/ana.20682 (2005).
182 Haywood, A. F. & Staveley, B. E. Parkin counteracts symptoms in a Drosophila model of Parkinson's disease. *BMC Neurosci* **5**, 14, doi:10.1186/1471-2202-5-14 (2004).
183 Lo Bianco, C., Schneider, B. L., Bauer, M., Sajadi, A., Brice, A., Iwatsubo, T. & Aebischer, P. Lentiviral vector delivery of parkin prevents dopaminergic degeneration in an alpha-synuclein rat model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17510-17515, doi:10.1073/pnas.0405313101 (2004).
184 Yamada, M., Mizuno, Y. & Mochizuki, H. Parkin gene therapy for alpha-synucleinopathy: a rat model of Parkinson's disease. *Hum Gene Ther* **16**, 262-270, doi:10.1089/hum.2005.16.262 (2005).
185 Yacoubian, T. A. & Standaert, D. G. Targets for neuroprotection in Parkinson's disease. *Biochimica et biophysica acta* **1792**, 676-687, doi:10.1016/j.bbadis.2008.09.009 (2009).
186 Van Kampen, J. M., Baranowski, D. C., Robertson, H. A., Shaw, C. A. & Kay, D. G. The Progressive BSSG Rat Model of Parkinson's: Recapitulating Multiple Key Features of the Human Disease. *PloS one* **10**, e0139694, doi:10.1371/journal.pone.0139694 (2015).
187 Blesa, J., Phani, S., Jackson-Lewis, V. & Przedborski, S. Classic and new animal models of Parkinson's disease. *J Biomed Biotechnol* **2012**, 845618, doi:10.1155/2012/845618 (2012).
188 Blesa, J. & Przedborski, S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Front Neuroanat* **8**, 155, doi:10.3389/fnana.2014.00155 (2014).
189 Bezard, E. A call for clinically driven experimental design in assessing neuroprotection in experimental Parkinsonism. *Behav Pharmacol* **17**, 379-382 (2006).
190 Hirsch, E. C. How to judge animal models of Parkinson's disease in terms of neuroprotection. *J Neural Transm Suppl*, 255-260 (2006).
191 Tremblay, M. E., Saint-Pierre, M., Bourhis, E., Levesque, D., Rouillard, C. & Cicchetti, F. Neuroprotective effects of cystamine in aged parkinsonian mice. *Neurobiol Aging* **27**, 862-870, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.04.004 (2006).
192 Jackson-Lewis, V. & Przedborski, S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Nat Protoc* **2**, 141-151, doi:10.1038/nprot.2006.342 (2007).
193 Bloem, B. R., Irwin, I., Buruma, O. J., Haan, J., Roos, R. A., Tetrud, J. W. & Langston, J. W. The MPTP model: versatile contributions to the treatment of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Sci* **97**, 273-293 (1990).
194 Fox, S. H. & Brotchie, J. M. The MPTP-lesioned non-human primate models of Parkinson's disease. Past, present, and future. *Prog Brain Res* **184**, 133-157, doi:10.1016/S0079-6123(10)84007-5 (2010).
195 Anderson, G., Noorian, A. R., Taylor, G., Anitha, M., Bernhard, D., Srinivasan, S. & Greene, J. G. Loss of enteric dopaminergic neurons and associated changes in colon motility in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* **207**, 4-12, doi:10.1016/j.expneurol.2007.05.010 (2007).

196 Cote, M., Drouin-Ouellet, J., Cicchetti, F. & Soulet, D. The critical role of the MyD88-dependent pathway in non-CNS MPTP-mediated toxicity. *Brain, behavior, and immunity* **25**, 1143-1152, doi:10.1016/j.bbi.2011.02.017 (2011).
197 Cote, M., Poirier, A. A., Aube, B., Jobin, C., Lacroix, S. & Soulet, D. Partial depletion of the proinflammatory monocyte population is neuroprotective in the myenteric plexus but not in the basal ganglia in a MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Brain Behav Immun* **46**, 154-167, doi:10.1016/j.bbi.2015.01.009 (2015).
198 Vila, M. & Przedborski, S. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* **4**, 365-375, doi:10.1038/nrn1100 (2003).
199 Villanova, M., Sewry, C., Malandrini, A., Toti, P., Muntoni, F., Merlini, L., Torelli, S., Tosi, P., Maraldi, N. M. & Guazzi, G. C. Immunolocalization of several laminin chains in the normal human central and peripheral nervous system. *J Submicrosc Cytol Pathol* **29**, 409-413 (1997).
200 Kanda, T. Biology of the blood-nerve barrier and its alteration in immune mediated neuropathies. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **84**, 208-212, doi:10.1136/jnnp-2012-302312 (2013).
201 Savidge, T. C., Sofroniew, M. V. & Neunlist, M. Starring roles for astroglia in barrier pathologies of gut and brain. *Lab Invest* **87**, 731-736, doi:10.1038/labinvest.3700600 (2007).
202 Young, E. Gut instincts: The secrets of your second brain. *New Scientist* **216**, 38-42 (2012).
203 Furness, J. B., Callaghan, B. P., Rivera, L. R. & Cho, H. J. The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. *Adv Exp Med Biol* **817**, 39-71, doi:10.1007/978-1-4939-0897-4_3 (2014).
204 Anlauf, M., Schafer, M. K., Eiden, L. & Weihe, E. Chemical coding of the human gastrointestinal nervous system: cholinergic, VIPergic, and catecholaminergic phenotypes. *J Comp Neurol* **459**, 90-111, doi:10.1002/cne.10599 (2003).
205 Aziz, Q. & Thompson, D. G. Brain-gut axis in health and disease. *Gastroenterology* **114**, 559-578 (1998).
206 Mulak, A. & Bonaz, B. Irritable bowel syndrome: a model of the brain-gut interactions. *Med Sci Monit* **10**, RA55-62 (2004).
207 Schemann, M. & Neunlist, M. The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* **16 Suppl 1**, 55-59, doi:10.1111/j.1743-3150.2004.00476.x (2004).
208 Szurszewski, J. H. Physiology of mammalian prevertebral ganglia. *Annu Rev Physiol* **43**, 53-68, doi:10.1146/annurev.ph.43.030181.000413 (1981).
209 Chang, H. Y., Mashimo, H. & Goyal, R. K. Musings on the wanderer: what's new in our understanding of vago-vagal reflex? IV. Current concepts of vagal efferent projections to the gut. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**, G357-366, doi:10.1152/ajpgi.00478.2002 (2003).
210 Collins, S. M., Surette, M. & Bercik, P. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nat Rev Microbiol* **10**, 735-742, doi:10.1038/nrmicro2876 (2012).
211 Mulak, A. & Bonaz, B. Brain-gut-microbiota axis in Parkinson's disease. *World J Gastroenterol* **21**, 10609-10620, doi:10.3748/wjg.v21.i37.10609 (2015).
212 Del Tredici, K., Rub, U., De Vos, R. A., Bohl, J. R. & Braak, H. Where does parkinson disease pathology begin in the brain? *J Neuropathol Exp Neurol* **61**, 413-426 (2002).
213 Goedert, M., Spillantini, M. G., Del Tredici, K. & Braak, H. 100 years of Lewy pathology. *Nat Rev Neurol* **9**, 13-24, doi:10.1038/nrneurol.2012.242 (2013).

214 Snyder, F. The ether lipid trail: a historical perspective. *Biochimica et biophysica acta* **1436**, 265-278 (1999).
215 Marinetti, G. V. & Erbland, J. The structure of pig heart plasmalogen. *Biochimica et biophysica acta* **26**, 429-430 (1957).
216 Goldfine, H. The appearance, disappearance and reappearance of plasmalogens in evolution. *Prog Lipid Res* **49**, 493-498, doi:10.1016/j.plipres.2010.07.003 (2010).
217 Braverman, N. E. & Moser, A. B. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochimica et biophysica acta* **1822**, 1442-1452, doi:10.1016/j.bbadis.2012.05.008 (2012).
218 Hermansson, M., Hokynar, K. & Somerharju, P. Mechanisms of glycerophospholipid homeostasis in mammalian cells. *Prog Lipid Res* **50**, 240-257, doi:10.1016/j.plipres.2011.02.004 (2011).
219 Hermansson, M., Uphoff, A., Kakela, R. & Somerharju, P. Automated quantitative analysis of complex lipidomes by liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* **77**, 2166-2175, doi:10.1021/ac048489s (2005).
220 Han, X. & Gross, R. W. Shotgun lipidomics: multidimensional MS analysis of cellular lipidomes. *Expert Rev Proteomics* **2**, 253-264, doi:10.1586/14789450.2.2.253 (2005).
221 Ejsing, C. S., Sampaio, J. L., Surendranath, V., Duchoslav, E., Ekroos, K., Klemm, R. W., Simons, K. & Shevchenko, A. Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 2136-2141, doi:10.1073/pnas.0811700106 (2009).
222 Taguchi, R. & Ishikawa, M. Precise and global identification of phospholipid molecular species by an Orbitrap mass spectrometer and automated search engine Lipid Search. *J Chromatogr A* **1217**, 4229-4239, doi:10.1016/j.chroma.2010.04.034 (2010).
223 van Meer, G., Voelker, D. R. & Feigenson, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 112-124, doi:10.1038/nrm2330 (2008).
224 Farooqui, A. A., Horrocks, L. A. & Farooqui, T. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chem Phys Lipids* **106**, 1-29 (2000).
225 Ford, D. A. Lipid oxidation by hypochlorous acid: chlorinated lipids in atherosclerosis and myocardial ischemia. *Clin Lipidol* **5**, 835-852, doi:10.2217/clp.10.68 (2010).
226 Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Jr., Murphy, R. C., Raetz, C. R., Russell, D. W., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., VanNieuwenhze, M. S., White, S. H., Witztum, J. L. & Dennis, E. A. A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* **46**, 839-861, doi:10.1194/jlr.E400004-JLR200 (2005).
227 http://lipidlibrary.aocs.org/Primer/content.cfm?ItemNumber=39320.
228 Brites, P., Waterham, H. R. & Wanders, R. J. Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. *Biochimica et biophysica acta* **1636**, 219-231, doi:10.1016/j.bbalip.2003.12.010 (2004).
229 Han, X. L. & Gross, R. W. Plasmenylcholine and phosphatidylcholine membrane bilayers possess distinct conformational motifs. *Biochemistry* **29**, 4992-4996 (1990).
230 Paltauf, F. Ether lipids in biomembranes. *Chem Phys Lipids* **74**, 101-139 (1994).
231 Anchisi, L., Dessi, S., Pani, A. & Mandas, A. Cholesterol homeostasis: a key to prevent or slow down neurodegeneration. *Front Physiol* **3**, 486, doi:10.3389/fphys.2012.00486 (2012).
232 Korade, Z. & Kenworthy, A. K. Lipid rafts, cholesterol, and the brain. *Neuropharmacology* **55**, 1265-1273, doi:10.1016/j.neuropharm.2008.02.019 (2008).

233 Pike, L. J., Han, X., Chung, K. N. & Gross, R. W. Lipid rafts are enriched in arachidonic acid and plasmenylethanolamine and their composition is independent of caveolin-1 expression: a quantitative electrospray ionization/mass spectrometric analysis. *Biochemistry* **41**, 2075-2088 (2002).
234 Honsho, M., Yagita, Y., Kinoshita, N. & Fujiki, Y. Isolation and characterization of mutant animal cell line defective in alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase: localization and transport of plasmalogens to post-Golgi compartments. *Biochimica et biophysica acta* **1783**, 1857-1865, doi:10.1016/j.bbamcr.2008.05.018 (2008).
235 Han, X., Holtzman, D. M. & McKeel, D. W., Jr. Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry. *J Neurochem* **77**, 1168-1180 (2001).
236 Aboshi, T., Nishida, R. & Mori, N. Identification of plasmalogen in the gut of silkworm (Bombyx mori). *Insect Biochem Mol Biol* **42**, 596-601, doi:10.1016/j.ibmb.2012.04.006 (2012).
237 Breckenridge, W. C., Morgan, I. G., Zanetta, J. P. & Vincendon, G. Adult rat brain synaptic vesicles. II. Lipid composition. *Biochimica et biophysica acta* **320**, 681-686 (1973).
238 Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Gronborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brugger, B., Ringler, P., Muller, S. A., Rammner, B., Grater, F., Hub, J. S., De Groot, B. L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmuller, H., Heuser, J., Wieland, F. & Jahn, R. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* **127**, 831-846, doi:10.1016/j.cell.2006.10.030 (2006).
239 Labadaridis, I., Moraitou, M., Theodoraki, M., Triantafyllidis, G., Sarafidou, J. & Michelakakis, H. Plasmalogen levels in full-term neonates. *Acta Paediatr* **98**, 640-642, doi:10.1111/j.1651-2227.2008.01205.x (2009).
240 Nagan, N. & Zoeller, R. A. Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Prog Lipid Res* **40**, 199-229 (2001).
241 Farooqui, A. A. & Horrocks, L. A. Plasmalogens: workhorse lipids of membranes in normal and injured neurons and glia. *Neuroscientist* **7**, 232-245, doi:10.1177/107385840100700308 (2001).
242 Maeba, R., Maeda, T., Kinoshita, M., Takao, K., Takenaka, H., Kusano, J., Yoshimura, N., Takeoka, Y., Yasuda, D., Okazaki, T. & Teramoto, T. Plasmalogens in human serum positively correlate with high- density lipoprotein and decrease with aging. *J Atheroscler Thromb* **14**, 12-18 (2007).
243 de Vet, E. C., Ijlst, L., Oostheim, W., Dekker, C., Moser, H. W., van Den Bosch, H. & Wanders, R. J. Ether lipid biosynthesis: alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase protein deficiency leads to reduced dihydroxyacetonephosphate acyltransferase activities. *J Lipid Res* **40**, 1998-2003 (1999).
244 Cheng, J. B. & Russell, D. W. Mammalian wax biosynthesis. I. Identification of two fatty acyl-Coenzyme A reductases with different substrate specificities and tissue distributions. *J Biol Chem* **279**, 37789-37797, doi:10.1074/jbc.M406225200 (2004).
245 Bishop, J. E. & Hajra, A. K. Mechanism and specificity of formation of long chain alcohols by developing rat brain. *J Biol Chem* **256**, 9542-9550 (1981).
246 Burdett, K., Larkins, L. K., Das, A. K. & Hajra, A. K. Peroxisomal localization of acyl-coenzyme A reductase (long chain alcohol forming) in guinea pig intestine mucosal cells. *J Biol Chem* **266**, 12201-12206 (1991).
247 Zanglis, A. & Lianos, E. A. Synthesis of alkyl-ether glycerophospholipids in rat glomerular mesangial cells: evidence for alkyldihydroxyacetone phosphate synthase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **144**, 666-673 (1987).

248 Kanzawa, N., Maeda, Y., Ogiso, H., Murakami, Y., Taguchi, R. & Kinoshita, T. Peroxisome dependency of alkyl-containing GPI-anchor biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 17711-17716, doi:10.1073/pnas.0904762106 (2009).
249 Biermann, J., Just, W. W., Wanders, R. J. & Van Den Bosch, H. Alkyl-dihydroxyacetone phosphate synthase and dihydroxyacetone phosphate acyltransferase form a protein complex in peroxisomes. *Eur J Biochem* **261**, 492-499 (1999).
250 Hardeman, D. & van den Bosch, H. Topography of ether phospholipid biosynthesis. *Biochimica et biophysica acta* **1006**, 1-8 (1989).
251 Itzkovitz, B., Jiralerspong, S., Nimmo, G., Loscalzo, M., Horovitz, D. D., Snowden, A., Moser, A., Steinberg, S. & Braverman, N. Functional characterization of novel mutations in GNPAT and AGPS, causing rhizomelic chondrodysplasia punctata (RCDP) types 2 and 3. *Hum Mutat* **33**, 189-197, doi:10.1002/humu.21623 (2012).
252 Brown, A. J. & Snyder, F. Alkyldihydroxyacetone-P synthase. Solubilization, partial purification, new assay method, and evidence for a ping-pong mechanism. *J Biol Chem* **257**, 8835-8839 (1982).
253 James, P. F., Lake, A. C., Hajra, A. K., Larkins, L. K., Robinson, M., Buchanan, F. G. & Zoeller, R. A. An animal cell mutant with a deficiency in acyl/alkyl-dihydroxyacetone-phosphate reductase activity. Effects on the biosynthesis of ether-linked and diacyl glycerolipids. *J Biol Chem* **272**, 23540-23546 (1997).
254 Lee, T. C. Biosynthesis and possible biological functions of plasmalogens. *Biochimica et biophysica acta* **1394**, 129-145 (1998).
255 Jurkowitz, M. S., Horrocks, L. A. & Litsky, M. L. Identification and characterization of alkenyl hydrolase (lysoplasmalogenase) in microsomes and identification of a plasmalogen-active phospholipase A2 in cytosol of small intestinal epithelium. *Biochimica et biophysica acta* **1437**, 142-156 (1999).
256 Wu, L. C., Pfeiffer, D. R., Calhoon, E. A., Madiai, F., Marcucci, G., Liu, S. & Jurkowitz, M. S. Purification, identification, and cloning of lysoplasmalogenase, the enzyme that catalyzes hydrolysis of the vinyl ether bond of lysoplasmalogen. *J Biol Chem* **286**, 24916-24930, doi:10.1074/jbc.M111.247163 (2011).
257 Taguchi, H. & Armarego, W. L. Glyceryl-ether monooxygenase [EC 1.14.16.5]. A microsomal enzyme of ether lipid metabolism. *Med Res Rev* **18**, 43-89 (1998).
258 Honsho, M., Asaoku, S. & Fujiki, Y. Posttranslational regulation of fatty acyl-CoA reductase 1, Far1, controls ether glycerophospholipid synthesis. *J Biol Chem* **285**, 8537-8542, doi:10.1074/jbc.M109.083311 (2010).
259 Broniec, A., Klosinski, R., Pawlak, A., Wrona-Krol, M., Thompson, D. & Sarna, T. Interactions of plasmalogens and their diacyl analogs with singlet oxygen in selected model systems. *Free Radic Biol Med* **50**, 892-898, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.002 (2011).
260 Sindelar, P. J., Guan, Z., Dallner, G. & Ernster, L. The protective role of plasmalogens in iron-induced lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* **26**, 318-324 (1999).
261 Stables, M. J. & Gilroy, D. W. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Prog Lipid Res* **50**, 35-51, doi:10.1016/j.plipres.2010.07.005 (2011).
262 Vance, D. E. & Vance, J. E. Physiological consequences of disruption of mammalian phospholipid biosynthetic genes. *J Lipid Res* **50 Suppl**, S132-137, doi:10.1194/jlr.R800048-JLR200 (2009).

263 Bams-Mengerink, A. M., Koelman, J. H., Waterham, H., Barth, P. G. & Poll-The, B. T. The neurology of rhizomelic chondrodysplasia punctata. *Orphanet J Rare Dis* **8**, 174, doi:10.1186/1750-1172-8-174 (2013).
264 Wanders, R. J. Metabolic functions of peroxisomes in health and disease. *Biochimie* **98**, 36-44, doi:10.1016/j.biochi.2013.08.022 (2014).
265 Thai, T. P., Rodemer, C., Jauch, A., Hunziker, A., Moser, A., Gorgas, K. & Just, W. W. Impaired membrane traffic in defective ether lipid biosynthesis. *Hum Mol Genet* **10**, 127-136 (2001).
266 Perichon, R., Moser, A. B., Wallace, W. C., Cunningham, S. C., Roth, G. S. & Moser, H. W. Peroxisomal disease cell lines with cellular plasmalogen deficiency have impaired muscarinic cholinergic signal transduction activity and amyloid precursor protein secretion. *Biochem Biophys Res Commun* **248**, 57-61, doi:10.1006/bbrc.1998.8909 (1998).
267 Tiffany, C. W., Hoefler, S., Moser, H. W. & Burch, R. M. Arachidonic acid metabolism in fibroblasts from patients with peroxisomal diseases: response to interleukin 1. *Biochimica et biophysica acta* **1096**, 41-46 (1990).
268 Zoeller, R. A., Morand, O. H. & Raetz, C. R. A possible role for plasmalogens in protecting animal cells against photosensitized killing. *J Biol Chem* **263**, 11590-11596 (1988).
269 Hoefler, G., Paschke, E., Hoefler, S., Moser, A. B. & Moser, H. W. Photosensitized killing of cultured fibroblasts from patients with peroxisomal disorders due to pyrene fatty acid-mediated ultraviolet damage. *J Clin Invest* **88**, 1873-1879, doi:10.1172/JCI115509 (1991).
270 Zoeller, R. A., Lake, A. C., Nagan, N., Gaposchkin, D. P., Legner, M. A. & Lieberthal, W. Plasmalogens as endogenous antioxidants: somatic cell mutants reveal the importance of the vinyl ether. *Biochem J* **338 (Pt 3)**, 769-776 (1999).
271 Jansen, G. A. & Wanders, R. J. Plasmalogens and oxidative stress: evidence against a major role of plasmalogens in protection against the superoxide anion radical. *J Inherit Metab Dis* **20**, 85-94 (1997).
272 Khan, M., Singh, J. & Singh, I. Plasmalogen deficiency in cerebral adrenoleukodystrophy and its modulation by lovastatin. *J Neurochem* **106**, 1766-1779, doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05513.x (2008).
273 Zoeller, R. A., Grazia, T. J., LaCamera, P., Park, J., Gaposchkin, D. P. & Farber, H. W. Increasing plasmalogen levels protects human endothelial cells during hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H671-679, doi:10.1152/ajpheart.00524.2001 (2002).
274 Igarashi, M., Ma, K., Gao, F., Kim, H. W., Rapoport, S. I. & Rao, J. S. Disturbed choline plasmalogen and phospholipid fatty acid concentrations in Alzheimer's disease prefrontal cortex. *J Alzheimers Dis* **24**, 507-517, doi:10.3233/JAD-2011-101608 (2011).
275 Ginsberg, L., Rafique, S., Xuereb, J. H., Rapoport, S. I. & Gershfeld, N. L. Disease and anatomic specificity of ethanolamine plasmalogen deficiency in Alzheimer's disease brain. *Brain Res* **698**, 223-226 (1995).
276 Dragonas, C., Bertsch, T., Sieber, C. C. & Brosche, T. Plasmalogens as a marker of elevated systemic oxidative stress in Parkinson's disease. *Clin Chem Lab Med* **47**, 894-897, doi:10.1515/CCLM.2009.205 (2009).
277 Fabelo, N., Martin, V., Santpere, G., Marin, R., Torrent, L., Ferrer, I. & Diaz, M. Severe alterations in lipid composition of frontal cortex lipid rafts from Parkinson's disease and incidental Parkinson's disease. *Mol Med* **17**, 1107-1118, doi:10.2119/molmed.2011.00119 (2011).

278 Wood, P. L., Khan, M. A., Smith, T., Ehrmantraut, G., Jin, W., Cui, W., Braverman, N. E. & Goodenowe, D. B. In vitro and in vivo plasmalogen replacement evaluations in rhizomelic chrondrodysplasia punctata and Pelizaeus-Merzbacher disease using PPI-1011, an ether lipid plasmalogen precursor. *Lipids in health and disease* **10**, 182, doi:10.1186/1476-511X-10-182 (2011).
279 Calon, F., Lim, G. P., Yang, F., Morihara, T., Teter, B., Ubeda, O., Rostaing, P., Triller, A., Salem, N., Jr., Ashe, K. H., Frautschy, S. A. & Cole, G. M. Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuron* **43**, 633-645, doi:10.1016/j.neuron.2004.08.013 (2004).
280 Bousquet, M., Gue, K., Emond, V., Julien, P., Kang, J. X., Cicchetti, F. & Calon, F. Transgenic conversion of omega-6 into omega-3 fatty acids in a mouse model of Parkinson's disease. *J Lipid Res* **52**, 263-271, doi:10.1194/jlr.M011692 (2011).
281 Moura, F. A., de Andrade, K. Q., dos Santos, J. C. & Goulart, M. O. Lipoic Acid: its antioxidant and anti-inflammatory role and clinical applications. *Curr Top Med Chem* **15**, 458-483 (2015).
282 Akbar, M., Calderon, F., Wen, Z. & Kim, H. Y. Docosahexaenoic acid: a positive modulator of Akt signaling in neuronal survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 10858-10863, doi:10.1073/pnas.0502903102 (2005).
283 Florent, S., Malaplate-Armand, C., Youssef, I., Kriem, B., Koziel, V., Escanye, M. C., Fifre, A., Sponne, I., Leininger-Muller, B., Olivier, J. L., Pillot, T. & Oster, T. Docosahexaenoic acid prevents neuronal apoptosis induced by soluble amyloid-beta oligomers. *J Neurochem* **96**, 385-395, doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03541.x (2006).
284 Pan, H. C., Kao, T. K., Ou, Y. C., Yang, D. Y., Yen, Y. J., Wang, C. C., Chuang, Y. H., Liao, S. L., Raung, S. L., Wu, C. W., Chiang, A. N. & Chen, C. J. Protective effect of docosahexaenoic acid against brain injury in ischemic rats. *J Nutr Biochem* **20**, 715-725, doi:10.1016/j.jnutbio.2008.06.014 (2009).
285 Wood, P. L., Smith, T., Lane, N., Khan, M. A., Ehrmantraut, G. & Goodenowe, D. B. Oral bioavailability of the ether lipid plasmalogen precursor, PPI-1011, in the rabbit: a new therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Lipids Health Dis* **10**, 227, doi:10.1186/1476-511X-10-227 (2011).
286 Miville-Godbout, E., Bourque, M., Morissette, M., Al-Sweidi, S., Smith, T., Mochizuki, A., Senanayake, V., Jayasinghe, D., Wang, L., Goodenowe, D. & Di Paolo, T. Plasmalogen Augmentation Reverses Striatal Dopamine Loss in MPTP Mice. *PloS one* **11**, e0151020, doi:10.1371/journal.pone.0151020 (2016).
287 Samadi, P., Gregoire, L., Rouillard, C., Bedard, P. J., Di Paolo, T. & Levesque, D. Docosahexaenoic acid reduces levodopa-induced dyskinesias in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine monkeys. *Ann Neurol* **59**, 282-288, doi:10.1002/ana.20738 (2006).
288 Gregoire, L., Smith, T., Senanayake, V., Mochizuki, A., Miville-Godbout, E., Goodenowe, D. & Di Paolo, T. Plasmalogen precursor analog treatment reduces levodopa-induced dyskinesias in parkinsonian monkeys. *Behav Brain Res* **286**, 328-337, doi:10.1016/j.bbr.2015.03.012 (2015).
289 Bourque, M., Gregoire, L. & Di Paolo, T. The plasmalogen precursor analog PPI-1011 reduces the development of L-DOPA-induced dyskinesias in de novo MPTP monkeys. *Behav Brain Res* **337**, 183-185, doi:10.1016/j.bbr.2017.09.023 (2018).
290 Salem, N., Jr., Litman, B., Kim, H. Y. & Gawrisch, K. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids* **36**, 945-959 (2001).

291 Schuchardt, J. P. & Hahn, A. Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **89**, 1-8, doi:10.1016/j.plefa.2013.03.010 (2013).
292 Herbaut, C. [Omega-3 and health]. *Rev Med Brux* **27**, S355-360 (2006).
293 Ruiz-Lopez, N., Sayanova, O., Napier, J. A. & Haslam, R. P. Metabolic engineering of the omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway into transgenic plants. *J Exp Bot* **63**, 2397-2410, doi:10.1093/jxb/err454 (2012).
294 Pereira, S. L., Leonard, A. E., Huang, Y. S., Chuang, L. T. & Mukerji, P. Identification of two novel microalgal enzymes involved in the conversion of the omega3-fatty acid, eicosapentaenoic acid, into docosahexaenoic acid. *Biochem J* **384**, 357-366, doi:10.1042/BJ20040970 (2004).
295 Rapoport, S. I., Rao, J. S. & Igarashi, M. Brain metabolism of nutritionally essential polyunsaturated fatty acids depends on both the diet and the liver. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **77**, 251-261, doi:10.1016/j.plefa.2007.10.023 (2007).
296 Lin, Y. H. & Salem, N., Jr. Whole body distribution of deuterated linoleic and alpha-linolenic acids and their metabolites in the rat. *J Lipid Res* **48**, 2709-2724, doi:10.1194/jlr.M700369-JLR200 (2007).
297 Igarashi, M., DeMar, J. C., Jr., Ma, K., Chang, L., Bell, J. M. & Rapoport, S. I. Docosahexaenoic acid synthesis from alpha-linolenic acid by rat brain is unaffected by dietary n-3 PUFA deprivation. *J Lipid Res* **48**, 1150-1158, doi:10.1194/jlr.M600549-JLR200 (2007).
298 Ozkan, A., Parlak, H., Tanriover, G., Dilmac, S., Ulker, S. N., Birsen, L. & Agar, A. The protective mechanism of docosahexaenoic acid in mouse model of Parkinson: The role of hemeoxygenase. *Neurochem Int*, doi:10.1016/j.neuint.2016.10.012 (2016).
299 Bousquet, M., Saint-Pierre, M., Julien, C., Salem, N., Jr., Cicchetti, F. & Calon, F. Beneficial effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acid on toxin-induced neuronal degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J* **22**, 1213-1225, doi:10.1096/fj.07-9677com (2008).
300 Hacioglu, G., Seval-Celik, Y., Tanriover, G., Ozsoy, O., Saka-Topcuoglu, E., Balkan, S. & Agar, A. Docosahexaenoic acid provides protective mechanism in bilaterally MPTP-lesioned rat model of Parkinson's disease. *Folia Histochem Cytobiol* **50**, 228-238 (2012).
301 Hashimoto, M., Hossain, S., Shimada, T., Sugioka, K., Yamasaki, H., Fujii, Y., Ishibashi, Y., Oka, J. & Shido, O. Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats. *J Neurochem* **81**, 1084-1091 (2002).
302 Singaram, C., Ashraf, W., Gaumnitz, E. A., Torbey, C., Sengupta, A., Pfeiffer, R. & Quigley, E. M. Dopaminergic defect of enteric nervous system in Parkinson's disease patients with chronic constipation. *Lancet* **346**, 861-864 (1995).
303 Bazan, N. G. Neuroprotectin D1 (NPD1): a DHA-derived mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress. *Brain Pathol* **15**, 159-166 (2005).
304 Wu, A., Ying, Z. & Gomez-Pinilla, F. Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* **21**, 1457-1467, doi:10.1089/neu.2004.21.1457 (2004).
305 Kim, H. Y. Novel metabolism of docosahexaenoic acid in neural cells. *J Biol Chem* **282**, 18661-18665, doi:10.1074/jbc.R700015200 (2007).
306 Calon, F., Lim, G. P., Morihara, T., Yang, F., Ubeda, O., Salem, N., Jr., Frautschy, S. A. & Cole, G. M. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid depletion activates caspases and decreases NMDA receptors in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* **22**, 617-626, doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04253.x (2005).

307 Halliday, G., McCann, H. & Shepherd, C. Evaluation of the Braak hypothesis: how far can it explain the pathogenesis of Parkinson's disease? *Expert Rev Neurother* **12**, 673-686, doi:10.1586/ern.12.47 (2012).
308 Marcheselli, V. L., Hong, S., Lukiw, W. J., Tian, X. H., Gronert, K., Musto, A., Hardy, M., Gimenez, J. M., Chiang, N., Serhan, C. N. & Bazan, N. G. Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. *J Biol Chem* **278**, 43807-43817, doi:10.1074/jbc.M305841200 (2003).
309 Jump, D. B. The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* **277**, 8755-8758, doi:10.1074/jbc.R100062200 (2002).
310 Ozsoy, O., Seval-Celik, Y., Hacioglu, G., Yargicoglu, P., Demir, R., Agar, A. & Aslan, M. The influence and the mechanism of docosahexaenoic acid on a mouse model of Parkinson's disease. *Neurochem Int* **59**, 664-670, doi:10.1016/j.neuint.2011.06.012 (2011).
311 Zhang, M., Wang, S., Mao, L., Leak, R. K., Shi, Y., Zhang, W., Hu, X., Sun, B., Cao, G., Gao, Y., Xu, Y., Chen, J. & Zhang, F. Omega-3 fatty acids protect the brain against ischemic injury by activating Nrf2 and upregulating heme oxygenase 1. *J Neurosci* **34**, 1903-1915, doi:10.1523/JNEUROSCI.4043-13.2014 (2014).
312 Liu, Q., Wu, D., Ni, N., Ren, H., Luo, C., He, C., Kang, J. X., Wan, J. B. & Su, H. Omega-3 polyunsaturated fatty acids protect neural progenitor cells against oxidative injury. *Mar Drugs* **12**, 2341-2356, doi:10.3390/md12052341 (2014).
313 Nguyen, T., Nioi, P. & Pickett, C. B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem* **284**, 13291-13295, doi:10.1074/jbc.R900010200 (2009).
314 Hassan, I. R. & Gronert, K. Acute changes in dietary omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids have a pronounced impact on survival following ischemic renal injury and formation of renoprotective docosahexaenoic acid-derived protectin D1. *J Immunol* **182**, 3223-3232, doi:10.4049/jimmunol.0802064 (2009).
315 Le, W. D., Xie, W. J. & Appel, S. H. Protective role of heme oxygenase-1 in oxidative stress-induced neuronal injury. *J Neurosci Res* **56**, 652-658, doi:10.1002/(SICI)1097-4547(19990615)56:6<652::AID-JNR11>3.0.CO;2-5 (1999).
316 Lukiw, W. J., Cui, J. G., Marcheselli, V. L., Bodker, M., Botkjaer, A., Gotlinger, K., Serhan, C. N. & Bazan, N. G. A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *J Clin Invest* **115**, 2774-2783, doi:10.1172/JCI25420 (2005).
317 Bousquet, M., Gibrat, C., Saint-Pierre, M., Julien, C., Calon, F. & Cicchetti, F. Modulation of brain-derived neurotrophic factor as a potential neuroprotective mechanism of action of omega-3 fatty acids in a parkinsonian animal model. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **33**, 1401-1408, doi:10.1016/j.pnpbp.2009.07.018 (2009).
318 Katakura, M., Hashimoto, M., Shahdat, H. M., Gamoh, S., Okui, T., Matsuzaki, K. & Shido, O. Docosahexaenoic acid promotes neuronal differentiation by regulating basic helix-loop-helix transcription factors and cell cycle in neural stem cells. *Neuroscience* **160**, 651-660, doi:10.1016/j.neuroscience.2009.02.057 (2009).
319 Katakura, M., Hashimoto, M., Okui, T., Shahdat, H. M., Matsuzaki, K. & Shido, O. Omega-3 polyunsaturated Fatty acids enhance neuronal differentiation in cultured rat neural stem cells. *Stem Cells Int* **2013**, 490476, doi:10.1155/2013/490476 (2013).
320 Coulombe, K., Saint-Pierre, M., Cisbani, G., St-Amour, I., Gibrat, C., Giguere-Rancourt, A., Calon, F. & Cicchetti, F. Partial neurorescue effects of DHA following a 6-OHDA lesion of the mouse dopaminergic system. *J Nutr Biochem* **30**, 133-142, doi:10.1016/j.jnutbio.2015.11.014 (2016).

321 Bannenberg, G. & Serhan, C. N. Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update. *Biochimica et biophysica acta* **1801**, 1260-1273, doi:10.1016/j.bbalip.2010.08.002 (2010).
322 Serhan, C. N., Yacoubian, S. & Yang, R. Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. *Annu Rev Pathol* **3**, 279-312, doi:10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151409 (2008).
323 Serhan, C. N., Chiang, N. & Van Dyke, T. E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature reviews. Immunology* **8**, 349-361, doi:10.1038/nri2294 (2008).
324 Serhan, C. N. & Chiang, N. Resolution phase lipid mediators of inflammation: agonists of resolution. *Curr Opin Pharmacol* **13**, 632-640, doi:10.1016/j.coph.2013.05.012 (2013).
325 Balas, L., Guichardant, M., Durand, T. & Lagarde, M. Confusion between protectin D1 (PD1) and its isomer protectin DX (PDX). An overview on the dihydroxy-docosatrienes described to date. *Biochimie* **99**, 1-7, doi:10.1016/j.biochi.2013.11.006 (2014).
326 Hong, S., Gronert, K., Devchand, P. R., Moussignac, R. L. & Serhan, C. N. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *J Biol Chem* **278**, 14677-14687, doi:10.1074/jbc.M300218200 (2003).
327 Mas, E., Croft, K. D., Zahra, P., Barden, A. & Mori, T. A. Resolvins D1, D2, and other mediators of self-limited resolution of inflammation in human blood following n-3 fatty acid supplementation. *Clin Chem* **58**, 1476-1484, doi:10.1373/clinchem.2012.190199 (2012).
328 De Caterina, R., Cybulsky, M. I., Clinton, S. K., Gimbrone, M. A., Jr. & Libby, P. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb* **14**, 1829-1836 (1994).
329 Khalfoun, B., Thibault, F., Watier, H., Bardos, P. & Lebranchu, Y. Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit in vitro human endothelial cell production of interleukin-6. *Adv Exp Med Biol* **400B**, 589-597 (1997).
330 Yaqoob, P. & Calder, P. Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages. *Cell Immunol* **163**, 120-128, doi:10.1006/cimm.1995.1106 (1995).
331 Billiar, T. R., Bankey, P. E., Svingen, B. A., Curran, R. D., West, M. A., Holman, R. T., Simmons, R. L. & Cerra, F. B. Fatty acid intake and Kupffer cell function: fish oil alters eicosanoid and monokine production to endotoxin stimulation. *Surgery* **104**, 343-349 (1988).
332 Renier, G., Skamene, E., DeSanctis, J. & Radzioch, D. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids prevent the development of atherosclerotic lesions in mice. Modulation of macrophage secretory activities. *Arterioscler Thromb* **13**, 1515-1524 (1993).
333 Sadeghi, S., Wallace, F. A. & Calder, P. C. Dietary lipids modify the cytokine response to bacterial lipopolysaccharide in mice. *Immunology* **96**, 404-410 (1999).
334 Calder, P. C., Ahluwalia, N., Albers, R., Bosco, N., Bourdet-Sicard, R., Haller, D., Holgate, S. T., Jonsson, L. S., Latulippe, M. E., Marcos, A., Moreines, J., M'Rini, C., Muller, M., Pawelec, G., van Neerven, R. J., Watzl, B. & Zhao, J. A consideration of biomarkers to be used for evaluation of inflammation in human nutritional studies. *Br J Nutr* **109 Suppl 1**, S1-34, doi:10.1017/S0007114512005119 (2013).
335 Lima-Garcia, J. F., Dutra, R. C., da Silva, K., Motta, E. M., Campos, M. M. & Calixto, J. B. The precursor of resolvin D series and aspirin-triggered resolvin D1 display anti-

hyperalgesic properties in adjuvant-induced arthritis in rats. *Br J Pharmacol* **164**, 278-293, doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01345.x (2011).
336 Arita, M., Yoshida, M., Hong, S., Tjonahen, E., Glickman, J. N., Petasis, N. A., Blumberg, R. S. & Serhan, C. N. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7671-7676, doi:10.1073/pnas.0409271102 (2005).
337 Aoki, H., Hisada, T., Ishizuka, T., Utsugi, M., Kawata, T., Shimizu, Y., Okajima, F., Dobashi, K. & Mori, M. Resolvin E1 dampens airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Biochem Biophys Res Commun* **367**, 509-515, doi:10.1016/j.bbrc.2008.01.012 (2008).
338 Haworth, O., Cernadas, M., Yang, R., Serhan, C. N. & Levy, B. D. Resolvin E1 regulates interleukin 23, interferon-gamma and lipoxin A4 to promote the resolution of allergic airway inflammation. *Nat Immunol* **9**, 873-879, doi:10.1038/ni.1627 (2008).
339 Bilal, S., Haworth, O., Wu, L., Weylandt, K. H., Levy, B. D. & Kang, J. X. Fat-1 transgenic mice with elevated omega-3 fatty acids are protected from allergic airway responses. *Biochimica et biophysica acta* **1812**, 1164-1169, doi:10.1016/j.bbadis.2011.05.002 (2011).
340 Rogerio, A. P., Haworth, O., Croze, R., Oh, S. F., Uddin, M., Carlo, T., Pfeffer, M. A., Priluck, R., Serhan, C. N. & Levy, B. D. Resolvin D1 and aspirin-triggered resolvin D1 promote resolution of allergic airways responses. *J Immunol* **189**, 1983-1991, doi:10.4049/jimmunol.1101665 (2012).
341 Hudert, C. A., Weylandt, K. H., Lu, Y., Wang, J., Hong, S., Dignass, A., Serhan, C. N. & Kang, J. X. Transgenic mice rich in endogenous omega-3 fatty acids are protected from colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11276-11281, doi:10.1073/pnas.0601280103 (2006).
342 Faull, R. J. Adhesion molecules in health and disease. *Aust N Z J Med* **25**, 720-730 (1995).
343 Munro, J. M. Endothelial-leukocyte adhesive interactions in inflammatory diseases. *Eur Heart J* **14 Suppl K**, 72-77 (1993).
344 Albelda, S. M., Smith, C. W. & Ward, P. A. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J* **8**, 504-512 (1994).
345 Cronstein, B. N. Adhesion molecules in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* **6**, 300-304 (1994).
346 Haskard, D. O. Cell adhesion molecules in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* **7**, 229-234 (1995).
347 Tomita, K., Tanigawa, T., Yajima, H., Sano, H., Fukutani, K., Hitsuda, Y., Matsumoto, Y. & Sasaki, T. Expression of adhesion molecules on mononuclear cells from individuals with stable atopic asthma. *Clin Exp Allergy* **27**, 664-671 (1997).
348 Nageh, M. F., Sandberg, E. T., Marotti, K. R., Lin, A. H., Melchior, E. P., Bullard, D. C. & Beaudet, A. L. Deficiency of inflammatory cell adhesion molecules protects against atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 1517-1520 (1997).
349 Kobayashi, Y., Kawai, K., Honda, H., Tomida, S., Niimi, N., Tamatani, T., Miyasaka, M. & Yoshikai, Y. Antibodies against leukocyte function-associated antigen-1 and against intercellular adhesion molecule-1 together suppress the progression of experimental allergic encephalomyelitis. *Cell Immunol* **164**, 295-305, doi:10.1006/cimm.1995.1173 (1995).
350 Collie-Duguid, E. S. & Wahle, K. W. Inhibitory effect of fish oil N-3 polyunsaturated fatty acids on the expression of endothelial cell adhesion molecules. *Biochem Biophys Res Commun* **220**, 969-974, doi:10.1006/bbrc.1996.0516 (1996).

351 Hughes, D. A., Southon, S. & Pinder, A. C. (n-3) Polyunsaturated fatty acids modulate the expression of functionally associated molecules on human monocytes in vitro. *J Nutr* **126**, 603-610 (1996).
352 Yamada, H., Yoshida, M., Nakano, Y., Suganami, T., Satoh, N., Mita, T., Azuma, K., Itoh, M., Yamamoto, Y., Kamei, Y., Horie, M., Watada, H. & Ogawa, Y. In vivo and in vitro inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells and endothelial adhesion molecules by eicosapentaenoic acid. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 2173-2179, doi:10.1161/ATVBAHA.108.171736 (2008).
353 Miles, E. A., Wallace, F. A. & Calder, P. C. Dietary fish oil reduces intercellular adhesion molecule 1 and scavenger receptor expression on murine macrophages. *Atherosclerosis* **152**, 43-50 (2000).
354 Sanderson, P. & Calder, P. C. Dietary fish oil diminishes lymphocyte adhesion to macrophage and endothelial cell monolayers. *Immunology* **94**, 79-87 (1998).
355 Lee, J. Y., Sohn, K. H., Rhee, S. H. & Hwang, D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* **276**, 16683-16689, doi:10.1074/jbc.M011695200 (2001).
356 Weatherill, A. R., Lee, J. Y., Zhao, L., Lemay, D. G., Youn, H. S. & Hwang, D. H. Saturated and polyunsaturated fatty acids reciprocally modulate dendritic cell functions mediated through TLR4. *J Immunol* **174**, 5390-5397 (2005).
357 Kong, W., Yen, J. H., Vassiliou, E., Adhikary, S., Toscano, M. G. & Ganea, D. Docosahexaenoic acid prevents dendritic cell maturation and in vitro and in vivo expression of the IL-12 cytokine family. *Lipids in health and disease* **9**, 12, doi:10.1186/1476-511X-9-12 (2010).
358 Hirasawa, A., Tsumaya, K., Awaji, T., Katsuma, S., Adachi, T., Yamada, M., Sugimoto, Y., Miyazaki, S. & Tsujimoto, G. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med* **11**, 90-94, doi:10.1038/nm1168 (2005).
359 Oh, D. Y., Talukdar, S., Bae, E. J., Imamura, T., Morinaga, H., Fan, W., Li, P., Lu, W. J., Watkins, S. M. & Olefsky, J. M. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* **142**, 687-698, doi:10.1016/j.cell.2010.07.041 (2010).
360 Svensson, E., Horvath-Puho, E., Thomsen, R. W., Djurhuus, J. C., Pedersen, L., Borghammer, P. & Sorensen, H. T. Vagotomy and subsequent risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol* **78**, 522-529, doi:10.1002/ana.24448 (2015).
361 Szabo, G., Benyo, I. & Sandor, J. The effect of haemorrhage on gastric circulation and acid output in the dog. *Injury* **10**, 190-193 (1979).
362 Sharkey, K. A. & Mawe, G. M. Neuroimmune and epithelial interactions in intestinal inflammation. *Curr Opin Pharmacol* **2**, 669-677 (2002).
363 Braak, H., Rub, U., Gai, W. P. & Del Tredici, K. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm* **110**, 517-536, doi:10.1007/s00702-002-0808-2 (2003).
364 Pouclet, H., Lebouvier, T., Coron, E., Des Varannes, S. B., Neunlist, M. & Derkinderen, P. A comparison between colonic submucosa and mucosa to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neurogastroenterol Motil* **24**, e202-205, doi:10.1111/j.1365-2982.2012.01887.x (2012).
365 Pouclet, H., Lebouvier, T., Coron, E., des Varannes, S. B., Rouaud, T., Roy, M., Neunlist, M. & Derkinderen, P. A comparison between rectal and colonic biopsies to detect Lewy

pathology in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* **45**, 305-309, doi:10.1016/j.nbd.2011.08.014 (2012).
366 Hu, Y., Yu, S. Y., Zuo, L. J., Cao, C. J., Wang, F., Chen, Z. J., Du, Y., Lian, T. H., Wang, Y. J., Chan, P., Chen, S. D., Wang, X. M. & Zhang, W. Parkinson disease with REM sleep behavior disorder: features, alpha-synuclein, and inflammation. *Neurology* **84**, 888-894, doi:10.1212/WNL.0000000000001308 (2015).
367 Forsyth, C. B., Shannon, K. M., Kordower, J. H., Voigt, R. M., Shaikh, M., Jaglin, J. A., Estes, J. D., Dodiya, H. B. & Keshavarzian, A. Increased intestinal permeability correlates with sigmoid mucosa alpha-synuclein staining and endotoxin exposure markers in early Parkinson's disease. *PLoS One* **6**, e28032, doi:10.1371/journal.pone.0028032 (2011).
368 Lennert, B., Bibeau, W., Farrelly, E., Sacco, P. & Schoor, T. Assessment of Treatment Patterns and Patient Outcomes in Levodopa-Induced Dyskinesias (ASTROID): A US Chart Review Study. *Am Health Drug Benefits* **5**, 347-358 (2012).
369 Chaudhuri, K. R., Healy, D. G., Schapira, A. H. & National Institute for Clinical, Excellence. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol* **5**, 235-245, doi:10.1016/S1474-4422(06)70373-8 (2006).
370 Poirier, A. A., Aube, B., Cote, M., Morin, N., Di Paolo, T. & Soulet, D. Gastrointestinal Dysfunctions in Parkinson's Disease: Symptoms and Treatments. *Parkinsons Dis* **2016**, 6762528, doi:10.1155/2016/6762528 (2016).
371 Bourque, M., Morissette, M., Cote, M., Soulet, D. & Di Paolo, T. Implication of GPER1 in neuroprotection in a mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* **34**, 887-901, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2012.05.022 (2013).
372 Bourque, M., Dluzen, D. E. & Di Paolo, T. Signaling pathways mediating the neuroprotective effects of sex steroids and SERMs in Parkinson's disease. *Front Neuroendocrinol* **33**, 169-178, doi:10.1016/j.yfrne.2012.02.003 (2012).
373 Cote, M., Bourque, M., Poirier, A. A., Aube, B., Morissette, M., Di Paolo, T. & Soulet, D. GPER1-mediated immunomodulation and neuroprotection in the myenteric plexus of a mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* **82**, 99-113, doi:10.1016/j.nbd.2015.05.017 (2015).
374 Poirier, A. A., Cote, M., Bourque, M., Morissette, M., Di Paolo, T. & Soulet, D. Neuroprotective and immunomodulatory effects of raloxifene in the myenteric plexus of a mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* **48**, 61-71, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2016.08.004 (2016).
375 Holst, M. C. & Powley, T. L. Cuprolinic blue (quinolinic phthalocyanine) counterstaining of enteric neurons for peroxidase immunocytochemistry. *J Neurosci Methods* **62**, 121-127 (1995).
376 Lawrence, T. & Natoli, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol* **11**, 750-761, doi:10.1038/nri3088 (2011).
377 Chaudhuri, K. R. & Schapira, A. H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *The Lancet. Neurology* **8**, 464-474, doi:10.1016/S1474-4422(09)70068-7 (2009).
378 Goldman, J. G. & Postuma, R. Premotor and nonmotor features of Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* **27**, 434-441, doi:10.1097/WCO.0000000000000112 (2014).
379 Park, A. & Stacy, M. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *J Neurol* **256 Suppl 3**, 293-298, doi:10.1007/s00415-009-5240-1 (2009).
380 Sauerbier, A. & Ray Chaudhuri, K. Non-motor symptoms: the core of multi-morbid Parkinson's disease. *Br J Hosp Med (Lond)* **75**, 18-24 (2014).

381 Barone, P., Antonini, A., Colosimo, C., Marconi, R., Morgante, L., Avarello, T. P., Bottacchi, E., Cannas, A., Ceravolo, G., Ceravolo, R., Cicarelli, G., Gaglio, R. M., Giglia, R. M., Iemolo, F., Manfredi, M., Meco, G., Nicoletti, A., Pederzoli, M., Petrone, A., Pisani, A., Pontieri, F. E., Quatrale, R., Ramat, S., Scala, R., Volpe, G., Zappulla, S., Bentivoglio, A. R., Stocchi, F., Trianni, G., Dotto, P. D. & group, Priamo study. The PRIAMO study: A multicenter assessment of nonmotor symptoms and their impact on quality of life in Parkinson's disease. *Mov Disord* **24**, 1641-1649, doi:10.1002/mds.22643 (2009).
382 Bernal-Pacheco, O., Limotai, N., Go, C. L. & Fernandez, H. H. Nonmotor manifestations in Parkinson disease. *Neurologist* **18**, 1-16, doi:10.1097/NRL.0b013e31823d7abb (2012).
383 Dubow, J. S. Autonomic dysfunction in Parkinson's disease. *Dis Mon* **53**, 265-274, doi:10.1016/j.disamonth.2007.02.004 (2007).
384 Lyons, K. E. & Pahwa, R. The impact and management of nonmotor symptoms of Parkinson's disease. *The American journal of managed care* **17 Suppl 12**, S308-314 (2011).
385 Natale, G., Kastsiushenka, O., Fulceri, F., Ruggieri, S., Paparelli, A. & Fornai, F. MPTP-induced parkinsonism extends to a subclass of TH-positive neurons in the gut. *Brain research* **1355**, 195-206, doi:10.1016/j.brainres.2010.07.076 (2010).
386 Li, L., Shi, L., Liu, H., Luo, Q., Huang, C., Liu, W., Chen, X., Zeng, W. & Chen, Z. Changes in blood anti-oxidation enzyme levels in MPTP-treated monkeys. *Neuroscience letters* **649**, 93-99, doi:10.1016/j.neulet.2017.04.004 (2017).
387 Kuczynski, B. & Reo, N. V. Evidence that plasmalogen is protective against oxidative stress in the rat brain. *Neurochemical research* **31**, 639-656, doi:10.1007/s11064-006-9061-7 (2006).
388 Bharat, S., Cochran, B. C., Hsu, M., Liu, J., Ames, B. N. & Andersen, J. K. Pre-treatment with R-lipoic acid alleviates the effects of GSH depletion in PC12 cells: implications for Parkinson's disease therapy. *Neurotoxicology* **23**, 479-486 (2002).
389 Serhan, C. N. Novel chemical mediators in the resolution of inflammation: resolvins and protectins. *Anesthesiol Clin* **24**, 341-364 (2006).
390 Ito, J., Ito, M., Nambu, H., Fujikawa, T., Tanaka, K., Iwaasa, H. & Tokita, S. Anatomical and histological profiling of orphan G-protein-coupled receptor expression in gastrointestinal tract of C57BL/6J mice. *Cell Tissue Res* **338**, 257-269, doi:10.1007/s00441-009-0859-x (2009).
391 Tatton, W. G., Kwan, M. M., Verrier, M. C., Seniuk, N. A. & Theriault, E. MPTP produces reversible disappearance of tyrosine hydroxylase-containing retinal amacrine cells. *Brain Res* **527**, 21-31 (1990).
392 Seitz, G., Gebhardt, S., Beck, J. F., Bohm, W., Lode, H. N., Niethammer, D. & Bruchelt, G. Ascorbic acid stimulates DOPA synthesis and tyrosine hydroxylase gene expression in the human neuroblastoma cell line SK-N-SH. *Neurosci Lett* **244**, 33-36 (1998).
393 Michel, P. P., Toulorge, D., Guerreiro, S. & Hirsch, E. C. Specific needs of dopamine neurons for stimulation in order to survive: implication for Parkinson disease. *FASEB J* **27**, 3414-3423, doi:10.1096/fj.12-220418 (2013).
394 Laforge, M., Rodrigues, V., Silvestre, R., Gautier, C., Weil, R., Corti, O. & Estaquier, J. NF-kappaB pathway controls mitochondrial dynamics. *Cell Death Differ* **23**, 89-98, doi:10.1038/cdd.2015.42 (2016).
395 Miville-Godbout, E., Bourque, M., Morissette, M., Al-Sweidi, S., Smith, T., Jayasinghe, D., Ritchie, S. & Di Paolo, T. Plasmalogen precursor mitigates striatal dopamine loss in MPTP mice. *Brain Res* **1674**, 70-76, doi:10.1016/j.brainres.2017.08.020 (2017).

396 Sales-Campos, H., Souza, P. R., Peghini, B. C., da Silva, J. S. & Cardoso, C. R. An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. *Mini Rev Med Chem* **13**, 201-210 (2013).

397 Ravnskjaer, K., Frigerio, F., Boergesen, M., Nielsen, T., Maechler, P. & Mandrup, S. PPARdelta is a fatty acid sensor that enhances mitochondrial oxidation in insulin-secreting cells and protects against fatty acid-induced dysfunction. *J Lipid Res* **51**, 1370-1379, doi:10.1194/jlr.M001123 (2010).

398 Lim, J. H., Gerhart-Hines, Z., Dominy, J. E., Lee, Y., Kim, S., Tabata, M., Xiang, Y. K. & Puigserver, P. Oleic acid stimulates complete oxidation of fatty acids through protein kinase A-dependent activation of SIRT1-PGC1alpha complex. *J Biol Chem* **288**, 7117-7126, doi:10.1074/jbc.M112.415729 (2013).

399 Moret, I., Cerrillo, E., Navarro-Puche, A., Iborra, M., Rausell, F., Tortosa, L. & Beltran, B. [Oxidative stress in Crohn's disease]. *Gastroenterol Hepatol* **37**, 28-34, doi:10.1016/j.gastrohep.2013.01.008 (2014).

400 Pan, W., Zhu, S., Dai, D., Tang, Y., Yao, Y. and Shen, N. T Cell Transfer Model of Colitis. *Bio-protocol 6* **13** (2016).

401 Kiesler, P., Fuss, I. J. & Strober, W. Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **1**, 154-170, doi:10.1016/j.jcmgh.2015.01.006 (2015).