

Université de Montréal

Caractérisation pharmacologique et moléculaire des dyskinésies tardives chez un modèle
de primate non humain

Par Souha Mahmoudi

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté de Pharmacie en vue de l'obtention du grade de Ph.D en
sciences pharmaceutiques

Option pharmacologie

Août 2013

©Souha Mahmoudi, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée

Caractérisation pharmacologique et moléculaire des dyskinésies tardives chez un modèle
de primate non humain

Présentée par
Souha Mahmoudi

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Céline Fiset, présidente-rapporteuse
Daniel Lévesque, directeur de recherche
Pierre. J Blanchet, co-directeur de recherche
Pierre Paul Rompré, membre du jury
Frédéric Calon, examinateur externe



Résumé

Les dyskinésies tardives (DT) sont des troubles moteurs associés à l'utilisation chronique des antagonistes des récepteurs dopaminergiques D2 tels que les antipsychotiques et le métoclopramide. Ces dyskinésies correspondent à une incoordination motrice portant préférentiellement sur la musculature oro-faciale. La gestion des DT s'est imposée comme défi de santé publique surtout en l'absence d'une alternative thérapeutique efficace et abordable. L'hypothèse classiquement avancée pour expliquer la physiopathologie des DT inhérente au traitement par les antipsychotiques s'articule autour de l'hypersensibilité des récepteurs dopaminergiques D2, cibles principales de ces molécules. Néanmoins, plusieurs données remettent la véracité de cette hypothèse en question. Hypothèse: nous proposons que le blocage chronique des récepteurs dopaminergiques soit effectivement responsable d'un phénomène d'hypersensibilisation mais contrairement à l'hypothèse classique, cette hypersensibilisation porterait sur des paramètres de la transmission dopaminergique autres que les récepteurs D2. De même nous postulons que cette hypersensibilisation se traduirait par des altérations des cascades signalétiques au niveau des cellules du striatum. Ces altérations aboutissent à des changements portant sur le récepteur nucléaire (Nur77), qui est hautement associé au système dopaminergique; l'induction de ces récepteurs déclencherait des cascades associées à la compensation ou à la genèse des DT. Matériels et méthodes: 23 femelles *Cebus apella*, réparties en 3 groupes: groupe halopéridol, groupe clozapine, et groupe contrôle, ont été exposées aux traitements respectifs pendant 6-36 mois. Après l'analyse comportementale, les animaux ont été décapités et leurs cerveaux isolés pour fin d'analyse. Hybridation in situ: nous avons fait appel à cette technique pour mesurer l'expression de l'ARNm de Nur77 et du neuropeptide enképhaline. Hybridation in situ double: nous avons exploités cette technique pour identifier les populations neuronales exprimant les récepteurs dopaminergiques D3 et localiser leur éventuelle induction. Autoradiographies des récepteurs dopaminergiques D1, D2 et D3 et autoradiographies des récepteurs

glutamatergiques mGluR5. Ces autoradiographies avaient pour objectif d'évaluer l'expression de ces différents récepteurs. Mutagenèse dirigée et transfection cellulaire: nous faisons appel à ces techniques pour reproduire le polymorphisme identifié au niveau de la région 3'UTR de l'ARNm Nur77 et évaluer l'impact que pourrait avoir ce polymorphisme sur la stabilité de l'ARNm Nur77 sinon sur l'expression de la protéine Nur77. Western Blot des kinases ERK 1 et 2: cette technique nous a servi comme moyen pour quantifier l'expression globale de ces kinases. Analyses statistiques: l'expression de l'ARNm Nur77 a été évaluée en utilisant l'analyse de la variance à un seul facteur (One way ANOVA). Nous avons procédé de la même façon pour mesurer l'expression des récepteurs D2, D3 et mGluR5. Résultats: le groupe des animaux traités par l'halopéridol montre une plus forte expression des récepteurs D3 par rapport aux sujets des autres groupes. Cette expression se produit au niveau des neurones de la voie directe. De plus, cette augmentation corrèle positivement avec la sévérité des DT. L'expression des récepteurs D2 et mGluR5 reste relativement inchangée entre les différents groupes, alors qu'un gradient d'expression a été observé pour le récepteur D1. Par ailleurs, Nur77 est induit par l'halopéridol, alors que son expression semble baisser chez les animaux traités par la clozapine. L'induction de l'expression de Nur77 par l'halopéridol est plus accrue chez les animaux non dyskinétiques. Les animaux traités par la clozapine démontrent une expression amoindrie de l'ARNm de Nur77 qui tend à être plus faible que l'expression de base. D'autre part, la présence du polymorphisme au niveau de la région 3'UTR semble affecter l'expression cellulaire de Nur77. Conclusion: ces résultats confortent notre hypothèse concernant l'existence d'un phénomène d'hypersensibilisation prenant place suite un traitement chronique par les antipsychotiques. Ce phénomène s'est traduit par une augmentation de l'expression des récepteurs D3 sans porter sur les récepteurs D2 tel que prôné classiquement. Cette hypersensibilisation des récepteurs D3 implique également l'existence d'un déséquilibre des voies striatales pouvant ainsi sous tendre l'apparition des DT. Ces résultats dévoilent ainsi un nouveau mécanisme qui pourrait contribuer à l'apparition des DT et pourraient permettre une meilleure gestion, nous l'espérons, des DT à l'échelle clinique.

Mots clés: dyskinésies tardives, antipsychotiques, halopéridol, clozapine, récepteurs dopaminergiques, récepteurs D3, Nur77, ganglions de la base, hybridation in situ, autoradiographie.

Abstract

Tardive dyskinesia (TD) is a potentially disabling and irreversible motor complication including all persistent, abnormal, involuntary movements, classically caused by the chronic therapy with typical antipsychotic drugs (haloperidol, fluphenazine). Atypical antipsychotic drugs like clozapine have been introduced because they showed little potential to induce TD, raising the hope to completely eradicate this complication. However, it has been later shown that these drugs have several serious metabolic side-effects and that some atypical molecules are as responsible as typical drugs for inducing TD. Besides, the typical drugs are still widely prescribed in a large spectrum of disorders. For all these reasons, TD still constitutes a major challenge for psychotic disorders treatments especially that the pathophysiology of TD remains elusive and therapeutics are difficult. Based on rodent experiments, it was proposed that dopamine D₂ receptor hypersensitivity could be responsible for TD. However, this hypothesis lacks strong support in humans. We suggest, in this thesis, that TD is associated with the hypersensitivity of other receptors, than D₂. To investigate the neurochemical basis of TD, we chronically exposed 23 adult capuchin monkeys to haloperidol (median 18.5 months, N=11) or clozapine (median 6 months, N=6). Six unmedicated animals were used as controls. Five haloperidol-treated animals developed mild TD movements, and no TD was observed in the clozapine group. Using receptor autoradiography, we measured dopamine D₁, D₂, D₃ and mGluR5 receptor levels. We also examined the D₃ receptor/preprotachykinin mRNA co-expression, and quantified enkephalin and Nur77 mRNA levels, in striatal sections. Unlike clozapine, haloperidol strongly induced dopamine D₃ receptor binding sites in the anterior striatum, particularly in TD animals, and binding levels positively correlated with TD intensity. In contrast, D₂ receptor binding was comparable to controls, and dopamine D₁ receptor binding reduced in the anterior (haloperidol and clozapine) and posterior (clozapine) putamen. Preprotachykinin mRNA-labeled cell count was unaffected by either haloperidol or clozapine, enkephalin mRNA widely increased in all animals, but to a greater extent in TD-free animals. Nur77 mRNA levels in the caudate-putamen were strongly up regulated

in animals exposed to haloperidol but were spared following clozapine treatment. Interestingly, within the haloperidol-treated group, TD-free animals showed higher Nur77 expression in putamen sub territories compared with dyskinetic animals. These results corroborate our hypersensitivity hypothesis, and indicate that an imbalance between the striatal pathways could contribute to the pathophysiology of TD.

Keywords: tardive dyskinesia, antipsychotic drugs, haloperidol, clozapine, dopamine receptors, basal ganglia, Nur77, D3 receptors, monkey, autoradiography, *in situ* hybridization

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iv
Liste des Figures.....	ix
Liste des tableaux	x
Liste des abréviations	xi
Remerciements.....	xv
Chapitre I: Anatomie et organisation fonctionnelle des ganglions de la base.....	1
Chapitre II: La dopamine.....	10
1. Caractéristiques générales	10
2. Les récepteurs dopaminergiques: génétique, distribution, biochimie et fonctions.....	14
2.1 Les récepteurs de type D1.....	14
2.2 Les récepteurs de type D2.....	17
3. La DA dans le striatum.....	24
Chapitre III: Le glutamate	27
1. Caractéristiques générales	27
2. Plasticité synaptique	31
Chapitre IV: La schizophrénie	35
1. Caractéristiques générales	35
2. L'hypothèse dopaminergique de la schizophrénie.....	38
3. Hypothèse neuro-développementale	40
4. Hypothèse glutamatergique de la schizophrénie.....	41
5. Les antipsychotiques	46
5.1. L'histoire des antipsychotiques.....	46
5.2. Les antipsychotiques typiques (APT).....	50
5.3. Les antipsychotiques atypiques (APA).....	52
5.4. Pharmacodynamie des médicaments antipsychotiques	56
5.5. Quoi de typique pour un antipsychotique atypique ?.....	57
5.6. Les mécanismes post-récepteurs	62
5.7. La supériorité des antipsychotiques atypiques: réalité ou illusion	67

Chapitre V: Les dyskinésies tardives	68
1. Description	68
2. Les modèles animaux de la dyskinésie tardive.....	72
3. Les hypothèses avancées	75
3.1. L'hypersensibilité des récepteurs dopaminergiques:.....	75
3.2. L'hypothèse GABAergique.....	77
3.3. La dégénérescence des neurones du striatum causée par l'excitotoxicité et le stress oxydatif	78
3.4. L'hypothèse génétique	78
3.5. Hypothèse sérotoninergique.....	79
3.6. Autres hypothèses.....	80
Chapitre VII: Les récepteurs nucléaires Nurs.....	82
1. Les Nurs et les RXR	82
2. Nur77 dans sa relation avec le système dopaminergique.....	86
3. Nur77 dans sa relation avec la schizophrénie	88
4. Nur77 dans sa relation avec les antipsychotiques	88
Chapitre VIII: hypothèse et objectifs généraux et spécifiques de la thèse	91
Chapitre IX: Haloperidol-induced striatal <i>Nur77</i> expression in a non-human primate model of tardive dyskinesia	93
1. Contribution du candidat	93
2. Article# 1: Haloperidol-induced striatal <i>Nur77</i> expression in a non-human primate model of tardive dyskinesia	94
Chapitre X: Upregulation of dopamine D3 receptors, not D2, correlates with tardive dyskinesia in a non-human primate model	124
1. Contribution du candidat	124
2. Article# 2 : Upregulation of dopamine D3 receptors, not D2, correlates with tardive dyskinesia in a non-human primate model.....	125
Chapitre XI: <i>Nur77</i> mRNA levels and L-Dopa-induced dyskinesias in MPTP monkeys treated with docosahexaenoic acid.....	164
1. Contribution du candidat	164
2. Article#3: <i>Nur77</i> mRNA levels and L-Dopa-induced dyskinesias in MPTP monkeys treated with docosahexaenoic acid.....	165
Chapitre XII: Autres études non publiées	198

1. Autoradiographie des récepteurs mGluR5.....	198
2. Étude de l'expression des protéines kinases ERK par Western Blot	198
3. Étude de l'effet du polymorphisme 3'UTR sur la stabilité de l'ARNm de Nur77	199
3.1 Mutagénèse dirigée	200
3.2 Mini et Midi-préparation	200
3.3 Transfection cellulaire.....	200
4. Résultats obtenus des études non publiées:.....	201
4.1. Autoradiographie des récepteurs mGluR5:.....	201
4.2. Western Blot des kinases ERK1/2 et p-ERK	201
4.3. Étude de l'impact du SNP localisé dans la région 3'-UTR Nur77	201
Chapitre XIII: Discussion générale et perspectives	208
Conclusion	241
Annexe I.....	243
Bibliographie.....	245

Liste des Figures

Figure 1: Représentation des ganglions de la base dans le cerveau humain.....	3
Figure 2: Striatum antérieur et postérieur chez le singe	5
Figure 3: Principaux circuits des ganglions de la base	7
Figure 4: Signalisation des récepteurs dopaminergiques.....	23
Figure 5: Mécanismes cellulaires impliquant Nur77 en périphérie.....	84
Figure 6: Autoradiographie mGluR5 utilisant le ligand [3H] ABP688	203
Figure 7: Échantillonnage de cerveaux pour la technique de western blot.....	204
Figure 8: Modulation de l'expression de phospho-ERK 1/2 par les antipsychotiques dans le putamen.....	205
Figure 9: Etude de l'impact fonctionnel du SNP exprimé sur la région 3'UTR de Nur77	206
Figure 10: Modifications fonctionnelles des ganglions de la base dans le cas de la maladie de Parkinson et les dyskinésies induites par la L-Dopa	228

Liste des tableaux

Tableau 1: Antipsychotiques typiques disponibles au Canada.....	49
Tableau 2: Antipsychotiques atypiques disponibles au Canada.....	54
Tableau 3: Différentes affinités des AP à différentes classes de récepteurs.	61
Tableau 4: Cascades signalétiques modulées par un traitement aigu à base de traitement antipsychotique.....	65
Tableau 5: cascades signalétiques modulées par un traitement chronique à base d'antipsychotiques.	66
Tableau 6: Tableau comparatif des modifications biochimiques observées dans le striatum dans le cas des dyskinésies tardives ou des dyskinésies induites par la L-dopa chez les primates.	237
Tableau 7: Tableau comparatif des changements de l'expression des neuropeptides et Nur77 observées dans le striatum dans le cas des dyskinésies tardives ou des dyskinésies induites par la L-dopa chez les primates.....	238

Liste des abréviations

5-HT: Sérotonine

7-OH-PIPAT: *R*-(1)-*Trans*-7-hydroxy-2-(*N*-*n*-propyl-*N*-39-iodo-29-propenyl) aminotetralin

7-OH-DPAT: 7-hydroxy-*n*, *n*-dipropylaminotetralin

8-OH-DPAT: 8-Hydroxy-*n*, *n*-dipropyl-2-aminotetralin

AC: Adénylate cyclase

ADN: Acide désoxyribonucléique

Akt: Protéine kinase B

AMPc: Adénosine monophosphate cyclique

AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor

AP: Antipsychotique(s)

APT: Antipsychotique(s) typique(s)

APA: Antipsychotique(s) atypique(s)

ARN: Acide ribonucléique

CaMKII: Calcium/Calmodulin-dependent kinase II, Protéine kinases Ca^{2+} /calmoduline-dépendante

CB1: Cannabinoid receptor type 1, récepteur des Cannabinoïdes type 1

CC: Cortex cingulaire

CLZ: Clozapine

COMT: Catechol-O-methyltransferase

CPF: Cortex préfrontal

CR: Calrétinine

CRE: cAMP response element, élément de réponse à l'AMPc

CREB: Cyclic AMP response element-binding protein, protéine se fixant au CRE

DA: Dopamine

DAG: Diacyl glycérol

DARPP-32: Dopamine and cyclic AMP-regulated phosphoprotein, 32kDa

DAT: Transporteur actif de la dopamine

DHA: Acide docosahexaénoïque
DOPAC: 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid, acide 3,4-dihydroxyphénylacétique
DT: Dyskinésie(s) tardive(s)
DYN: Dynorphine
ENK: Enképhaline
EPS: extrapyramidal side effects, effets extrapyramidaux
ERK: Extracellular signal-regulated kinases
FT: Facteur de transcription
GABA: Acide γ -aminobutyrique
GB: ganglions de la base
GPCR: G-protein coupled receptors, Récepteur couplé aux protéines G
GPe: Globus pallidus externe
GPI: Globus pallidus interne
GSK-3: Kinase de glycogène synthétase – 3
HAL: Halopéridol
HVA: Acide homovallinique
IEG: Immediate early gene, gene d'induction précoce
iGlu: récepteurs ionotropes du glutamate
IP3: Inositol triphosphate
LBD: Ligand binding domain, domaine liant le ligand
L-DOPA: Lévo-Dihydroxyphénylalanine
LTD: Dépression à long-terme
LTP: Potentialisation à long-terme
LID: Dyskinésies induites à la L-Dopa
M1: Primary motor cortex, cortex moteur primaire
MAO: Monoamine oxydase
MAP: Mitogen-activated protein kinases
MH: Maladie de Huntington
mGluR: Récepteur(s) métabotrope(s) du glutamate
miARN: microARN

MP: Maladie de Parkinson

MPTP: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

MSK1: Mitogen and stress-activated kinases 1

MSN: Neurones épineux moyen (Medium Spiny Neurons)

NAC: Noyau Accumbens

NBRE: NGFI-B responsive element

NE: Norépinerphrine

NGFI-B: Nerve growth factor inducible gene B

NMDA: N-méthyl-D-Aspartate receptors(s)

NL: Neuroleptique(s)

NST: Noyau sous-thalamique

NT: Neurotransmetteur(s)

PCP: Phencyclidine

PKA: Protéine kinase A

PKC: Protéine kinsase C

PLC: Phopholipase C

POMC: Pro-opiomélanocortine

PP1: Protéine Phosphatase 1

PV: Parvalbumine

RA: Acide rétinoïque

RAR: Retinoic Acid Receptor

R-D: (1, 2, 3, 4 ou 5): récepteur(s) dopaminergique(s) (1,2, 3, 4 ou 5)

RN: Récepteur(s) nucléaire(s)

RGS2: Regulator of G-protein signaling 2

RXR: Récepteur(s) X des rétinoïdes

SNC: Substance noire compacte

SNC: Substance noire compacta

SNP: Single Nucleotide Polymorphisme

SNr: Substance noire réticulée (reticulata)

STEP: Striatal-enriched tyrosin phosphatase

TH: Tyrosine hydroxylase

VCM: Vacuous chewing movements

VEH: Véhicule

VMAT1: Vesicular monoamine transporter-1

VMAT2 : Vesicular monoamine transporter-2

VTA: Aire tegmentaire ventrale

Remerciements

À mon directeur de recherche (Pr. Daniel Lévesque): pour les six années passées dans ton laboratoire, pour la grande dimension humaine en toi, pour ton soutien et ta disponibilité, pour tes encouragements et aussi pour tes critiques constructives; veuille trouver ici l'expression de mon profond respect et ma gratitude.

À mon co-directeur de recherche (Dr Pierre Blanchet): vous m'avez faite l'honneur en acceptant de codiriger mon travail. Je vous remercie infiniment pour votre bienveillance et votre rigueur.

À mes collègues du labo Lévesque (Jérôme, David, Xavier, Emmanuelle...), une mention spéciale à David Voyer pour toute l'aide que tu m'as apportée dans les périodes les plus difficiles, et tous les moments partagés au labo. Je tiens également à remercier de tout mon cœur Jérôme Maheux, la première personne qui m'a accueillie lors de mon arrivée au labo. Merci pour les discussions scientifiques, pour ton savoir-faire et ton esprit d'équipe. Je remercie également Xavier Giner qui a effectué une expérience dans le cadre de cette étude.

Au laboratoire du Pr. Michel Cyr à Trois-Rivières: une mention spéciale au Pr. Michel Cyr et à Laure Chagniel, qui m'ont accueillie pendant trois mois et m'ont appris la technique de Western Blot. Merci pour votre gentillesse extrême. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance.

À mon mari: merci pour tout ce qu'on a construit ensemble, merci pour ton soutien et ta confiance.

À ma fille Jena: tu es le rayon de soleil qui illumine ma vie, pardonne-moi pour tous les moments où j'ai passé ma carrière avant toi, tout mon souhait est que tu sois fière de ta maman.

À mes parents: Je reconnais que vous êtes la vraie raison derrière tout ce que j'ai accompli. Papa, les valeurs que tu m'as inculquées ont fait de moi ce que je suis, Maman: je ne sais pas ce que je serai sans tes prières qui me guident et me protègent. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude infinie, **À mes sœurs et mon frère:** merci pour ce que vous êtes.

À mes amies (Salma, Kahina et Hajer), À toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail: Merci infiniment

Avant-propos

Cette thèse se veut une étude descriptive globale d'un effet indésirable d'une classe de médicament, à savoir les dyskinésies tardives (DT) induites par certains médicaments, les antipsychotiques principalement. Ce phénomène s'inscrit dans une vision globale du rôle de la dopamine (DA) dans le mouvement et le contrôle qu'elle peut exercer sur les ganglions de la base. Pour ce, je commence cette thèse par une introduction générale où je présente les ganglions de la base. L'homéostasie fonctionnelle de ces structures est dictée par un balancement entre différents neurotransmetteurs. Parmi ces derniers, j'ai privilégié la DA et le glutamate pour leur importance physiologique. Il s'en suit une description de la schizophrénie, comme désordre psychotique majeure où la DA et le glutamate semblent intervenir. La médication de la schizophrénie étant un monopole des antipsychotiques (AP) dont nous étalons les mécanismes d'action. Ceci nous conduit à l'introduction des dyskinésies tardives, ligne de force de cet ouvrage. Nous achevons notre introduction par notre propre hypothèse qui tente d'expliquer l'apparition de ces dyskinésies. Plus loin, nous entamons la partie technique de la thèse. Nous avons travaillé sur une banque de cerveau issue d'une grande cohorte de singes. Les analyses comportementales ont été effectuées par mon co-directeur le neurologue Dr. Pierre Blanchet. Les travaux relatifs à cette thèse ont réellement démarré avec l'analyse des cerveaux. Sur ces tissus, j'ai essayé de cerner les acteurs qu'on pense être impliqués dans la physiopathologie des DT. Je présente ces travaux sous forme d'articles: le premier article présenté dans cet ouvrage a déjà été publié. Le deuxième est un article en préparation. Le troisième article, également publié, s'attarde sur un autre type de dyskinésies afin de chercher des points communs avec les DT. Nous clôturons la thèse avec une discussion. Des perspectives pour le travail seront également proposées.

Note: au début de chaque article, le lecteur trouve des vieilles citations pionnières relatives au sujet de la thèse. Ces citations m'ont spécialement marquée par leur avant-

gardisme et leur véracité. Je trouve fascinant le progrès qui a été fait dans les deux siècles derniers malgré que seulement des moyens rudimentaires fussent disponibles.

Chapitre I: Anatomie et organisation fonctionnelle des ganglions de la base.

“The basal ganglia have all the clarity of a dark basement” Kinnear-Wilson, 1920

Les ganglions de la base (GB) sont un ensemble de noyaux gris hautement interconnectés et situés sous le cortex [1]. Ils représentent les plus grandes structures sous corticales du cerveau et sont de cinq types: Le striatum, le noyau accumbens (NAc), la substance noire (SN), le globus pallidus (GP), et le noyau sous thalamique (NST) [2] (figure 1 et 2). Au cours de l'évolution, ces structures ont connu des modifications majeures, qui ont fait, par exemple, que le système des GB chez les primates présente plusieurs points de différence par rapport à celui des rongeurs. Vue la nature du modèle animal utilisé dans cette thèse nous focalisons sur les GB des primates. Nous soulignons, toutefois, les différences avec les autres espèces s'il y a lieu.

Chez les primates les GB peuvent être identifiés en axes: striatal, pallidal, nigral et thalamique (figure 1 et 2) [3, 4]. L'axe striatal est représenté par quatre segments. Les deux premiers étant les deux parties du striatum qui prennent origine par sa subdivision par la capsule interne. Il s'agit du noyau caudé positionné en médiale et le putamen en latéral [5]. Les deux autres régions constituant le système striatal sont les deux parties constituant le noyau NAc, à savoir le core et le shell [5]. L'axe pallidal est représenté par les deux segments du globus pallidus: le globus pallidus externe (GPe) et globus pallidus interne (GPi) [5]. Le troisième axe des GB est l'axe nigral dans lequel figurent, la substance noire (SN) avec ses deux régions: SN pars compacta (SNc) et la SN reticulata (SNr), mais aussi l'aire tegmentaire ventrale (VTA). Finalement l'axe thalamique est représenté par le NST [4, 6].

Classiquement, les GB étaient et demeurent associés au système extrapyramidal moteur [3]. Les études menées sur ces structures étaient historiquement faites en parallèle avec les débuts de travaux décortiquant la maladie de Parkinson (MP)[7]. Grâce à ces études, il devient universellement accepté que les troubles moteurs caractérisant la MP sont directement corrélés à la perte des neurones dopaminergiques de la SN qui

projetent au striatum [1]. Outre la MP, il a été démontré que les mouvements choréiques spécifiques de la maladie de Huntington (MH) résultent de la dégénérescence des neurones du striatum [4]. Ces évidences cliniques ont permis d'attribuer aux GB un rôle majeur dans les fonctions motrices. D'autre part, et en dehors du rôle moteur, l'avancée des techniques d'imagerie médicale et des techniques de biologie a permis de conclure à des changements d'activité qui prennent place dans les GB au cours des désordres psychotiques. En prime, ces techniques ont démontré qu'il y a des changements qui se produisent au niveau des GB lors des phénomènes d'apprentissage et de mémoire [8].

Toutes ces preuves permettent de présenter les GB comme des structures intégratives qui orchestrent l'exécution de plusieurs fonctions cérébrales, notamment la planification des mouvements, la cognition, l'apprentissage et la mémoire [9]. Les GB peuvent exercer ce rôle harmonisateur et coordinateur de par leur localisation anatomique profonde occupant le centre du cerveau, mais surtout de par les afférences neuronales qui convergent au niveau de ces structures [1, 4, 10]. Pour simplifier, les GB peuvent être schématisés comme une unité de traitement de l'information qui présente une voie d'entrée: le striatum et une voie de sortie: le GPi/SN (Figure 3). Les GB reçoivent des afférences corticales glutamatergiques, des afférences thalamiques glutamatergiques également, et des afférences dopaminergiques en provenance de la SN/VTA [1, 4, 7]. D'autre part, plusieurs efférences partent des noyaux des GB et font relais au sein des autres structures des GB ou dans d'autres structures cérébrales (noyau colliculus supérieur...) [1, 4, 7].

Pour décrire l'organisation fonctionnelle des projections corticales afférentes aux GB deux modes d'organisation ont été proposés. Le modèle le plus classique décrit une organisation topographique des projections qui reproduit l'organisation des aires corticales [11]. En ce sens, les aires motrices du cortex (cortex moteur) projetent au striatum dorsolatéral (toutes les régions dorsolatérales du putamen et le rebord dorsolatéral de la partie haute du noyau caudé). Le cortex dorsal préfrontal (CPF) projette lui au striatum central ou intermédiaire. Et finalement, le striatum ventromédian est plutôt la cible des afférences issues de CPF ventromédian, du CPF

orbital et du cortex cingulaire dorsomédian [11]. Cette organisation topographique ou parallèle a permis d'envisager une division en territoires fonctionnels des GB [10, 11].

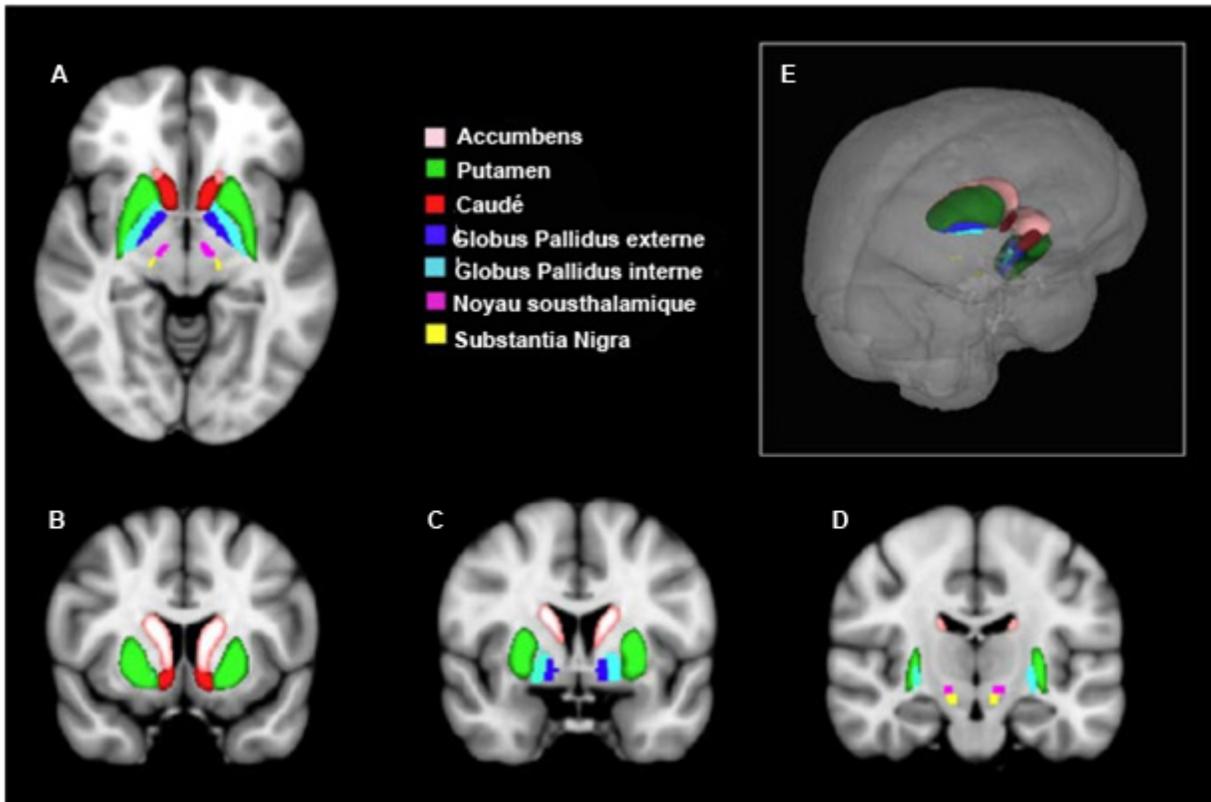


Figure 1: Représentation des ganglions de la base dans le cerveau humain

A: section horizontale, B-D: sections coronales, E: représentation 3D des ganglions de la base dans le cerveau humain. Image tirée et adaptée de Borsook et al; 2010 [12].

Ainsi, les fonctions d'un noyau des GB sont dictées par les fonctions associées aux aires corticales impliquées. En ce sens, le striatum dorsolatéral serait plutôt moteur, et joue un

rôle dans l'exécution des fonctions motrices. Le striatum central est associatif (somatosensoriel) [10]. Le striatum ventral (NAc, régions ventrales du caudé et du putamen...) est par contre doté d'une innervation limbique justifiant son association aux phénomènes de motivation, et de récompense [13]. À ce modèle parallèle classique s'oppose un modèle plus moderne qui envisage l'existence de circuits intégratifs. Dans ce modèle une région particulière reçoit l'input de plusieurs régions corticales et projette en retour à différentes régions [11]. La complexité de ce deuxième modèle est probablement le reflet le plus fidèle de la complexité des noyaux des GB. Cependant, les circuits intégratifs semblent coexister avec les circuits parallèles sans les exclure [14]. L'adoption du modèle intégratif n'empêche pas ainsi de reconnaître qu'il existe une dominance fonctionnelle pour chaque région (le striatum dorsolatéral sera toujours associé à un aspect moteur alors que le striatum ventral est avant tout limbique)[14].

De par leurs projections, les noyaux des GB orchestrent une pléthore de fonctions. Toutefois, parmi tous ces noyaux, le striatum (nous désignons ici par striatum l'ensemble caudé, putamen et NAc) occupe une place particulière [4, 10, 14]. En effet, le striatum représente la structure la plus volumineuse des GB et reçoit la majorité des projections corticales, thalamiques, et nigrales afférentes aux GB [4, 10, 14]. Cependant, le striatum fait figure d'une hétérogénéité élevée aussi bien au niveau cellulaire que fonctionnel [15].

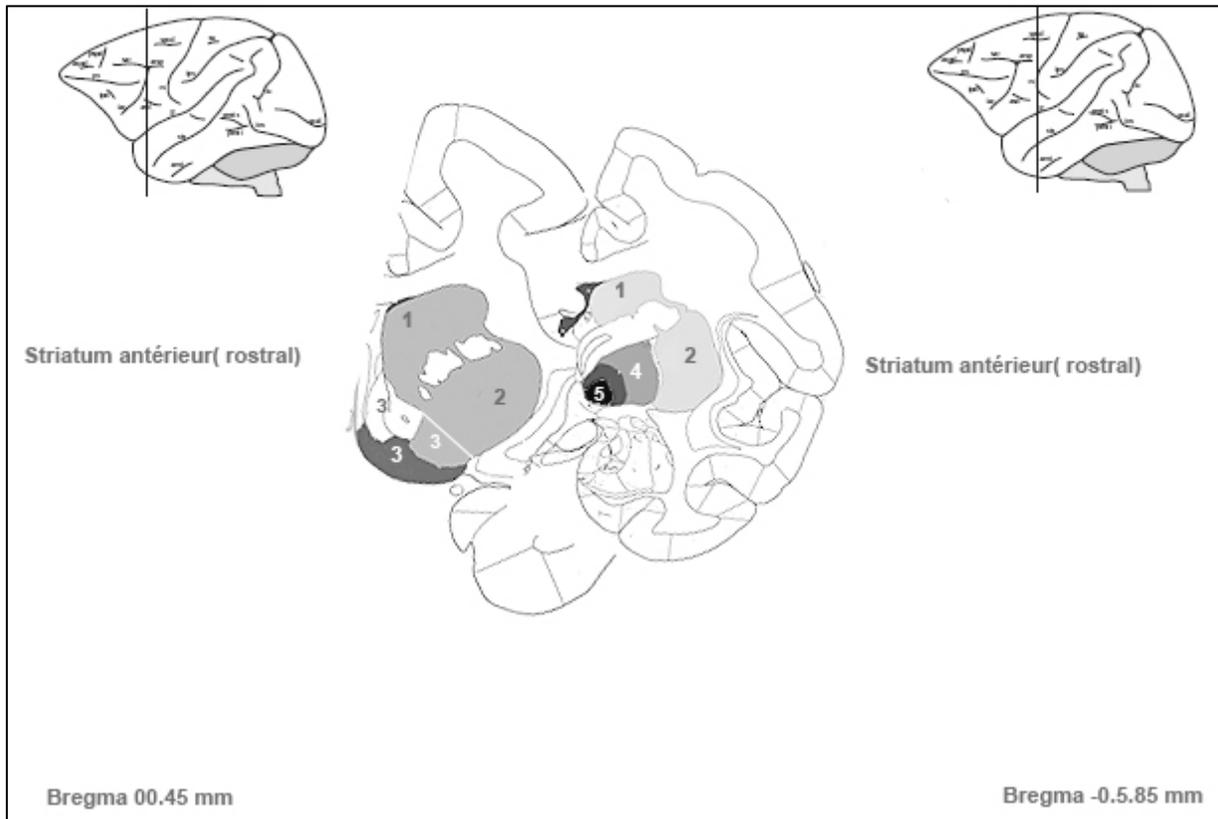


Figure 2: Striatum antérieur et postérieur chez le singe

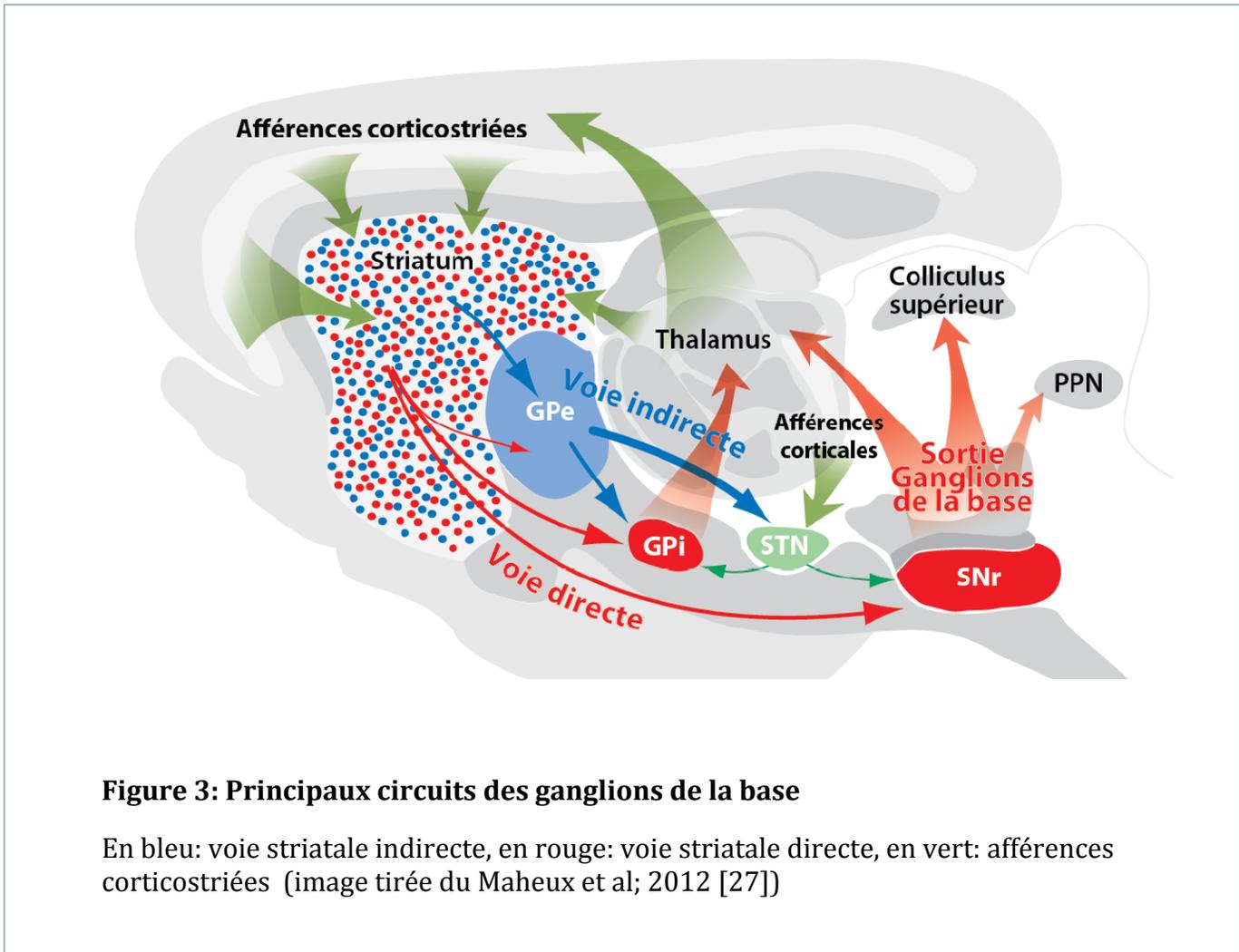
1 : Noyau Caudé; 2 : Putamen; 3 : Noyau Accumbens; 4 : Globus Pallidus externe; 5 : Globus Pallidus interne (figure inspirée du Paxinos, 2009 [16])

Les populations neuronales peuplant le striatum sont de deux catégories: les neurones de projection et les interneurons [15]. Nous commençons par les neurones minoritaires, à savoir les interneurons. Les interneurons se déclinent eux-mêmes en deux sous classes. Il s'agit premièrement de neurones GABAergiques (exprimant le neurotransmetteur GABA) de taille moyenne et deuxièmement de neurones cholinergiques géants [17]. Ensemble, ces interneurons ne comptent que pour $\approx 5\%$ des cellules striatales [15]. Les interneurons GABAergiques sont des interneurons de taille

moyenne classés en trois groupes [18]: Les neurones exprimant la parvalbumine [19], les neurones exprimant la somatostatine, le neuropeptide Y et la synthase de l'oxyde nitrique la NADPH-d [20], et finalement les neurones exprimant la calrétinine [21]. Les interneurones cholinergiques sont des neurones de plus grande taille dépourvus d'épines qui présentent des propriétés électrophysiologiques distinctes [17, 22]. Les interneurones agissent comme un compartiment striatal indépendant qui reçoit des projections corticales et thalamiques mais dont les projections efférentes se font directement à l'intérieur des GB. Ceci permet à ces interneurones d'exercer un rôle de modulation sur les autres cellules du striatum [23]. Les autres cellules du striatum étant les neurones de projection. Ces derniers neurones sont des neurones de taille moyenne caractérisés par la morphologie en épine de leurs dendrites [15]. Pour ces propriétés ces neurones ont porté le nom de neurones épineux moyens ou MSN pour medium spiny neurons. Ils représentent $\approx 95\%$ des neurones du striatum, et sont tous des neurones GABAergiques [15].

Les MSN se distinguent également par un profil électrique typique. Dans ces neurones, et en état de « repos » le potentiel membranaire d'équilibre est maintenu à -90 mV [24]. Cette valeur inférieure à celle de la majorité des autres cellules nerveuses est due en grande partie à l'abondance de canaux potassiques à rectification retardée [24]. Ce potentiel maintient les MSN dans un état où la probabilité de décharge est nulle. Cet état est appelé « *down state* » [24]. Par ailleurs, les changements électriques évoqués en réponse à des inputs excitateurs dépendent de l'intensité de ces derniers. Si l'excitation glutamatergique afférente est faible et ne concerne qu'un nombre limité de neurones, une petite augmentation du potentiel de repos sera observée. Cependant, cette augmentation serait incapable d'engendrer un événement électrique ou cellulaire, et les courants potassiques prennent le dessus [24]. Par opposition, si l'input glutamatergique est assez intense et porte sur plusieurs neurones, les canaux potassiques se ferment [25] et la réponse excitatrice conquiert les MSN. Ces derniers vont répondre par un potentiel somatodendritique qui s'approche du seuil de décharge (-60 à -40 mV). On parle d'un état « intermédiaire » qui est dénommé « *up state* ». L'état de « *up state* » est permissif

d'une décharge neuronale quand plusieurs signaux glutamatergiques se concordent [24, 26].



En dehors de ces propriétés électrophysiologiques communes (il existe néanmoins quelques petites différences relatives à la probabilité de décharge [28]), les MSN ne constituent pas un groupe homogène de cellules. En effet, en fonction de leurs

projections et de leurs profils biochimiques (marqueurs exprimés) on distingue deux grandes sous-populations de MSN (voir figure 3). La première sous population rassemble les MSN striatonigraux. Il s'agit de MSN qui expriment les récepteurs D1 (R-D1), et le neuropeptide dynorphine (DYN) et le neuropeptide: substance P [29, 30]. Ces neurones partent du striatum pour projeter directement au niveau du GPi et SNc. Accessoirement quelques collatérales de ces MSN feront relais au niveau du GPe (figure 3). Ce circuit a été identifié comme la voie directe ou voie striatonigrale [1, 7]. La deuxième population des MSN est représentée par l'ensemble de neurones striatopallidaux. Il s'agit de neurones qui expriment les récepteurs dopaminergiques D2 (R-D2), le neuropeptide opioïde enképhaline [29, 30]. Ces neurones innervent massivement le GPe qui projette à son tour vers le NST. Ce dernier boucle le circuit en projetant au GPi et à la SNr (figure 3). Ce circuit a été identifié comme la voie striatopallidale ou voie indirecte [31].

Cette ségrégation anatomique quasi-parfaite des MSN a soulevé plusieurs questions sur les modalités de traitement de l'information qui parvient au striatum. Au début des années quatre-vingt-dix Albin, Young et Penny [7] ont proposé un modèle où la voie directe facilite le mouvement alors que la voie indirecte le freine [7]. Ce modèle s'inspire principalement des maladies neurodégénératives où sont impliqués les GB. Le modèle proposé a fournis une explication rationnelle permettant de comprendre les mouvements hypokinétiques (comme dans le cas de la MP) et hyperkinétiques (comme dans la MH). Ainsi, la baisse de la motricité dans la MP serait associée à une hyperactivité de la voie indirecte alors que la surexcitation de la voie directe conduit à l'hyperactivité motrice (voir figure 3 et 9).

Des données anatomiques et biochimiques ont toutefois remis ce modèle en question [32-34]. D'un point de vue anatomique, le modèle de DeLong [7] s'articule autour de l'existence de projections monosynaptiques. En antithèse à ce principe de séparation des deux voies, le groupe d'A. Parent a mis en évidence, dans une série d'études de neuroanatomie (voir entre autres [2, 35, 36]), que les axones striatales font figure d'un haut degré de ramification. Les collatérales d'un seul axone striatal peuvent interagir au même temps avec deux voire trois structures des GB [35]. De point de vue biochimique, il a été démontré l'existence de neurones qui co-expriment les R-D1 et R-

D2. En effet, $\approx 1-5\%$ des MSN vont co-exprimer les R-D1 et R-D2 au même temps [37](notons que la proportion des neurones co-exprimant les deux récepteurs a changé au cours des années avec le perfectionnement des outils utilisés). D'autre part, l'influence que peut exercer la DA sur les deux voies rend plus difficile l'interprétation du modèle d'Albin et collègues. Pour conclure, toutes ces données rendent-compte d'une complexité supérieure à celle proposé dans le modèle « classique ». Néanmoins, ce modèle reste toujours en vigueur surtout pour faciliter la compréhension des GB [38]. Une interprétation plus moderne propose que l'exécution d'un mouvement passe par l'antagonisme des deux voies directe et indirecte permettant la sélection du mouvement à effectuer et éliminant les mouvements en discordance [39].

Par ailleurs, la myriade de cellules que représente le striatum est la scène de jeu de plusieurs neurotransmetteurs (NT), neuropeptides et autres protéines régulatrices. Ces différents acteurs entretiennent des relations complexes qui leur permettent de moduler les fonctions du striatum. Parmi ces acteurs, on cite le glutamate, la DA, le GABA, l'acétylcholine, la sérotonine (5HT), l'adénosine, DARPP-32....

Deux NT suscitent notre intérêt dans le cadre de cet ouvrage. Pour ce, nous consacrerons les deux chapitres suivant à l'étude de deux NT hautement importants pour le striatum, à savoir la DA et le glutamate.

Chapitre II: La dopamine

“The present level of technical expertise is not sufficient to demonstrate unequivocally that all chemicals thought to be neurotransmitters in the brain are neurotransmitters [...] How well do norepinephrin and dopamine satisfy the criteria for brain neurotransmitters”
Association of Alumni and Alumnae of the Massachusetts Institute of Technology, 1899

1. Caractéristiques générales

La DA est une monoamine appartenant à la classe des catécholamines [40]. Elle a été synthétisée pour la première fois en 1910. A l’aube de sa découverte, la DA a été considérée comme un simple précurseur de la noradrénaline dans le corps [41]. Vers la fin des années 1950, Avid Carlsson et ses collègues ont pu démontrer que la réserpine causait une déplétion en DA dans le cerveau, tout comme pour la 5HT [42, 43]. Ce ci a motivé l’étude de la concentration de la DA dans le cerveau qui a conclu à la présence de la DA à des concentrations comparables à celles des autres neurotransmetteurs connus à l’époque [42]. Plus loin, la même équipe a élucidé l’absence de la DA chez les parkinsoniens. L’histoire de la DA a pris une tournure importante après ces travaux et fut reconnue désormais comme un composant normal du cerveau qui agit en tant que neurotransmetteur à part entière [42-44].

Dans le cerveau la DA est synthétisée par deux types de neurones: les neurones de l’émittance médiane du noyau arqué de l’hypothalamus et les neurones du mésencéphale. Alors que le premier type de neurones assure le rôle neuroendocrinien de la DA, le deuxième type est responsable du rôle de neurotransmetteur que joue la DA. Dans le cadre de cette thèse, seule la DA agissant à titre de neurotransmetteur sera étudiée. La DA est synthétisée à partir de la L-tyrosine par les terminaisons nerveuses dopaminergiques [45]. Cette synthèse se fait en deux étapes. La première étape assure

l'oxydation de la L-tyrosine en Levo-Dopa (L-Dopa). Cette étape fait appel à la tyrosine hydroxylase (TH), enzyme clé qui contribue à contrôler les taux de DA dans le cerveau [45, 46]. En deuxième lieu la dopa décarboxylase assure la formation de DA à partir de la L-Dopa [45]. Ainsi synthétisée, la DA est emmagasinée dans les vésicules synaptiques, auxquelles elle parvient grâce au transporteur vésiculaire des monoamines de type 2 (VMAT2) [47]. Suite à un signal approprié, la DA sera libérée à partir de son lieu de stockage. Cette libération s'opère selon deux modes, une libération phasique et une autre dite tonique [48]. La libération phasique ou transitoire est la libération de la DA dans la fente synaptique en réponse à un potentiel d'action. Ce mode de libération est mis en jeu quand survient une décharge neuronale en réponse à un stimulus « de pertinence motivationnelle » (salient stimuli) [49]. Il s'agit dans ce cas de décharge neuronale qui code pour une information reliée à la récompense attendue d'un stimulus donné [49]. Contrairement à la libération phasique, la libération tonique est similaire à une activité pacemaker permettant le maintien d'une concentration extrasynaptique de la DA [48, 50].

Sa fonction assurée, la DA doit être éliminée de l'environnement extracellulaire. Pour assurer cette élimination la DA est inactivée soit par recapture soit par dégradation. Le mécanisme de recapture fait appel à un transporteur membranaire spécifique: le DAT (Dopamine Active Transporter) [51]. Le DAT transporte la DA contre le gradient de concentration moyennant la pompe Na^+/K^+ adénosine triphosphate [52]. De son côté, la dégradation métabolique de la DA dépend principalement de deux enzymes: les monoamines oxydase A et B (MAO-A/B) et la catéchol-O-méthyltransférase (COMT) [45]. Les voies menées par ces enzymes s'enchevêtrent pour aboutir à deux principaux métabolites l'acide dihydroxyphénylacétique (DOPAC) et l'acide homovanillique (HVA) [45].

Malgré le nombre relativement restreint des neurones dopaminergiques ($\leq 100\,000$ pour les rongeurs et $\leq 1\,000\,000$ pour les primates et pour les humains [53]); la DA est impliquée dans plusieurs aspects de l'activité neuronale. En effet, la DA joue un rôle dans le fonctionnement de base du cerveau, comme pour l'acquisition de la motricité, la

mémoire active, l'apprentissage... [54, 55]; mais aussi dans la réaction et l'appréhension que développe le système nerveux face au monde externe. Dans ce cadre la DA est associée au système de la récompense et au plaisir que peuvent générer des stimuli visuels auditifs, la nourriture... [56, 57]. La grande panoplie de fonctions qu'assure la DA va en parallèle avec le grand nombre de maladies et de désordres dans lesquels la DA est impliquée. En effet, la DA est un acteur important dans des maladies où domine l'aspect moteur; cas de la maladie de Parkinson et maladie de Huntington. En prime, elle est un pivot dans plusieurs autres désordres ou troubles de nature comportementale: la schizophrénie, déficit d'attention avec hyperactivité, dépendance aux drogues d'abus... [56, 57].

Le rôle que joue la DA est directement conditionné par deux paramètres: les propriétés électrophysiologiques et anatomiques des neurones dopaminergiques puis la nature biochimique de ses récepteurs. Pour commencer, les neurones dopaminergiques disposent d'axones qui possèdent des terminaisons de deux types. Le premier type comprend des terminaisons avec de larges varicosités qui ne présentent pas de complexes de jonctions synaptiques (les jonctions sont qualifiées également de spécialisation postsynaptique) [58]. Le deuxième type est caractérisé par des varicosités plus petites avec des complexes de jonction symétrique, qui réalisent des boutons « en passant » [59]. Pour le premier type, l'absence de jonctions synaptiques; et donc de synapses morphologiquement définies, suggère que la transmission dopaminergique se fait plutôt à distance et requiert l'activation de récepteurs dopaminergiques extrasynaptiques [60]. Cette transmission a été qualifiée de transmission diffuse ou plus connue sous le nom de transmission volumique. Dans le cas de deuxième type, la présence de jonctions synaptiques nous renvoi à la haute spécialisation caractérisant une synapse et à une transmission chimique plutôt ponctuelle, brève dans le temps. Une telle transmission synaptique permet un contrôle étroit sur les concentrations de DA dans la fente synaptique [61]. La question à poser dans ce cas est par rapport à la modalité de ce contrôle sachant que la DA dispose de deux modes de libération.

En théorie, lors de décharges toniques, la DA est libérée en faible quantité. La DA en excès est larguée en dehors de la fente synaptique [48]. Ce qui permet le maintien d'une concentration synaptique constante en DA. Cette DA aurait pour rôle de moduler les fonctions de base du striatum [48]. Par contre, quand survient un potentiel d'action assez fort, la libération phasique serait déclenchée et des quantités élevées de DA seront libérées [49, 56]. On pense que cette DA sert pour la prédiction d'erreurs, donc comme signal de renforcement, et intervient de façon plus générale comme réponse aux stimuli pertinents [49, 56]. Le système de recapture de la DA faisant appel au DAT intervient pour freiner l'augmentation de la concentration de la DA [51]. Néanmoins, la machinerie de la recapture de la DA n'est qu'une partie de tout un système qui inclut également les autorécepteurs dopaminergiques ainsi que d'autres neurotransmetteurs tels que le glutamate, le GABA, et l'acétylcholine, les cannabinoïdes dans l'objectif ultime de réguler l'activité de la synapse dopaminergique [58].

Comparée à d'autres neurotransmetteurs tels que le glutamate ou GABA, l'action neuronale de la DA est considérée comme lente [62]. Quelques millisecondes sont nécessaires pour accomplir cette action comparée aux microsecondes que demande l'action du glutamate (via ses récepteurs ionotropes). Cette action plutôt "lente" serait plus intéressante pour la régulation des effets à long terme. Elle s'explique par la nature des récepteurs sur lesquels agit la DA [62].

La DA est agoniste de cinq types de récepteurs tous de nature métabotrope [63-65]. Les récepteurs de la DA sont des récepteurs transmembranaires heptahélicoïdaux qui se répartissent en deux groupes. Cette classification prend origine des premières études faites dans les années 1970 et qui voyaient un effet différent sur l'adénylate cyclase exercés par différents récepteurs de la DA [66]. Elle s'est affinée avec les années pour prendre compte aussi bien des différences pharmacologiques, génétiques et biochimiques de ces récepteurs que de leurs effets sur le second messager l'AMPC. La classification actuelle reconnaît l'existence de 5 types de récepteurs dopaminergiques répartis en deux groupes [63, 65, 66].

2. Les récepteurs dopaminergiques: génétique, distribution, biochimie et fonctions

2.1 Les récepteurs de type D1

2.1.1. *Génétique, distribution et biochimie*

Ce groupe rassemble les récepteurs D1 (R-D1) et D5 (R-D5). Il s'agit de protéines de 446 et 477 acides aminés (aa) codées par deux gènes différents [63-65]. Ces gènes sont respectivement situés sur les chromosomes 5 et 4 [67]. À la différence des autres récepteurs, les gènes codant pour ces deux récepteurs ne contiennent pas d'introns [67]. Au niveau structurel, les R-D1 et R-D5 présentent une homologie de 80% aux niveaux de leur domaine transmembranaire [63, 68]. Néanmoins, plusieurs différences peuvent être relevées quant à leur localisation et leur fonction. Le R-D1 est surtout présent au niveau du caudé-putamen, du NAc, des tubercules olfactifs, du cortex cérébral et de l'amygdale [63-65]. Une expression plus faible des R-D1 a été également rapportée au niveau de l'hippocampe, du noyau sous-thalamique et du cervelet [69, 70]. L'expression des R-D1 au niveau de la SN est plutôt controversée. En effet, d'une part, il a été démontré que les ARNm de ces récepteurs font défaut au niveau de ce territoire [71, 72]. D'autre part, et paradoxalement, la protéine R-D1 est documentée présente au niveau des aires nigrales [65, 73]. L'expression des R-D5 est, par contre, plus limitée et semble restreinte à l'hippocampe et à quelques noyaux de l'hypothalamus (parafasciculaire...) [74]. Par ailleurs, quelques aires corticales expriment faiblement le R-D5. Il s'agit du PFC, du cortex prémoteur et du cortex cingulaire [74]. Quelques études évoquent également une faible expression au niveau des neurones épineux du NAc et du noyau caudé [69, 70]. Omis les controverses, les R-D1 et les R-D5 semblent être exclusivement postsynaptiques [56, 65].

La liaison du ligand naturel, la DA, ou d'un agoniste artificiel, active les récepteurs de type D1. Cette activation se traduit par une première interaction avec la protéine $G_{\alpha s}$; laquelle se lie à la sous unité catalytique d'une enzyme l'adénylate cyclase: AC [63-65]. L'AC ainsi activée catalyse la conversion d'ATP en AMPc. L'AMPc se lie à la protéine kinase A (PKA) pour désactiver ses sous unités catalytiques et augmenter ainsi son

activité de phosphorylation (figure 4) [63-65]. La PKA dispose de plusieurs substrats, qui phosphorylés vont véhiculer ou amplifier le signal reçu. Ces substrats vont servir d'outils pour véhiculer le signal associé aux cascades signalétiques déclenchées par la stimulation des récepteurs de type D1 de façon ponctuelle [63, 75]. Ils vont servir également de support moléculaire aux changements à long terme inhérents à ces cascades [75]. Parmi ces substrats on trouve des phosphatases, telle que la sous unité 1B de la phosphoprotéine 1 ou DARPP-32 (pour Dopamine-and-cAMP-regulated phosphoprotein-32), des facteurs de transcription tel que le facteur CREB (protéine se liant à l'élément de réponse CRE, ou C-AMP Response Element-Binding Protein), et des canaux ioniques (canaux Na⁺, Ca²⁺ ...) [63, 75]. DARPP-32 est probablement le substrat le plus étudié de la PKA. Son importance réside dans sa capacité à amplifier le signal naissant de la stimulation des récepteurs de type D1 en réalisant une boucle de contrôle positif permettant le maintien de l'activation de la PKA [76]. En effet, DARPP-32 phosphorylée au niveau du site Thr34 par PKA inhibera une autre phosphatase, la PP1, qui déphosphoryle la PKA [77]. Outre que DARPP-32, CREB est un acteur très important dans les cascades signalétiques associées à la stimulation des récepteurs de type D1 [78]. CREB est un facteur de transcription qui est constitutivement lié à l'ADN et qui sera activé par phosphorylation (par la PKA, une fois celle-ci est transloquée au noyau). Après activation, CREB va pouvoir interagir avec les complexes transcriptionnels de plusieurs gènes pour moduler leur expression à la hausse ou à la baisse [79].

Une autre facette de la stimulation des récepteurs de type D1 est la modulation des canaux ioniques [63, 75]. Suite à deux effets immédiats de la stimulation des récepteurs de type D1 ; l'activation de la PKA et l'inhibition de la PP1 plusieurs canaux ioniques se voient phosphorylés [63, 75]. La résultante peut affecter plusieurs canaux. Ainsi on peut noter, suite à l'activation des récepteurs de type D1, une augmentation de courants sodiques, une baisse de l'activité des canaux potassiques, une augmentation des canaux calciques de type-L, une augmentation de l'activité des récepteurs NMDA suite à la phosphorylation de la sous unité NR1, une augmentation des courants générés par l'ouverture des canaux AMPA, ou une modulation des courants GABAergiques [63, 75]. Cependant l'effet sur les canaux ioniques n'est pas en réalité la simple œuvre d'une

activation de la PKA, mais plutôt une sommation de plusieurs mécanismes (déphosphorylation de la PP1 entre autre...) [63, 75].

D'autres cascades signalétiques ont été décrites suite à l'activation des récepteurs de type D1. Il s'agit surtout de la voie des MAP (Mitogen Activated Protein) kinases (ERK, p38 MAPkinase, et c-jun kinase) [63, 64]. Des études présentent l'activation de cette cascade comme une combinaison des effets immédiats de l'activation de la PKA ainsi que d'autres mécanismes. Les récepteurs dopaminergiques peuvent également être couplés à la Gq et peuvent donc réguler la phospholipase C (PLC). L'activation de la PLC conduit à la production d'inositol triphosphate (IP3) et du diacylglycérol. Cette activation conduit à la mobilisation du calcium intracellulaire [80]. Cette voie semble être associée exclusivement aux R-D5 [81].

2.1.2. Fonctions des récepteurs de type D1

Vue la large distribution des récepteurs de type D1, il a été important de déterminer l'ampleur de leurs fonctions. Pour élucider le rôle des récepteurs de type D1, deux approches ont été envisageables: une approche pharmacologique et une autre de génie génétique [63]. L'approche pharmacologique consiste à développer des outils pharmacologiques qui activeront (agonistes, tel que SKF38393) ou qui bloqueront ces récepteurs (antagonistes, tel que SCH23390) [69]. Cependant, malgré les informations que peut apporter l'utilisation de ces outils, l'absence de molécules hautement sélectives faisant la différence entre les deux sous types D1 et D5, et les autres récepteurs dopaminergiques, a limité l'importance de cette approche [82]. L'autre alternative propose de travailler avec des modèles animaux transgéniques où l'expression de ces récepteurs ferait défaut. Nous parlons ici de souris déficientes en R-D1 ou R-D5, ou plus communément les souris knockout (KO). Les souris D1-KO sont viables d'apparence normale et ne présentent pas de déficits neurologiques apparents [83]. Cependant, ces souris se démarquent par un retard de la croissance et un faible taux de survie après le sevrage. La souris D1-KO manifeste une baisse de l'activité locomotrice de base [83]. Les études faites sur ces souris ont conclu à un rôle important des R-D1 dans la motricité

spontanée [64, 82]. Ces études nous apprennent aussi que les R-D1 sont le support moléculaire du rôle de la DA dans le système de récompense [84]. En effet, la famille des récepteurs de type D1 revêt une importance majeure dans les effets inhérents aux drogues d'abus telles que la cocaïne ou l'amphétamine [82, 83]. Spécifiquement, et alors que les rongeurs recevant des psychostimulants (cocaïne) ou des psychomimétiques (kétamine) démontrent une sensibilisation qui se traduit par une hyperlocomotion, la souris mutante D1-KO ne montre aucune réponse motrice spéciale [82, 85]. En sus, les R-D1 ont été associés au rôle que joue la DA dans l'apprentissage. Ceci a été avancé comme explication aux troubles de la plasticité synaptique corticostriatale chez la souris D1-KO [86].

Les conclusions tirées de l'étude de la souris D5-KO sont moins spectaculaires. En effet, la souris D5-KO est moins étudiée, ce qui peut s'expliquer par l'expression limitée de ces récepteurs. La souris D5-KO n'exprime pas un phénotype particulier. Elle est viable sans problèmes de croissance [82], et sa réponse à la cocaïne est atténuée [87] ou même intacte [85] suggérant l'existence d'un phénomène de compensation assuré par les R-D1 [82]. Cependant, on sait que spécifiquement au niveau de l'hippocampe et à un degré moindre au niveau de la VTA, la densité des R-D5 dépasse celle des R-D1. Cette spécificité s'est traduite par un rôle des R-D5 dans la plasticité synaptique ayant lieu dans l'hippocampe, et donc dans les phénomènes d'apprentissage et de mémoire inhérents. Par ailleurs, les R-D5 ont été également associés à une forme de plasticité synaptique corticostriatale à savoir la dépression à long terme [82, 86]. Finalement, le modèle transgénique a révélé également, l'existence de synergie entre les R-D1 et les R-D5 au niveau de la locomotion [82].

2.2 Les récepteurs de type D2

2.2.1 *Génétique, distribution et biochimie*

Ce groupe associe les R-D2, les récepteurs D3 (R-D3), et les récepteurs D4 (R-D4) [67]. Ces récepteurs sont codés par 3 gènes distincts localisés respectivement au niveau des chromosomes humains numéro 11 (pour les R-D2 et R-D4), et numéro3 (pour les R-

D3) [64, 67]. Contrairement aux gènes codant pour les récepteurs de type D1, les gènes de ces récepteurs partagent l'existence d'introns dans leurs structures. La présence d'introns au niveau des gènes codant pour les récepteurs de type D2 donne lieu au phénomène d'épissage alternatif [63]. Ce phénomène est à l'origine d'une plus grande diversité au sein de ce groupe. L'épissage alternatif du sixième exon du gène des R-D2 et codant pour l'insertion de 29 aa donne naissance à deux isoformes de R-D2: D2s, pour D2 short (ou D2-court), et D2L (pour D2 Long) [88]. La protéine D2s comporte 415 aa alors que la protéine D2L en comporte 444 [88]. Le gène des R-D3 code pour une protéine de 400 aa [89]. Le gène des R-D4 code pour une protéine de 387 aa [90]. Quelques isoformes ont été également identifiés pour les R-D3 [89] et les R-D4 [91], mais les fonctions qui peuvent en être associés ne sont pas très explorées. Signalons que quelques isoformes des R-D4 semblent manifester une affinité différente pour certains AP [92].

Par rapport aux autres membres de la famille des récepteurs de type D2, le R-D2 est le plus présent dans le cerveau adulte, et son expression a été démontrée au niveau du caudé-putamen, tubercules olfactifs, et le NAc, dans la SNc et dans la VTA [64, 68, 93]. Les R-D2 sont exprimés aussi bien sur les cibles des neurones dopaminergiques, donc en postsynaptique, que sur les terminaisons de neurones dopaminergiques eux-mêmes. Ces récepteurs présynaptiques assurent un rôle de contrôle sur la libération de la DA; et il s'agit principalement des isoformes D2s. Les isoformes D2L prédominent, eux, en postsynaptique [94]. Le R-D3, par contre, présente une expression plus restreinte mais aussi une expression dépendante de l'espèce. En effet, chez les rongeurs la densité des R-D3 culmine aux niveaux du striatum ventral et des aires limbiques, à savoir le shell du NAc, les tubercules olfactifs, les îlots de Calleja. Des niveaux plus faibles sont détectés dans le striatum, la région core de l'accumbens, dans la SNc, dans la VTA, dans l'hippocampe, et dans quelques aires corticales [63, 64]. Ce patron d'expression concerne sensiblement aussi bien l'ARNm que la protéine des R-D3. Chez les primates, l'expression des ARNm des R-D3 est surtout accentuée au niveau du caudé-putamen. Elle est également présente au niveau de la SN, des tubercules olfactifs, du NST, de la VTA, du cortex, de l'amygdale, du thalamus et de l'hippocampe. Les ARNm des R-D3 font défaut au niveau du GPi et du GPe [95, 96]. L'expression de la protéine R-D3 culmine au niveau

du NAc. Elle est aussi présente au niveau du caudé-putamen, de la SN, des tubercules olfactifs, du GPi et du GPe. Un fait saillant, la protéine R-D3 n'est pas détectée en dehors de ces structures [95, 96]. La présence des R-D3 au niveau de la SN a motivé la présomption que ces récepteurs peuvent jouer donc un rôle d'autorécepteurs. Les R-D4 présentent les niveaux d'expression les plus faibles parmi tous les récepteurs dopaminergiques [63]. Les densités les plus élevées des R-D4 ont été détectées au niveau du cortex, de l'amygdale, de l'hippocampe, de la SNr et du GP [90, 97].

Par ailleurs, l'homologie entre les récepteurs de ce groupe est moins importante que pour les récepteurs de type D1, en effet les R-D3 et les R-D4 présentent une homologie de 75 et 53% respectivement par rapport aux R-D2 [68]. Mais, tout comme pour les récepteurs de type D1, les outils pharmacologiques développés pour étudier ces récepteurs manquent de sélectivité [65].

Tout comme pour le profil génétique, les récepteurs de cette classe stimulent des cascades de signalisations plus diversifiées et plus complexes que par rapport aux récepteurs de type D1 (figure 4). Cependant, contrairement aux récepteurs de type D1, les récepteurs de type D2 sont des GPCR couplés aux protéines $G_{\alpha_i/o}$. Les protéines $G_{\alpha_i/o}$ étant un groupe de plusieurs types de sous unités α_i : 1, 2, 3, α_o , α_t , α_z Sur des cultures cellulaires les récepteurs de type D2 sont capables d'activer plusieurs sous types des G_{α_i} . Toutefois, il a été démontré qu'en fonction du sous type de récepteurs dopaminergiques certaines protéines G_{α_i} seront préférentiellement sollicitées. En effet, les deux isoformes des R-D2 [98, 99] et les R-D3 [100] activent préférentiellement les G_{α_o} ; alors que les R-D4 vont cibler d'avantage les sous unités α_z [100] et α_t [101]. Cette première interaction des récepteurs de type D2 avec les $G_{\alpha_i/o}$ mène à l'inhibition de l'AC. Tout comme pour les protéines G_i , l'inhibition de l'AC va dépendre du type de récepteur mis en jeu. Dans ce contexte, il a été démontré que les R-D2 et les R-D4 sont associés à l'inhibition de l'AC de type I et VI [75]. Les R-D3, par contre, n'inhibent que faiblement les AC I et VI et leur action est plus portée sur l'AC de type V [102].

Quel que soit l'AC mise en jeu, son inhibition aura pour conséquence l'inhibition de la PKA et donc la diminution de la production de l'AMPc. La résultante sur les substrats de la PKA sera donc l'opposé de l'effet de l'activation des récepteurs de type

D1. En guise d'exemple, à l'activation des récepteurs de type D2 s'en suit la diminution de la phosphorylation de DARPP-32 par la PKA au niveau du Thr34 et la levée de l'inhibition sur la PP1 [103]. Les canaux ioniques dont l'activité dépend de leur phosphorylation par la PKA seront également assujettis à des modifications. Sommairement, l'activation des récepteurs de type D2 exerce des effets sur les canaux Na⁺ et des canaux Ca²⁺ de type L, N et P/Q via l'action des protéines G [64]. Ces effets vont varier aussi bien en fonction du type cellulaire qu'en fonction des récepteurs sollicités [75]. Par ailleurs et comme précédemment mentionné, les R-D2 et les R-D3 peuvent également avoir une localisation présynaptique et assurent ainsi un rôle d'autorécepteurs. L'activation de ces autorécepteurs diminue la phosphorylation de la TH par la PKA ce qui pourrait résulter en la diminution de l'activité de la TH et par conséquent de la synthèse de la DA [104]. Ce mécanisme résulte aussi bien de la baisse de l'activité de la PKA que de la sollicitation d'autres cascades [104].

En effet, les récepteurs de type D2 modulent des voies de signalisation autres que celles déclenchées par l'inhibition de la PKA (figure 4) [63, 64]. Ces voies impliquent des voies indépendantes de l'AMPc; comme la cascade déclenchée par la PLCβ (phospholipase C de type β) (offrant ainsi un deuxième mécanisme de contrôle du Ca²⁺ intracellulaire), mais aussi d'autres voies distinctes comme celles de la phospholipase D et les MAP kinases [63, 75]... Ces voies sont plutôt régulées par les sous unités βγ des protéines G, qui seront découplées des sous unités α suite à l'activation de ces dernières [63, 64]. Trois grandes catégories de cascades signalétiques sont associées à la modulation par les sous unités Gβγ. En premier, par le biais de ces sous unités les récepteurs de type D2 peuvent contrôler l'activité des canaux potassiques à rectification entrante modulés par les protéines G (GIRK) [105]. En second lieu, les sous unités Gβγ semblent être des paramètres qui contribuent à l'activation de certaines MAP kinases par les récepteurs de type D2. Néanmoins, les cascades signalétiques qui mènent à l'activation d'ERK sont emblématiques et semblent dépendre du type cellulaire, de la localisation et même du paradigme expérimental [75]... En troisième lieu, les sous unités Gβγ modulent également une autre cascade signalétique qui a été tout récemment associée à l'activation des récepteurs de type D2. Il s'agit de la cascade faisant appel à la

protéine adaptatrice β -arrestine, initialement identifiée comme associée aux phénomènes d'internalisation et d'inactivation des GPCR. Des études faites sur la souris β -arrestine KO ont révélé que la β -arrestine est aussi le premier maillon d'une cascade signalétique associant la protéine kinase B ou Akt, les Glycogen Synthase Kinase GSK 3α et 3β [63].

2.2.2 Fonction des récepteurs de type D2

A côté des récepteurs de type D1, les récepteurs de type D2 jouent un rôle important dans l'activité locomotrice spontanée [64, 106]. Cependant, ce rôle est de loin plus complexe. Ce qui peut tenir pour origine la diversité des cascades signalétiques déclenchées par les récepteurs de type D2 mais aussi de la dichotomie des localisations postsynaptique et présynaptique [64, 106]. Alors que les récepteurs postsynaptiques assurent la transduction du signal, les autorécepteurs en présynaptique permettent un contrôle de la synthèse et de la libération de la DA qui permet un ajustement et une intégration des informations venant du milieu extracellulaire. Ainsi une activation isolée de chaque type de ces récepteurs peut mener à des résultats différents. En guise d'exemple, l'activation isolée des autorécepteurs D2 cause une diminution de la DA et donc de l'activité locomotrice alors que la même activation isolée des R-D2 en postsynaptique stimule ce comportement [63]. Cependant, l'implication différentielle des R-D3 dans les mouvements reste sujet de débat. On avance toutefois que les autorécepteurs D3 en présynaptiques aussi contribuent à la régulation de la libération tonique de la DA [63, 64, 95]. Quant aux R-D4 leur rôle dans le contrôle des mouvements est plus restreint [63, 64, 106].

A côté de la locomotion les récepteurs de type D2 sont impliqués dans le système de récompense. Ce rôle est rempli surtout par les R-D2 puis par les R-D3 à un degré moindre. Les récepteurs de type D2 permettent aussi, en synergie avec les récepteurs de type D1, un contrôle des phénomènes d'apprentissage et de mémoire active qui se produisent dans les aires corticales. Cependant, le rôle majoritaire qui a été associé aux

récepteurs de type D2 reste celui qu'ils peuvent assurer dans les phénomènes psychotiques et dans la schizophrénie en particulier [63, 64, 106]. De surcroit, les récepteurs de type D2 sont le support de mécanisme de médicaments traitant les désordres psychotiques, et tous les médicaments efficaces dans ce type désordre doivent nécessairement avoir une composante D2 antagoniste. Cet aspect sera traité dans les prochains chapitres.

Récepteurs de type D1 (D1, D5)

Récepteurs de type D2 (D2, D3, D4)

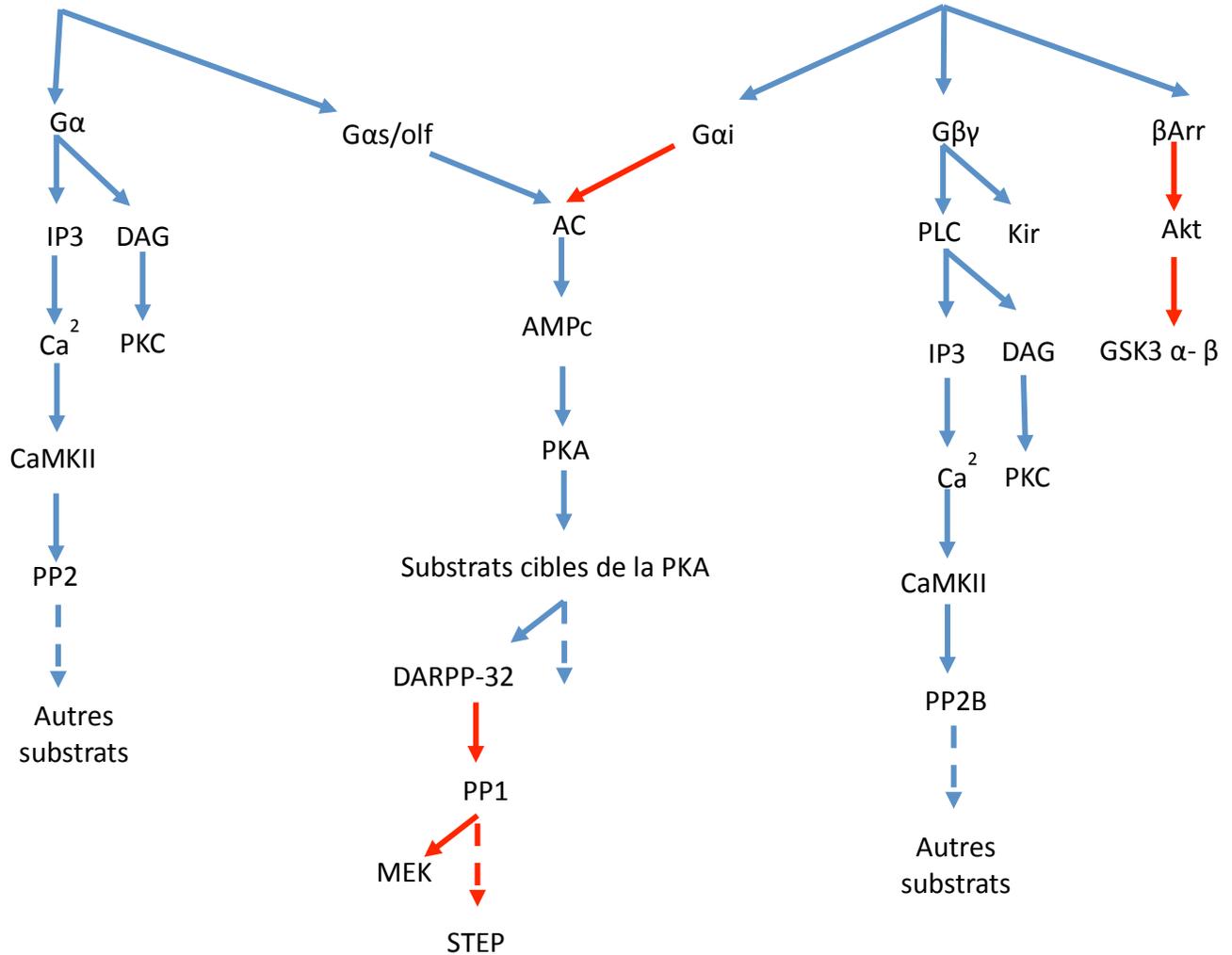


Figure 4: Signalisation des récepteurs dopaminergiques

Bleu: activation, Rouge: inhibition, figure inspirée de Beaulieu et al; 2011[63]

3. La DA dans le striatum

L'innervation dopaminergique du striatum naît de deux localisations anatomiques distinctes, à savoir la SNc et la VTA. Les neurones dopaminergiques de la SNc projettent préférentiellement au striatum dorsal [107]. Alors que les neurones issus de la VTA ciblent les composantes du striatum ventral [107]. En dehors du striatum, les neurones dopaminergiques présentent une arborisation très réservée. Par contre, au sein du striatum l'arborisation axonale des neurones dopaminergiques est amplement dense [36]. Les axones se présentent sous forme d'amas touffu de branches terminales très fines et variqueuses [36, 108]. Un seul neurone dopaminergique, de par son arborisation, pourrait innover 2.7-5.7% des neurones de striatum tout en réalisant des milliers de synapses [108]. Ces terminaisons réalisent des synapses de type « en passant » qui arborent les dendrites des MSN [109]. Néanmoins, une grande redondance a été observée et plusieurs axones dopaminergiques peuvent s'abattre sur un même neurone striatal [36, 108]. Cette redondance a fait que les projections dopaminergiques chiffrent à environ 10% des afférences striatales [108], et que la transmission dopaminergique synaptique est l'une des plus colossales dans le striatum.

Il faut toutefois mentionner que la transmission dopaminergique volumique extrasynaptique joue un rôle important dans le striatum. Du moins, ce serait ce que suggère le fait que la majorité des récepteurs DA du striatum sont extrasynaptiques [110, 111].

La répartition des récepteurs dopaminergiques est dans sa globalité très évocatrice de l'importance de la DA pour le striatum et pour les GB. En effet, toutes les cellules striatales expriment les récepteurs de la DA [15]. Les MSN de la voie directe expriment surtout les R-D1. Les MSN de la voie indirecte, quant à eux, expriment en premier lieu les R-D2, mais également les R-D5 [86]. Les interneurones GABAergiques expriment surtout les R-D5 [74, 86] alors que les interneurones cholinergiques expriment plutôt les R-D2 et les R-D5 [74, 112, 113]. Comme l'effet de la DA sur le striatum incombe directement à ses récepteurs, la question classiquement posée et qui revient toujours face à la DA était si l'action de DA sur le striatum et donc la sommation

de la stimulation de ces récepteurs par la DA est « excitatrice » ou « inhibitrice ». Actuellement un consensus est largement accepté. Ce consensus postule que l'action de la DA sur les fonctions striatales est plutôt modulatrice. Ceci s'explique facilement par le fait que les récepteurs de la DA sont tous des GPCR [26, 114]. En effet, la DA, par le biais de ses récepteurs à action « lente » va plutôt affecter la façon par laquelle les MSN répondent aux signaux externes et en premier lieu l'avènement d'une excitation glutamatergique [26]. Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre précédent, la DA exerce ses effets en modulant l'action de différents canaux ioniques et donc en modifiant les paramètres d'excitabilité cellulaire.

Dans les MSN, l'activation des R-D1 va faciliter le balancement des neurones vers un « up-state » s'il se produit une libération soutenue du glutamate. Si, par contre, l'excitation glutamatergique n'est pas assez intense, l'activation des R-D1 va favoriser que les neurones demeurent en « down-state » en diminuant leurs réponses à cet input [115]. Ces effets sont inhérents à l'action de la DA qui va augmenter les courants générés par les récepteurs NMDA [116], baisser la disponibilité des canaux Na^+ , et diminuer l'ouverture des canaux K^+ [26], et les canaux Ca^{2+} [75]. Paradoxalement, l'activation des R-D2 s'oppose à la réponse des MSN aux potentiels d'action capables d'engendrer une décharge neuronale et empêche donc la transition vers le « up-state » [117]. Les mécanismes derrière cet effet passent par la diminution de la libération de glutamate consécutive à l'activation des R-D2 [118], par l'augmentation de l'ouverture des canaux K^+ [119], et par l'augmentation du trafic des récepteurs AMPA en dehors des synapses [120]. En prime, la DA en modulant la réponse des MSN va assurer un rôle critique dans toutes les fonctions striatales; et la redondance qu'on observe au niveau des connexions avec les neurones striatales n'est finalement qu'une façon pour tenir compte de la multitude de signaux que peut recevoir le striatum [56].

À une échelle plus grande, la DA est associée à toutes les fonctions psychomotrices du striatum. Nous citons un fait très saillant dans la relation de la DA avec les GB et qui concrétise probablement le plus le rôle critique de la DA. Il s'agit de la MP où la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc projetant au striatum conduit à la perte de motricité spontanée. Néanmoins, l'action de la DA sur les fonctions

striatales est achevée en étroite collaboration avec d'autres systèmes de NT, dont le plus important est le glutamate.

Chapitre III: Le glutamate

"If a neuron fails to respond to glutamate it is either not a neuron or it is dead"
Cité dans : Intercellular communication in the nervous system [121].

1. Caractéristiques générales

Les afférences glutamatergiques représentent la majorité des afférences que reçoit le striatum. Ces afférences détiennent des origines diverses. Le cortex se place comme la plus importante source de neurones glutamatergiques et projette massivement à toutes les composantes du striatum-accumbens. Ce circuit forme le système corticostrié. En deuxième lieu, l'innervation extrinsèque glutamatergique des GB provient du thalamus (système thalamostrié) [122], de l'hippocampe et de l'amygdale. Outre les projections afférentes, les GB détiennent également une source intrinsèque de fibres glutamatergiques. Il s'agit principalement du NST. Les afférences glutamatergiques excitent les composantes striatales par le biais du principal acide aminé excitateur du cerveau: le glutamate.

Le glutamate agit sur deux types de récepteurs: les récepteurs ionotropes, et les récepteurs métabotropes [123]. Les récepteurs ionotropes (iGluR) sont des récepteurs couplés à des canaux ioniques et dont l'activation déclenche une réponse rapide. Ces récepteurs sont eux même subdivisés en deux sous types qui ont été nommés en fonction de leurs ligands respectifs. On distingue au sein des iGluR les récepteurs NMDA qui lient le composé chimique N-méthyl-d-aspartate, et les récepteurs AMPA (AMPA)/Kainate ou récepteurs non NMDA [123]. Les AMPA lient le ligand amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazoleproprionate alors que les récepteurs Kainate lient l'acide kainique [123].

Les NMDA sont des complexes tétramériques composés de sous unités NR1, NR2 et NR3. Ce complexe est caractérisé par une cinétique d'ouverture relativement lente et par

sa perméabilité aux ions Ca^{2+} en premier lieu puis aux ions Na^+ et K^+ [124]. Au repos le canal ionique en question est bloqué par le Mg^{2+} qui sera délogé suite à l'élévation du potentiel membranaire [125]. Outre que le site pour le Mg^{2+} , les NMDA disposent d'autres sites comme celui liant la glycine (co-agoniste), le Zn^{2+} , et les polyamines. La conductance élevée des NMDA résultant en une lente cinétique, la haute perméabilité au Ca^{2+} , et le blocage voltage dépendant par le Mg^{2+} , font des NMDA des capteurs très sensibles à l'environnement cellulaire [123]. Les AMPA sont des tétramères de différentes sous unités. On dénombre 4 types de sous unités GluR1-4. Les tétramères sont généralement l'association des dimères de GluR1 avec les dimères d'un autre type [124]. Le complexe ionique formé est hautement perméable aux ions Na^+ et K^+ . Il dispose également de trois sites cardinaux, à savoir le site liant le glutamate, le site liant les ions et une séquence dite flip-flop et qui conditionne la rapidité de désensibilisation du récepteur [124]. Les AMPA sont globalement les médiateurs de la réponse postsynaptique immédiate suite à la libération du glutamate [123, 124].

Le deuxième type de récepteurs glutamatergiques correspond à des récepteurs de la famille des GPCR. Il s'agit de récepteurs métabotropes du glutamate (mGluR); et à qui on associe une réponse plus lente [126]. Cette classe de récepteurs est-elle même répartie en trois groupes: le groupe I: associe les mGluR1 et mGluR5, le groupe II: comprend les mGluR2 et mGluR3 et le groupe III qui inclut les mGluR4, mGluR6, mGluR7, et mGluR8. Les mGluR sont tous des GPCR à 7 domaines transmembranaires [126]. Les cascades signalétiques associées au mGluR du groupe I sont les plus complexes. En effet, les mGluR-I sont en premier lieu couplés à la PLC et stimulent donc l'hydrolyse d'IP en IP3 et du diacylglycérol (DAG) [126]. Mais leur activation sollicite également d'autres voies annexes (voies dépendantes de l'AMPc...). Quant aux autres mGluR, on sait que les mGluR-II et mGluR-III sont les deux négativement couplés à l'AC et ceci via la liaison avec la $\text{G}\alpha/\text{q}$ [123, 126].

Au niveau des GB, aussi bien les récepteurs ionotropes que métabotropes sont abondants, tout en montrant des spécificités en fonction du type de récepteur et du type cellulaire [123].

Pour commencer, les iGluR ont avant tout une localisation postsynaptique au niveau des MSN et où ils produisent des courants excitateurs postsynaptiques. Au niveau du noyau accumbens, l'expression des iGluR semble dépendre de l'origine de l'innervation glutamatergique [123, 127, 128]. Les mGluR sont, quant à eux, abondants au niveau des GB mais 90% y sont postsynaptiques [126, 127]. Des localisations présynaptiques au niveau des terminaisons glutamatergiques et ou dopaminergiques, ont été démontré pour mGluR2, mGluR3 (groupe II), mGluR4 and mGluR7 (groupe III). Cependant, le striatum des primates exprime principalement les mGluR5 et mGluR1 [129].

Le glutamate, ce neurotransmetteur ubiquitaire (40% des synapses dans le CNS sont glutamatergiques) est associé à un éventail de fonctions cérébrales. En effet, le glutamate est essentiel pour une activité normale du cerveau et son rôle a été démontré dans plusieurs aspects de cette activité comme la locomotion, la mémoire, la perception, l'apprentissage... D'autre part, on lui accorde un rôle dans les phénomènes d'excitotoxicité et de dégénérescence neuronale. En clinique humaine le glutamate est incriminé dans plusieurs désordres psychoaffectifs, et maladies neurodégénératives. Nous nous arrêtons sur quatre grands axes des fonctions glutamatergiques dans les GB et le striatum en particulier: l'excitotoxicité, le rôle dans les fonctions cognitives, le rôle dans les problèmes de dépendance aux drogues et finalement le rôle dans les troubles moteurs.

L'excitotoxicité est la survenue de mort cellulaire suite à la libération excessive de glutamate. Le glutamate libéré en excès déclenche une hyperstimulation des récepteurs glutamatergiques et une surcharge cellulaire en Ca^{2+} [130]. L'accumulation du Ca^{2+} est due principalement à l'activation des NMDA dont l'ouverture permet l'influx calcique. Il a été également démontré que le débordement cellulaire en Ca^{2+} peut être associé, mais à un degré moindre, à l'activation des mGluR du groupe I qui sont couplés à l'activation de la cascade PLC/IP3 et donc à la mobilisation inhérente des stocks intracellulaires de Ca^{2+} [123, 130]. Outre l'activation des cascades pro-apoptiques, l'accumulation de Ca^{2+} cause la dépolarisation des membranes mitochondriales. Ce qui se traduit finalement par la mort neuronale. Ce phénomène peut être physiologique et survient surtout avec le

vieillesse [131]. Néanmoins, la mort neuronale par excitotoxicité est avancée surtout comme une des explications aux maladies neurodégénératives du système nerveux central (CNS), et spécialement à la MP et la maladie de Huntington pour ce qui nous intéresse [131].

Les NMDA de par leur nature de détecteurs de l'environnement cellulaire sont un outil de prédilection pour les fonctions cognitives en particulier l'apprentissage et la mémoire. Ces récepteurs sont impliqués dans les différents types d'apprentissage et de mémoire et ceci dans plusieurs régions cérébrales. Les fonctions striatales sont par contre plus liées à la mémoire procédurale (striatum) et à la mémoire spatiale (NAc), deux types de mémoire où les récepteurs glutamatergiques sont impliqués. Au niveau striatal, les NMDA sont le substrat cellulaire de la consolidation de la mémoire alors que les AMPA font le lien entre l'acquisition de la mémoire et son utilisation ultérieure. Dans ce contexte, plusieurs études ont conclu à la baisse du glutamate et de la densité de ses récepteurs chez le sujet âgé. Cette baisse qui corrèle avec le déclin concernant la mémoire spécialement, se produit au niveau du striatum. Les études d'autoradiographies ont pu spécifier que la baisse des récepteurs glutamatergiques porte sur les NMDA (particulièrement la sous unité NR1). Toutefois, le mécanisme par lequel ces récepteurs interviennent dépend de leur rôle dans ce qu'on appelle la plasticité synaptique, sujet qui sera traité dans le chapitre suivant [123, 132].

Le troisième axe, traitant de l'importance de la transmission glutamatergique dans le striatum, s'attarde sur l'importance du glutamate et de ses récepteurs dans les modifications des fonctions striatales consécutives à l'utilisation des drogues d'abus. Le phénomène de dépendance peut être modélisé comme la traduction comportementale d'une plasticité synaptique aberrante, sur laquelle nous revenons plus tard. En outre, des études récentes nous apprennent qu'aussi bien en aigu qu'en chronique la cocaïne modifie la transmission glutamatergique dans le striatum. Cette modification s'opère, à priori, via les changements de l'activité /phosphorylation des sous unités des AMPA, les GluA1 spécialement [133].

Finalement, à côté du rôle joué dans la mort cellulaire dans les maladies du système moteur, les récepteurs glutamatergiques semblent avoir un effet direct dans la locomotion qui peut aller dans les deux sens en fonction de la classe du récepteur sollicité. Ce postulat a été essentiellement alimenté par les études pharmacologiques qui étudient l'effet de différents ligands glutamatergiques. En guise d'exemple, l'administration systémique ou intrastriatale de différents types d'antagonistes des NMDA cause une augmentation de l'activité locomotrice. Par opposition, les agonistes des mGluR-I sont eux reliés à l'hyperactivité locomotrice (rotations controlatérales chez le modèle 6-OHDA de la MP) [123]. Par ailleurs, plusieurs modulateurs allostériques ont été candidats pour le traitement de certains troubles moteurs tels les dyskinésies induites à la L-dopa, traitement cardinal de la MP [134].

Malgré la diversité des fonctions assurées par le glutamate, plusieurs recherches nous proposent de les résumer comme conséquence directe du rôle du glutamate et de ses récepteurs dans l'une des caractéristiques fascinantes des cellules neuronales: la plasticité synaptique.

2. Plasticité synaptique

Les synapses sont des entités vivantes dont la force peut augmenter ou diminuer au cours du temps et en fonction de l'activité [135, 136]. C'est ce qu'on appelle la plasticité synaptique. La découverte de ce phénomène remonte aux travaux pionniers de Ramon y Cajal, mais a connu un essor avec le livre du canadien Hebb. Dans son livre « the Organization of Behavior » Donald Hebb postula que si une cellule présynaptique A est impliquée de façon répétée dans l'activation d'une cellule postsynaptique B, avec d'autres cellules postsynaptiques, la force de connexions synaptiques entre A et B serait augmentée. Depuis, plusieurs études ont essayé de décortiquer le phénomène et identifier les zones cérébrales concernées. Les premières études étaient faites au niveau des neurones de l'hippocampe et dès lors on a découvert que la plasticité synaptique concerne également le cortex. Des études récentes démontrent que le phénomène est

également présent au niveau de la VTA. De même, il y a été démontré que la plasticité synaptique existe bel et bien au niveau du striatum [135-138].

La plasticité synaptique se décline en plusieurs formes dont des formes à court ou à long terme. Les cardinales de la plasticité synaptique à long terme sont la potentialisation à long terme ou LTP, et la dépression à long terme ou LTD [139]. On qualifie de LTP, l'augmentation en amplitude les potentiels excitateurs postsynaptiques évoqués par la stimulation électrique inhérente à une stimulation à haute fréquence répétée dans le temps [138, 139]. La LTD désigne le phénomène inverse où la perte en force d'une synapse se produit suite à l'incapacité d'une cellule présynaptique à activer une cellule postsynaptique qui décharge par contre en réponse à d'autres cellules postsynaptiques [138, 139]. Depuis son introduction, la plasticité synaptique de Hebb était reconnue comme un des substrats cellulaires de la mémoire et de l'apprentissage. Le concept naquit directement du postulat de Hebb où la plasticité corrèle avec la notion de trace au niveau synaptique. L'état de connaissance actuel permet de confirmer cette idée tout en présentant d'autres formes de plasticité qui peuvent être associés [138]. L'apprentissage et la mémoire conduisent naturellement à des changements de comportement pour permettre une adaptation [138, 139]. Cette adaptation peut être assez bien physiologique (acquisition d'habitude, mémoire procédurale...) que pathologique (toxicomanie, dyskinésies...). On sait actuellement que ces adaptations et les changements qui peuvent en découler font appel au processus d'intégration striatale. Ainsi, la plasticité synaptique paraît comme une exigence pour cette structure [138, 140]. En effet, il a été démontré que la plasticité synaptique à long terme avec ses deux formes, LTP et LTD, est présente dans le striatum [28, 138, 141]. Cette plasticité porte surtout sur les synapses corticostriatales entre les MSN et les fibres corticales et probablement thalamostriatales entre les MSN et les afférences thalamiques [28]. Néanmoins, une forme de LTP a été décrite au niveau des interneurons cholinergiques du striatum [142]. La répartition anatomique de ces phénomènes est également hétérogène avec des gradients d'expression dans les régions striatales [137]. En guise d'exemple on sait que la LTP prédomine dans le striatum dorsomédian et dans le striatum rostral, la LTD est plus rencontrée au niveau du striatum dorsolatéral et caudal [137].

La LTP se présente comme une succession d'événements en cascade qui se révèle hautement dépendante du glutamate et du NMDA [143]. En contexte physiologique la simple dépolarisation des MSN devrait se traduire par un déblocage des NMDA [28, 140, 143]. Néanmoins pour induire la LTP expérimentalement, la dépolarisation des MSN n'est pas suffisante *per se*. D'autre part, il est évident maintenant que la DA permet une modulation critique de la LTP [143]. En effet, chez les modèles animaux avec une déplétion en DA, la LTP fait défaut. Toutefois, la LTP peut avoir lieu chez les animaux en déplétion mais seulement dans la voie indirecte [28, 138]. En guise d'explication à ces résultats, il a été proposé que la modulation dopaminergique de la LTP fasse appel aux R-D1 dans la voie directe et que la LTP exprimée au niveau de la voie indirecte en absence de la DA passe par l'activation des récepteurs de l'adénosine A2A. Ce faisant, la DA module la plasticité synaptique en assurant un ajustement de la réponse neuronale [26]. La DA a la capacité de contrôler la libération du glutamate via l'activation des R-D2. Elle contrôle également la libération de l'acétylcholine par les interneurons cholinergiques en activant les R-D1 et les R-D5 situés sur ces interneurons [28, 86, 138, 140-143].

Tout comme le renforcement d'une synapse nous permet d'apprendre et de mémoriser, la fragilisation d'une synapse forge nos souvenirs et nos habitudes. La LTD est aussi importante que la LTP pour l'intégration striatale des différents signaux [28, 138]. Et tout comme la LTP, elle est directement dictée par le glutamate et ses récepteurs [28, 138]. Cette LTD peut être concrétisée comme un phénomène qui naît en postsynaptique mais dont les effets se répercutent en présynaptique via une réduction portant sur les neurotransmetteurs. Cette forme de plasticité met en jeu plusieurs systèmes. La LTD requiert l'intervention des mGluR couplés à la protéine Gq, des récepteurs dopaminergiques D2, les canaux calciques de type L, et l'activation des CB1, mais n'exige pas les NMDA ni les récepteurs muscariniques [28, 86, 140, 141].

Tous les mécanismes proposés jusque-là sont les mécanismes observés en situation physiologique et dictent une plasticité physiologique. Il a été également démontré que des formes de plasticité aberrante ou erronée prennent place dans des

contextes pathologiques entravant les fonctions striatales, comme la MP, et la schizophrénie.

Chapitre IV: La schizophrénie

« Mélancolie-Misanthropie maniaque: Les fous de cette sorte vivent en général retirés dans leur loge, et on ne peut leur arracher une parole; quelques-uns sont tranquilles et se contentent de ne rien répondre quand on leur parle; d'autres entrent dans une sorte de fureur [...].

Idiotisme-Imbécilité: Cette folie n'est souvent qu'une sorte de rêvasserie douce; les hommes à cheveux blonds y sont les plus sujets. On compte dans l'hospice 31 imbéciles tranquilles et non dangereux et 18 imbéciles sujets à des quintes dangereuses. »

Pinel P. Traité médico-philosophique sur l'aliénation mentale et la manie (1801).

1. Caractéristiques générales

La schizophrénie est une maladie psychiatrique complexe de présentation clinique et de pronostic variables. Elle représente la cause de la psychose la plus répandue au monde. Sa prévalence oscille entre 0.6%-1.9% [144-146]. Cette fourchette s'élargit en fonction de la rigueur des critères diagnostiques appliqués. Les répercussions sociales et économiques de cette maladie sont très lourdes aussi bien pour le patient, pour son entourage immédiat que pour le système de santé [144]. De surcroît, c'est l'une des principales raisons de l'invalidité fonctionnelle [146]. D'autant plus qu'elle porte sur la tranche d'âge incarnant la population active. En effet, la schizophrénie est généralement diagnostiquée vers la fin de l'adolescence et le début de l'âge adulte. Des cas diagnostiqués plus tôt ou plus tard sont exceptionnels en clinique [146]. La prévalence globale de la maladie demeure stable selon les sexes, mais l'incidence de survenue serait plutôt plus élevée chez les hommes (ratio homme: femme=1.4). Une grande différence observée entre les hommes et les femmes est notée par rapport à l'âge de la déclaration de la maladie [146, 147]. En effet, le premier épisode de la maladie semble être plus précoce chez les hommes [147-149].

La littérature moderne sur la schizophrénie remonte au 19^e siècle où Emil Kraepelin décria un état psychotique de démence juvénile baptisée *dementia precox* et où dominait l'aspect de détérioration mentale [150]. Le terme schizophrénie fut proprement introduit par Eugen Bleuler qui mettait de l'avant le schisme caractéristique de la maladie [150]. Dans la psychiatrie actuelle, le tableau clinique de la schizophrénie allie l'atteinte cognitive Kraepelinienne au schisme de Bleuler. En effet, selon le DSM-IV-TR (la classification standard des désordres mentaux utilisés par les professionnels de la santé aux États unis) les symptômes de la maladie peuvent être séparés en symptômes positifs, en symptômes négatifs et en troubles cognitifs [146]. Les symptômes positifs ou productifs font référence aux symptômes qui « s'ajoutent » au comportement normal comme le délire, les hallucinations (visuelles, auditives...). Les symptômes négatifs sont les symptômes qui « font défaut » dans un comportement normal comme l'apathie, l'anhédonie, le retrait social, et l'alogie. Les troubles cognitifs portent sur l'attention, la mémoire et les fonctions exécutives. L'absence de signature diagnostique claire a donné naissance à une vision centrale. Cette vision, pour tenter d'orienter le diagnostic de la maladie, place les symptômes négatifs et les troubles cognitifs comme le "le coeur" de la maladie [151, 152]. Comme argument à cette vision les troubles cognitifs et négatifs semblent former une entité clinique plus homogène. Dans ce contexte, ces deux types de symptômes affectent les fonctions psychosociales. De même, leur installation semble être prodromique de la maladie, et leur réponse aux traitements reste limitée, spécialement en ce qui concerne les symptômes négatifs [152].

La chronologie de la maladie est également variable [151]. On retient cependant que la schizophrénie évolue en épisodes ou séquences [151]. Après une première séquence pré-morbide cliniquement peu expressive (excepté des signes cognitifs mineurs) survient la phase pro-dromale de la maladie. Cette phase est dominée par les symptômes positifs. Elle est toutefois chevauchée de symptômes négatifs et cognitifs, peu parlant au début [146, 151, 153]. La phase symptomatique ou phase psychotique franche s'installe par la suite avec une alternance d'épisodes aigus et de phases de rémission partielle. La rémission est parsemée de symptômes résiduels. Généralement, après la première décennie la maladie évolue vers une phase plateau où le nombre d'épisodes est

réduit mais où les symptômes résiduels prennent le dessus [146, 151, 153]. Les atteintes cognitives sont dès lors plus marquées et le déclin mental plus prononcé. L'évolution au plus long terme ou pronostic est variable et dépend de plusieurs paramètres (comorbidités, génétique...) [153].

Le consensus actuel définit la schizophrénie comme une maladie complexe où interviennent plusieurs facteurs [152]. Les études d'association génétiques et les études épidémiologiques ont pu démontrer l'importance de la prédisposition génétique pour le développement de la maladie [152]. Les études génétiques faites sur les jumeaux homozygotes nous renseignent que la schizophrénie est une maladie à fort caractère héréditaire et où l'héritabilité est évaluée à 40%-50% [144, 152]. La prédisposition est d'autant accrue en cas d'existence d'ancêtres affectés par la maladie ou présentant d'autres psychoses dans l'arbre généalogiques [144, 152]. Néanmoins, l'hérédité dans le cas de la schizophrénie ne suit pas la transmission mendélienne [144, 152]. Le profil dressé de la schizophrénie est celui d'une maladie polygénique, où interviennent plusieurs gènes affectant chacun une petite portion de la grande population des schizophrènes[144]. En effet, les études d'association génique ont pu mettre au jour une liste de gènes de susceptibilité. Il s'agit surtout des gènes de la COMT, de la neureguline 1(NRG1), de la RGS4 (pour Regulator of G-protein signalling 4), de DISC (pour Disrupted in schizophrenia 1), de mGlu3, de la calcineurine, et de l'Akt [154]. Ces études sont plutôt des études d'association que des études démontrant un lien de causalité directe [144, 152]. Dans ce sens, la modification de l'expression de chacun de ces gènes ne serait pas suffisante pour le déclenchement de la maladie, mais en présence d'autres paramètres les risques se voient multiplier[154]. Ceci, a fait pondérer l'importance des facteurs environnementaux dans la physiopathologie de la maladie [144, 152].

L'absence d'agent causal direct, le tableau clinique variable, et le profil polygénique ont rendu difficile les études étiologiques de la schizophrénie. Cependant trois grandes hypothèses peuvent être retenues. Il s'agit de l'hypothèse dopaminergique, de l'hypothèse neuro-développementale et de l'hypothèse glutamatergique.

2. L'hypothèse dopaminergique de la schizophrénie

L'hypothèse dopaminergique est un exemple de ce qu'on appelle la médecine transrationnelle. Il s'agit d'hypothèse qui part d'un traitement pour remonter le circuit responsable de la maladie que le médicament est censé traiter (Il faut toutefois préciser que cette hypothèse vise l'explication étiologique des symptômes de la maladie plus que la maladie elle même). Certains auteurs proposent même de l'appeler: l'hypothèse des récepteurs dopaminergiques [155]. En effet, cette hypothèse remonte au début des années 1950, où les premières molécules à caractère antipsychotique ont vu le jour (nous revenons sur ces médicaments dans le chapitre prochain). La découverte de ces molécules a été légèrement en avance par rapport à la découverte de l'importance de la DA dans le SNC. En 1960, quand Ehringer et Hornykiewicz ont démontré que la DA faisait défaut chez les malades atteints de la MP [156], le lien entre la DA et la schizophrénie a été tout de suite noté, puisque les observations cliniques démontrent que les molécules proposées étaient responsables d'effet de type parkinsonisme. Des années plus tard, en 1963 Carlsson et Lindqvist ont trouvé que la chlorpromazine et l'halopéridol (les premières molécules AP) augmenteraient le métabolisme de la DA [157]. Pour ce, ils ont spéculé que plusieurs récepteurs de monoamines doivent être bloqués par les molécules à caractère antipsychotique, sans identifier pour autant les récepteurs dopaminergiques. Mais, le premier à donner une forme à l'hypothèse dopaminergique serait Jacques Van Rossum (1966)[158]. Dans sa forme la plus primitive cette hypothèse postulait que la schizophrénie est causée par une hyperactivité dopaminergique et que cette hyperactivité serait due à un excès de la libération de la DA ou à une réponse démesurée des récepteurs dopaminergiques en postsynaptique [159]. En renfort, plusieurs arguments se sont accumulés prônant un rôle central de la DA dans la schizophrénie. Plus tard, l'hypothèse dopaminergique a connu une petite rectification. En effet, par opposition à la première formulation, on a spéculé cette fois que le rôle central de la DA s'opère via les récepteurs dopaminergiques plutôt que par la DA elle-même [159, 160]. En guise d'exemple, la réserpine un alcaloïde antihypertenseur qui fut reconnu comme ayant certaines capacités tranquilisantes, a été démontrée capable de bloquer la

recapture de la DA. D'autre part, il a été démontré que l'amphétamine qui augmente le niveau des monoamines dans la fente synaptique cause des symptômes très proches des symptômes psychotiques [155]. Au cours des années 1970 l'hypothèse dopaminergique a pris une allure plus définie avec la démonstration que l'efficacité des AP est directement liée à leur affinité aux récepteurs DA, donnant ainsi plus d'importance au blocage des récepteurs [159, 161]. Toutefois et malgré la véracité des arguments avancés, cette hypothèse était trop rudimentaire pour expliquer la clinique de la maladie ou pour intégrer les différents facteurs qui ont été suspectés d'avoir un lien avec la maladie [155].

Plus loin, dans les années 90, l'histoire de la schizophrénie a été marquée par la commercialisation d'une nouvelle classe de molécules à caractère antipsychotique (la clozapine) qui venait défier les définitions classiques [155]. En parallèle, des techniques d'imagerie médicale plus développées telles que la tomographie par émission de positrons ou PET-SCAN avaient le mérite de démontrer que: la densité des récepteurs dopaminergiques varie d'une région cérébrale à l'autre, et que l'activité métabolique au niveau du cortex frontal, mesurée par le flux sanguin, est réduite. Ces trouvailles ont interpellé l'hypothèse dopaminergique classique [155]. Pour ce, on a vu bourgeonner une version revisitée sur le rôle de la DA dans la schizophrénie. Cette nouvelle version propose que la schizophrénie serait plutôt résultante d'une hypodopaminergie frontale conjuguée à une hyperdopaminergie sous-corticale (et surtout striatale). Dans une revue faisant le tour sur le sujet, Davis et al, [162] ont présenté la nouvelle vision du rôle de la DA. Ils ont également suggérer une explication sur le lien entre les données biochimiques et la clinique de la maladie [162]. En effet, et pour la première fois, il a été proposé que la baisse de la transmission dopaminergique au niveau du cortex frontal serait responsable des symptômes négatifs et que les symptômes positifs seraient eux causés par l'excès d'activité dopaminergique au niveau sous-cortical [162].

Dans sa globalité, l'hypothèse dopaminergique est l'hypothèse qui a perduré le plus dans l'histoire de la maladie au 20eme siècle [155]. Cette hypothèse continue même à être alimentée par les nouvelles études d'association géniques qui démontrent que des

gènes liés à la transmission dopaminergique seraient affectées dans la maladie [152]. Néanmoins, l'hypothèse dopaminergique vise surtout l'explication des symptômes de la maladie. Toutefois, elle reste incapable de répondre à plusieurs interrogations concernant l'étiologie et la sémiologie de la maladie, ni d'intégrer les résultats des nouvelles études scientifiques qui fournissent perpétuellement un nouveau paramètre contribuant dans la genèse de la schizophrénie. Une version « améliorée » de l'hypothèse propose d'abriter tous ces paramètres sous le chapeau de la dérégulation dopaminergique [155]. En revanche, un autre clan propose une hypothèse dite neuro-développementale et qui propose que la dérégulation de la DA serait un aboutissement final de la concurrence d'une série d'événements.

3. Hypothèse neuro-développementale

L'hypothèse neuro-développementale a émergé aux années 1980 [163]. Elle propose que la schizophrénie soit liée à un problème de développement du cerveau qui se produit à même la vie intra-utérine. Ce problème ou défaut prédispose les sujets ultérieurement schizophrènes à un canevas caractéristique de dérégulation des fonctions cérébrales qui se produisent dans les premières années de la vie et qui s'affichent des années plus tard avec la psychose franche [163, 164]. Dans ce modèle des « menaces » qui se produisent dans l'environnement prénatal de l'enfant comme les infections prénatales, et les complications obstétriques comme l'hypoxie, seraient plus fréquents chez les schizophrènes que chez la population normale [163]. Cette hypothèse se décline en plusieurs variantes. Nous retenons ici le modèle de McGlashan, Hoffman et Benes, qui suggèrent que la schizophrénie est liée à un trouble de la synaptogenèse [165] qui se traduit par une connectivité synaptique réduite ou aberrante au cours du développement [145, 165]. La grande équation à résoudre pour ce modèle restait le délai entre la menace présumée et la déclaration symptomatique de la maladie. Pour l'expliquer, il a été proposé que les troubles comportementaux apparaissent plus tard à un âge où les circuits cérébraux, altérés par des troubles de connectivité, seront saturés devant une demande fonctionnelle grandissante [145]. Les arguments cardinaux de cette hypothèse

se basent principalement sur la neuro-imagerie. En effet, les techniques utilisées en neuro-imagerie ont mis en évidence l'existence de modifications de la morphologie cérébrale lors de la maladie [152, 163]. Les anomalies structurelles les plus constamment retrouvées sont l'élargissement des ventricules latéraux et du troisième ventricule, la réduction du volume du lobe temporal médian du gyrus temporal supérieur [152]. Dans quelque études longitudinales, ces anomalies seraient progressives et se produisent à différents stades du développement neuronal [166-168]. Ces anomalies *per se* ne peuvent pas expliquer pourquoi les troubles de la fonction cérébrales prennent un temps de latence avant de se déclarer [169]. Pour cela et dans une nouvelle version de l'hypothèse neuro-développementale, il a été proposé de combiner au modèle neuro-développemental précoce un processus développemental qui se produit à l'âge adulte et qui expliquerait la phase symptomatique. Ce processus serait régi par des troubles de la myélinisation [170], ou de triage synaptique [145]. Dans ses formes récentes, l'hypothèse neuro-développementale se veut plus intégratrice. Elle propose de réconcilier les fondements neuro-développementaux à l'hypothèse dopaminergique. Dans ce nouveau modèle, la conjugaison d'une susceptibilité génétique, qui opère dès les premières années, à des facteurs de risque psychosociaux (adversité sociale...), ultérieurs aboutit à une dérégulation dopaminergique [169]. Outre que l'hypothèse dopaminergique et ses déclinaisons, une nouvelle hypothèse incriminant une autre transmission a émergé ces dernières années. Il s'agit de l'hypothèse glutamatergique.

4. Hypothèse glutamatergique de la schizophrénie

Cette hypothèse propose qu'une dérégulation des récepteurs NMDA cause une baisse de leur fonction et que ceci soit responsable de l'expression des symptômes de la schizophrénie [171, 172]. Même si elle n'a pas connu la même envergure, cette hypothèse est aussi bien ancrée dans l'histoire que celle de la DA. En effet, cette hypothèse prend racine des observations cliniques faites aux années 1950 peu après l'utilisation des premiers anesthésiants dissociatifs: la kétamine, et la phénylcyclidine

PCP. Administrées chez des individus normaux pour des fins d'anesthésie, ces molécules causaient l'apparition de "psychoses aiguës" (dysphorie, hallucination, voire même des symptômes dépressifs). On a estimé que ces molécules reproduisaient le spectre des symptômes de la schizophrénie [173, 174]. Des années plus tard, le site d'action de ces anesthésiants a été identifié comme étant les récepteurs NMDA et leur action pharmacologique [175] a été identifiée comme résultante au blocage des NMDA [176]. Toutefois, ce n'est qu'aux débuts des années 1990 que l'hypothèse glutamatergique a été concrètement formulée par Javitt et Zukin qui ont proposé pour la première fois que la schizophrénie peut être le résultat d'une hypoactivité des NMDA [177].

Le lien établi entre l'antagonisme des NMDA et des effets psychotiques a été étendu à différentes molécules bloquant ce récepteur [172]. Cet effet a été démontré comme suffisant par lui-même pour engendrer la psychose puisqu'il persiste même en absence de la DA [178]. L'effet est également spécifique puisque les doses avec lesquelles les effets des antagonistes NMDA sont observés, sont similaires aux doses avec lesquelles ces composés agissent sur les NMDA et non pas les autres récepteurs [172, 177].

Ces dernières années, le besoin d'une explication alternative, qui assouvit les interrogations persistantes quant à la schizophrénie, ses symptômes et ses traitements, est plus que jamais grandissant. Pour ce, l'hypothèse glutamatergique a été de nouveau scrutée [172]. Ceci s'explique par l'accumulation de nouveaux arguments obtenus suite à l'évolution qu'a connue le domaine des neurosciences grâce aux techniques de biologie moléculaire, de génétique et d'imagerie cérébrale [172]. Pour commencer, les NMDA sont des récepteurs dotés de plusieurs rôles dans la transmission neuronale en générale (en guise d'exemple la régulation de la migration neuronale, différenciation neuronale, la plasticité synaptique, l'excitotoxicité...). Ces mêmes processus ont été rapportés comme défailants dans la schizophrénie [179]. Deuxièmement, les études d'association génique ont, de leur part, montré l'implication de gènes qui peuvent affecter la fonction des NMDA comme le G72 [180], la dysbindine [181], et la neureguline [182] dans l'expression de la schizophrénie. D'autres études géniques ont fourni un lien plus direct en démontrant l'association positive entre la schizophrénie et certains polymorphismes

génétiqes des sous unités NR1 et NR2B [183]. Troisièmement, la modulation des NMDA semble être perturbée chez les sujets schizophrènes [172]. Dans ce contexte, il a été démontré que dans la population schizophrène les concentrations de la sérine racémase sont plus faibles que dans une population normale. La sérine racémase étant une enzyme qui contrôle les concentrations tissulaires d'un agoniste endogène des NMDA: la D-sérine [184].

Ces arguments ont contribué, également, au raffinement de l'hypothèse glutamatergique. Cette hypothèse suggère désormais que la dérégulation des NMDA affecte principalement les interneurons striataux parvalbumine (+) [172]. Ces interneurons GABAergiques exercent en situation normale un contrôle négatif sur les projections corticales et limbiques. La baisse de l'activité des NMDA se traduit par une levée de l'inhibition sur ces interneurons. Ce qui se traduit, en retour, selon les partisans de l'hypothèse glutamatergique, par la perturbation du processus cortical. La dérégulation corticale inhérente serait donc en cause des troubles cognitifs et négatifs de la maladie et de l'augmentation de la libération de la DA sous corticale [172, 179]. Pour défendre cette hypothèse, il a fallu tout d'abord expliquer l'origine de la baisse de l'activité des NMDA. Pour cela, il a été proposé une hypothèse présynaptique et une autre post-synaptique [172]. Dans l'hypothèse présynaptique on avance que la baisse des fonctions des récepteurs NMDA survient dans un contexte d'une hyperactivité glutamatergique. Cette dernière va favoriser la stimulation de certains récepteurs, spécialement les récepteurs AMPA, tout en régulant à la baisse l'activité des récepteurs NMDA. Pour concilier ce concept avec le consensus sur la baisse de l'activité frontale, il a été suggéré que l'hyperactivité glutamatergique, en dérégulant les neurones pyramidaux, perturbe leur fonctionnement normal et diminue donc leur output. L'hypothèse post-synaptique s'attarde sur la signalisation des récepteurs NMDA. Dans ce dessein, les changements de concentration des ligands endogènes (la sérine ou la glycine), ou des enzymes impliquées dans la transmission des récepteurs NMDA, ainsi que les polymorphismes des sous unités composant le récepteur ont été pris pour arguments [172, 179].

L'hypothèse glutamatergique semble fournir une voie importante pour d'autres investigations. On propose d'ores et déjà des molécules ciblant la transmission glutamatergique comme traitements alternatifs possibles [172]. Ces molécules ont évolué de simples agonistes ou antagonistes à des modulateurs allostériques [134]. Ces derniers en modulant indirectement la transmission glutamatergique permettent un contrôle plus précis des fonctions présumées aberrantes dans la schizophrénie [134]. Pour ce, ces modulateurs allostériques sont considérés comme très prometteurs.

Nous avons présenté ci dessus les hypothèses les plus communément avancées pour expliquer la schizophrénie ou ses symptômes. Pour confirmer ou infirmer ces hypothèses les modèles animaux s'avèrent un outil incontournable [185]. Les modèles utilisés en expérimentation, principalement des rongeurs [186], reflètent parfaitement la complexité de ce désordre mais répondent, dans leur diversité, aux différentes hypothèses énoncées pour la maladie [187]. On retrouve les modèles de développement, les modèles « pharmacologiques », les modèles de manipulation génétique et finalement les modèles de lésion [187].

Les modèles de développement sont une continuité de l'hypothèse neuro-développementale de la schizophrénie. Dans ces modèles, la souris gestante subit des contraintes stressantes au cours de la gestation (malnutrition, stress maternel, infection virale, activation immunologique, ...etc.) qu'on pense capable d'affecter ultérieurement la progéniture [187]. Une déclinaison de ces modèles s'attarde sur l'interaction sociale entre l'animal et sa progéniture et consiste à séparer les animaux nouveaux nés de leurs mères ou à séparer un animal du reste de la portée. L'utilisation du cannabis pendant le jeune âge s'apparente également à ces modèles, dans la mesure où cette drogue affecte le développement neuronal à l'âge adulte [188]. Les modèles pharmacologiques restent plus simples dans leur conception qui consiste principalement à administrer aux animaux étudiés des traitements pharmacologiques capables de causer des états psychotiques rappelant les symptômes positifs de la maladie, cas de l'amphétamine, ou de la PCP [187, 188]. Dans les modèles de lésion nous retrouvons spécialement la lésion néonatale de l'hippocampe ventrale chez le rat à 7 jours de vie [187]. Cette lésion est due

à une injection d'une toxine; l'acide iboténique [189]. Les modèles génétiques regroupent l'ensemble des animaux transgéniques dans les quels des mutations ont été artificiellement introduites afin de retrouver les modifications génétiques qu'on a retrouvées chez les sujets schizophrènes [188]. Parmi ces modèles nous retrouvons les souris portant des mutations des gènes DISC1, Neuregulin1, ErbB4, COMT...etc. [187]. Les déclinaisons les plus récentes de ces modèles comportent l'introduction de plusieurs mutations au même temps ou même l'association de mutations génétiques et épigénétiques [187].

Tous ces modèles sont encore loin d'être considérés comme des modèles valides de la maladie [185]. En effet, aucun des modèles indiqués n'est capable de reproduire la totalité du spectre des symptômes de la schizophrénie. Ces modèles font également face à un problème de spécificité qui se pose même pour les modèles génétiques et les animaux portant une mutation d'un gène de risque ne développent pas obligatoirement les symptômes usuels de la schizophrénie (exemple de la mutation DISC1) [185]. Ainsi, les modèles proposés peuvent servir à l'étude de différents troubles psychiatriques autant que pour l'étude de la schizophrénie.

L'approche générale utilisée pour créer un modèle animal pour l'étude de la schizophrénie consiste à reproduire l'un des aspects des maladies, soit l'un des endophénotypes qu'on retrouve chez l'humain en causant l'apparition d'un comportement/trouble équivalent chez l'animal [185]. En guise d'exemple nous citons l'étude du réflexe de sursaut ou PPI (pour PrePulse Inhibition) comme paramètre renseignant sur le trouble de filtrage sensoriel, ou l'étude des troubles mnésiques causés par la kétamine ou aussi les troubles dépressifs causés par des contraintes stressantes chez l'animal [185-188]. Malgré toutes les critiques qui peuvent être faites à leur sujet, ces modèles ont avancé l'état de connaissances sur la schizophrénie et ont même servis pour certains aux criblages thérapeutiques à la recherche d'alternative pharmacologique aux traitements actuels de la schizophrénie : les AP [185-188].

5. Les antipsychotiques

5.1. L'histoire des antipsychotiques

Le fou, l'idiot et l'imbécile des mots qui reflètent à perfection la perception collective de la schizophrénie au 19ème siècle. Une perception qui, malgré les avancées scientifiques de l'époque, frôle la diabolisation. En effet, dans un temps où la schizophrénie était l'équivalent de la folie, les schizophrènes étaient condamnés à la contention. Au mieux, ils étaient sujets aux traitements hypnotiques et sédatifs drastiques. En dehors de la maladie mentale, et à cette époque, des cocktails anesthésiques étaient utilisés dans la pratique chirurgicale [190]. Parmi ces cocktails figuraient des médicaments antihistaminiques. Ceci a conduit à la découverte du potentiel calmant de ces médicaments. Profitant des communications sur le sujet, Laborit a utilisé aux débuts des années 1950, un dérivé des phénothiazines: la chlorpromazine, chez les patients «agités». Il a remarqué que ce médicament produisait un état de «quiétude euphorique»: un état de désintéressement où les patients devenaient moins agités [191, 192]. La chlorpromazine était pour ça l'annonceur de la naissance de la neuro-psychopharmacologie mettant ainsi fin aux âges sombres de l'aliénation mentale. L'importance de la chlorpromazine dans le traitement de la schizophrénie et les maladies mentales a été soulignée par Jean Delay et Pierre Deniker, deux psychiatres français qui ont marqué l'histoire des médicaments AP [193]. Ces derniers ont instauré les bases du traitement par la chlorpromazine et les applications potentielles. Peu après, les effets de la chlorpromazine ont été rapidement confirmés dans plusieurs pays [190]. Cependant, et sensiblement dans la même période, des effets «tranquillisants» relativement similaires ont été rapportés pour la réserpine. L'utilisation étendue et plus prolongée de ces deux molécules a aidé à la cristallisation des principes de la cure neuroleptique [194]. Le terme neuroleptique (NL) signifie littéralement « qui prend (c.a.d affaiblit) le nerf » et était proposé pour décrire la réduction de l'agitation et le désintéressement inhérent à l'utilisation de la chlorpromazine ou la réserpine. Par ailleurs, dès les premières utilisations de la chlorpromazine, deux faits saillants ont pu se développer.

Premièrement la chlorpromazine, et les autres NL qui ont vu le jour agissaient uniquement sur une catégorie de symptômes de la schizophrénie: les symptômes positifs. Deuxièmement, des effets indésirables similaires aux symptômes moteurs de la MP accompagnaient toujours ces traitements NL [194]. Ces effets moteurs baptisés parkinsonisme ont été regroupés avec les dystonies sous le nom d'effets extrapyramidaux (EPS pour Extra Pyramidal Side Effects) puisqu'ils font appel au système moteur involontaire. Une décennie, après la découverte de la chlorpromazine, les EPS ont été estimés à plus de 40% des patients. D'autre part, l'utilisation des NL, devenue plus propagée et plus prolongée, a permis l'observation des effets tardifs et chroniques. Dans ce contexte, en 1956, fut rapportée pour la première fois l'apparition de mouvements orofaciaux causés par les neuroleptiques. Ces mouvements regroupés sous le terme « dyskinésie tardive » ont été décrits en 1959 en France par Sigwald [195]. Ainsi les effets secondaires moteurs, généralisés et confirmés dans plusieurs pays et par plusieurs études sont devenus un corollaire inévitable à l'utilisation des NL [190]. Ce qui a donné naissance à ce qu'on appelle le dogme neuroleptique (shen 1999). Ce dogme est résumé dans la définition d'un NL telle que posée par Delay et Deniker: un NL doit créer un état d'indifférence psychomotrice, doit être efficace vis-à-vis des états d'excitation et d'agitation, réduit progressivement les troubles psychotiques aigus et chroniques, possède des effets sous-corticaux prédominants et produit des symptômes extrapyramidaux et végétatifs [194].

D'autre part, dès le début de l'ère des NL, des chimistes se sont dévoués à chercher des molécules offrant une action plus puissante. Ces travaux étaient guidés par le dogme NL [194]. Dans le sens où les EPS servaient comme indicateur potentiel de l'activité NL d'une molécule. En 1958, l'halopéridol (HAL) a pu détrôner toutes les autres molécules déjà existantes. L'HAL présentait l'effet antipsychotique le plus important par rapport aux autres molécules déjà existantes sans engendrer pour autant la sédation caractéristique des NL. Les NL et à leur tête HAL ont changé le vécu des schizophrènes et des soignants les prenant en charge. Ces molécules ont mis fin aux méthodes physiques brutales et ont appelé à une nouvelle considération sociale de la schizophrénie [190, 194]. Néanmoins, les effets secondaires (moteurs et autres) et l'efficacité limitée quant

aux symptômes cognitifs et négatifs de la maladie persistaient comme entrave à ces traitements [190]. Plus loin, un composé synthétisé par une petite compagnie pharmaceutique (Wander) semble, selon leurs études, avoir un effet sur les psychoses sans qu'il cause des catalepsies chez les modèles animaux. Le composé appelé clozapine (CLZ) fut littéralement rejeté par la communauté scientifique à l'époque. Ce qui n'a pas empêché un autre groupe de chercheurs à continuer de l'exploiter et revenir avec des résultats plus encourageants. Au début des années 1970, les vertus neuroleptiques de la CLZ ont été démontrées par d'autres études [194]. Lors d'un congrès sur les AP, Paul Janssen a fini par admettre que si la CLZ s'avère un médicament NL, elle ne peut être qu'un NL atypique. Ainsi, le terme atypique était introduit pour décrire des molécules dont l'action antipsychotique ne corrèle pas avec l'apparition d'effets secondaires moteurs [190]. En 1988, Kane et collègues ont publié un article plaidant la supériorité de la CLZ sur la chlorpromazine. Ce qui a été conclu par l'introduction de la CLZ aux EU en 1990. La CLZ était, dès lors, le prototype d'une nouvelle classe antipsychotique qui promet une meilleure efficacité alliée à une meilleure tolérance. Le consensus actuel, compte tenu de cette historique, veut la classification de ces médicaments (NL) en AP typiques et AP atypiques.

Tableau 1: Antipsychotiques typiques disponibles au Canada

Antipsychotiques typiques disponibles au Canada		
Molécule	Dénomination commerciale	Classe chimique^[196]
Chlorpromazine	Chlorpromazine®	Phénothiazine
Flupenthixol	Fluxanol®	Thioxanthène
	Fluxanol Depot®	
Fluphénazine	Modecate®	Phénothiazine
Halopéridol	Haloperidol®	Butyrophénone
	Haloperidol Decanoate® (Action longue)	
Perphénazine	Perphenazine®	Phénothiazine
Pimozide	Orap®	Diphénylbutylpiperidine
	Apo-Pimozide®	
Pipotiazine	Pipotril L4®	Phénothiazine
Thiothixène	Navane®	Thioxanthène
Trifluopérazine	Trifluoperazine®	Phénothiazine
Zuclopendithixol	Clopixol®	Thioxanthène
	Clopixol Acuphase® (injection)	

Tableau adapté du manuel de pharmacothérapie « Therapeutic Choices, 2009 » [197]

5.2. Les antipsychotiques typiques (APT)

Pour la liste des APT disponibles au Canada voir Tableau 1.

5.2.1. Définition

Il s'agit de neuroleptiques « classiques », ou de première génération. On parle également d'AP typiques dans les pays d'Amérique du Nord. Nous retenons ici cette dénomination d'AP typiques. Les APT sont des médicaments similaires, en termes d'effets, à la chlorpromazine et la réserpine (dans le traitement des psychoses). Ces médicaments répondent donc le plus à la définition de Delay et Deniker. Ces molécules peuvent être classées selon leur structure chimique ou selon les effets cliniques.

i. Classification chimique

Les APT sont des molécules polycycliques de structure complexe qui se répartissent en quatre groupes principalement [198]

- Les phénothiazines: représentées par la chlorpromazine, la fluphénazine, et la thioridazine. La présence d'un halogène dans la structure de ces molécules est indispensable à l'activité antipsychotique et au passage de la barrière hémato-encéphalique (BHE). La chaîne latérale associée au noyau tricyclique détermine entre-autres l'affinité de la substance en question à d'autres récepteurs tels que les récepteurs de l'histamine, de l'acétylcholine ou récepteurs à la Noradrénaline)[198].
- Les butyrophénones: regroupe HAL et ses dérivés. La présence d'un atome de fluor dans la structure tricyclique est indispensable à l'action antipsychotique de ces molécules [198].
- Les benzamides: représentées principalement par le sulpiride (le sulpiride est parfois classé comme atypique). Ils sont chimiquement apparentés à la procainamide (anesthésique) et sont dotés d'une action antiémétique supérieure aux autres AP [198].

ii. Classification selon les effets cliniques

Il s'agit d'un concept développé et adopté surtout en Europe [199]. Dans ce cadre, plusieurs classifications cliniques ont été proposées. Il s'agit principalement de classifications bi-axiales qui catégorisent les AP selon un axe présentant un pôle sédatif et un pôle incisif (antipsychotique) ou désinhibiteur [199]. Nous en présentons deux: la classification proposée par Deniker et Ginestet en 1971 [200] et celle apportée par Davis en 1974 [201]. Selon Deniker et Ginestet, sur un axe sédatif-désinhibiteur, les AP peuvent être classés en 4 sous-groupes [200]

- * Les sédatifs (lévomépromazine et chlorpromazine)
- * Les AP moyens (thioridazine, propériciazine) présentent des effets thérapeutiques et secondaires modérés.
- * Les polyvalents (HAL, pipotiazine et fluphénazine): ce sont des molécules pour lesquelles domine l'action antipsychotique mais avec une action sédatif ou désinhibitrice (stimulante) importante
- * Les désinhibiteurs (sulpiride, prochlorpérazine)

La classification proposée par Davis fait abstraction des propriétés individuelles et propose un modèle où seule compte la posologie [201]. Dans cette classification on propose d'intégrer la notion d'équivalent-chlorpromazine. Ce concept permet de rapporter les effets des différents AP à l'effet d'une dose précise de la chlorpromazine. De façon plus simplifiée, tous les AP peuvent aboutir au même effet thérapeutique à condition de « moduler leur dose ».

5.2.2. Pharmacologie des APT

* Indications: les APT trouvent leur indication principale dans le traitement de la schizophrénie et les troubles schizo-affectifs. Cette indication englobe leur utilisation dans les épisodes aigus mais aussi dans le traitement de maintien de la schizophrénie. Ils sont également utilisés conjointement avec le lithium pour le traitement des accès

maniaques dans les troubles bipolaires. D'autres indications annexes neurologiques et non neurologiques existent pour les APT: comme l'intoxication par les psychostimulants, dans les symptômes non cognitifs de la démence dans la maladie d'Alzheimer, dans le syndrome de Gilles de la Tourette ou les vomissements résultant de la chimiothérapie [153].

* Effets indésirables: plusieurs effets ont été décrits pour les APT. Ces effets affectent aussi bien les systèmes en périphérie que le SNC [153]. En effet, des troubles cardiovasculaires comme l'hypotension, la prolongation de l'intervalle QT, et les arythmies ont été fréquemment décrits pour les APT. Les APT sont également responsables de troubles hépatiques (ictère) et endocriniens. Les troubles endocriniens les plus marquants sont l'hyper-prolactinémie, et l'impotence sexuelle. En outre des désordres métaboliques résultent du traitement chronique par les APT. Spécifiquement, une prise de poids importante a été rapportée avec la chlorpromazine. Un effet rare mais gravissime et associé à une mortalité élevée correspond à ce qu'on appelle le syndrome malin des NL (hyperthermie, troubles neurologiques, hypotension). Dans le spectre des effets indésirables des APT un volet important est réservé aux effets moteurs. Ces effets qui étaient jadis le corollaire de l'activité antipsychotique divergent en deux classes selon la durée du traitement. On en distingue les effets aigus qui apparaissent dans les premiers jours à premières semaines du traitement par les APT. Il s'agit principalement de dystonie, de bradykinésie et de parkinsonisme. Ces effets sont regroupés sous le nom des EPS. Des effets plus tardifs qui se développent dans les trois premiers mois suivant le traitement ont été également associés aux APT. Ces effets sont regroupés sous le terme « dyskinésie tardive ». L'importance des effets indésirables des APT et leur impact sur la non-adhérence au traitement ont motivé la recherche de molécules alternatives. C'est le cas des AP atypiques [153].

5.3. Les antipsychotiques atypiques (APA)

Pour la liste des APA disponibles au Canada voir Tableau 2.

5.3.1 Définition

Les AP atypiques (APA), anciennement identifiés comme NL atypiques, sont également appelés les AP de deuxième génération (ou NL originaux, en Europe). Chimiquement, les substances figurant dans ce groupe peuvent être réparties en trois classes [196]. Premièrement, les dibenzodiazépines (ClZ, olanzapine). La deuxième classe est celle des benzisoxazoles (rispéridone): ces molécules rappellent la structure générale des butyrophénones. La troisième et dernière classe des APA est la classe des imidazolidinones (sertindole) [196]. La notion d'équivalent-chlorpromazine a été également appliquée aux APA.

Tableau 2: Antipsychotiques atypiques disponibles au Canada

Antipsychotiques atypiques disponibles au Canada		
Molécule	Dénomination commerciale	Classe chimique ^[196]
Aripiprazole	Abilify®	Benzisoxazoles
Clozapine	Clozaril®	Dibenzodiazépines
	Gen-Clozapine®	
Olanzapine	Zyprexa®	Dibenzodiazépines
	Zyprexa Zydis®(dissolution-rapide)	
Palipéridone	Invega®	Benzisoxazoles
	paliperidone palmitate®	
Quétiapine	Seroquel®	Dibenzodiazépines
	Seroquel XR®(libération prolongée)	
Rispéridone	Risperdal®	Benzisoxazoles
	Risperdal M®(dissolution rapide)	
	Risperdal Consta®(action longue)	
Ziprasidone	Zeldox®	Benzisoxazoles

Tableau adapté du manuel de pharmacothérapie « Therapeutic choices, 2009 » [197]

5.3.2 Pharmacologie des APA

* Indications: Les APA, à l'exception de la CLZ sont approuvés comme traitement de première ligne de la schizophrénie et des troubles bipolaires. La CLZ est par contre réservée au traitement des formes résistantes de la schizophrénie, ainsi qu'à la baisse du comportement suicidaire chez les jeunes schizophrènes [153].

* Effets indésirables: tout comme les APT, les APA disposent d'effets indésirables périphériques et d'autres centraux. Les effets en périphérie sont surtout d'ordre métabolique. L'utilisation chronique des APA a été corrélée à une prise très importante de poids. La prise de poids causée par les APA dépasse en importance la prise pondérale causée par les APT [202-204]. La clozapine est la molécule qui cause le plus de prise pondérale avec une valeur moyenne de 4.45 kg sur 10 semaines [202-205]. L'olanzapine talonne la clozapine avec une valeur moyenne de 4.15 kg [202, 203]. Un autre effet métabolique dérangent associé à l'utilisation de beaucoup d'APT est l'hyperprolactinémie et peut affecter directement la santé sexuelle des patients. Cet effet est surtout associé à l'usage de la rispéridone [206]. Malgré que la définition première des APA soit basée sur l'absence d'EPS, l'usage prolongé et plus répandu des APA a nuancé ce postulat [207]. En effet, on sait maintenant que les effets moteurs tels que la rigidité, la dystonie, le tremblement, l'hypokinésie ou l'akinésie peuvent apparaître suite à un traitement chronique à base d'APA[207].

Nous constatons que les deux classes d'AP, toutes les deux antagonistes des récepteurs dopaminergiques, déploient des spectres parfois superposés d'EI. Cependant, les APA ont été toujours avancés comme supérieurs aux APT et ce, depuis leur introduction [207]. Si cette supériorité était fondée au départ sur l'absence d'EI moteurs, elle était généralisée à tous les aspects caractérisant la classe des atypiques. Mais à quoi tient l'atypicité de ces molécules.

5.4. Pharmacodynamie des médicaments antipsychotiques

Les médicaments appartenant à la classe des AP sont des ligands obligatoires des R-D2 de la DA. La majorité des AP agissent en guise d'antagonistes de ces récepteurs et bloquent donc l'activation de ceux-ci par leur ligand naturel. Le peu de molécules qui restent (Aripiprazole) agissent à titre d'agoniste partiel dont le sens de l'activité dépend de la présence ou l'absence de la DA. Le blocage des R-D2 est essentiel pour l'activité antipsychotique de la substance. Toutes les tentatives de développer des molécules dénuées de cette propriété et qui soient efficaces dans le traitement de la schizophrénie ont échoué [208]. Malgré ce point en commun, les AP se départagent entre eux. Alors que les APT sont des antagonistes des R-D2 puissants qui déterminent une forte occupation de ces récepteurs, les atypiques occupent faiblement les R-D2. Cette différence de liaison a incarné la controverse d'atypicité. De nombreux mécanismes étaient proposés pour l'expliquer (dissociation rapide, une plus haute affinité à d'autres classes de récepteurs), point que nous traitons dans le paragraphe suivant. Outre les R-D2, il a été découvert que les AP agissent sur d'autres types et sous types de récepteurs (histaminiques, sérotoninergiques, cholinergiques, noradrénergiques) [209]. Cette action, quoique relativement variable d'une molécule à une autre semble être globalement constante pour la classe de l'AP en question. Ainsi, un « profil récepteur » général peut être dégagé pour décrire chaque classe d'AP. La contribution de ces récepteurs annexes est nébuleuse. En effet, chacun de ces récepteurs sollicités par une molécule AP pourrait contribuer à l'effet thérapeutique de ces molécules. Ceci a été particulièrement démontré pour la composante sérotoninergique de la CLZ. En effet, on propose que la liaison de la CLZ aux 5HT-2A se traduise par un effet anxiolytique et antidépresseur cliniquement recherché. Mais le postulat le mieux accepté reste que l'implication de ces récepteurs annexes est plutôt palpable dans les effets indésirables. Par exemple, une action plus forte sur les récepteurs histaminiques expliquerait le risque accru de troubles métaboliques associés aux APA [203]. Le tableau 3 récapitule l'action de plusieurs molécules AP sur différents types de récepteurs.

5.5. Quoi de typique pour un antipsychotique atypique ?

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer l'atypicité et donc la supériorité des APA

1- Faible affinité aux récepteurs D2:

Historiquement cette hypothèse fut la première à être avancée. Elle émane des travaux de Seeman, P. en 1975 et en 1976 qui ont dicté en grande partie l'hypothèse dopaminergique de la schizophrénie [161, 210]. Dans ces travaux et se basant sur des études de liaison aux récepteurs (Binding assays) en présence de ligands marqué, Seeman a établi une corrélation entre l'effet antipsychotique aux doses thérapeutiques usuelles (seules les typiques existaient à l'époque) et entre l'affinité pour les R-D2. L'affinité à un récepteur étant un paramètre pharmacodynamique d'une molécule par rapport à un récepteur donné qui détermine la capacité de fixation de cette molécule à ce récepteur. Par définition l'affinité est évaluée par la concentration du ligand occupant 50% des récepteurs (cette concentration est caractérisée également par la constante de dissociation K_d). Ainsi, l'affinité conditionne directement l'occupation du récepteur en question. Les investigations plus poussées (utilisation des techniques de PET-SCAN) et leur champ d'application plus élargi, il a été mis en évidence qu'une occupation de 65-80% des R-D2 au niveau du striatum est nécessaire pour l'activité antipsychotique des APT. Une occupation \geq à 80% marquait l'apparition des EPS [211-213]. En revanche, la CLZ, l'icône de l'atypicité, montrait une affinité plus basse aux R-D2 du striatum et n'occupait que 38-63% de ce pool de récepteurs [214]. Ainsi, cette hypothèse était formulée telle que la CLZ cause moins d'EPS car elle présente une affinité plus faible aux R-D2. De même, il a été proposé que les APT améliorent les symptômes psychotiques en bloquant les R-D2 dans les noyaux mésolimbiques (NAc, et cortex), alors que le blocage de R-D2 dans le caudé-putamen serait lié à l'apparition des effets moteurs secondaires. Cependant, avec l'entrée des autres APA sur scène, des doutes furent rapidement semées quant à la véracité de cette hypothèse. Tout d'abord, la corrélation joignant l'affinité aux R-D2 à l'efficacité clinique ne peut pas être étendue aux APA. En effet, l'efficacité clinique

de la CLZ ou la quétiapine tranche avec leur taux d'occupation très faibles. En outre, ce profil de faible affinité n'est pas partagé par tous les APA. Puisque la risperidone classée comme atypique présentait des taux d'occupation des R-D2 similaires à ceux de l'HAL sans pour autant causer des EPS au même degré [215]. En prime, alors que l'occupation des R-D2 est quasi-constante par la CLZ, elle se comporte comme phénomène dose-dépendant pour plusieurs AP. Donc l'augmentation de la dose est capable de virer une occupation faible, qu'on pense caractéristique des APA, à une occupation plus élevée rappelant celle des typiques.

Par ailleurs, pour infirmer ou confirmer l'hypothèse de l'affinité aux R-D2 une révision des techniques utilisées s'est imposée profitant de l'introduction de nouveaux ligands radio-marqués nettement plus spécifiques que le 11C-Raclopride classiquement utilisé. De force est de constater, que les premières études de neuro-imagerie documentaient seulement l'occupation striatale. Ces techniques ciblaient uniquement le striatum, région où les R-D2 sont les plus concentrés [216]. Les nouvelles techniques utilisant des dérivés fluorés hautement spécifiques comme le [18F]-fallypride ou la [18F]-setoperone ont d'une part revisité les taux d'occupation obtenus et d'autres part étendu l'investigation à d'autres régions cérébrales. Ces nouveaux ligands dotés d'une très haute affinité (à des quantités suffisantes pour la détection en PET) sont, à l'encontre du 11C-Raclopride, capables de lier les récepteurs extrastriataux [217].

En guise d'exemple, ces études ont démontré que l'occupation des R-D2 par l'olanzapine n'est pas différente de celle de l'HAL aussi bien dans le putamen, le striatum ventral, le thalamus, l'amygdale, ou le cortex temporal, que dans la SN et la VTA. Ces résultats ont motivé une série d'études ciblant les récepteurs extra-striataux. De ces études, nous retenons que l'occupation des R-D2 est un phénomène région-spécifique. Ainsi, l'occupation corticale par les médicaments AP est en moyenne plus élevée que l'occupation striatale. Ces différences régionales conditionnent l'écart entre les AP typiques et atypiques. Toutefois, l'écart le plus élevé entre les taux d'occupation entre l'HAL et la CLZ se situe premièrement au niveau de la SN-VTA, région où la CLZ est très faiblement liée aux R-D2. En revanche, des études viennent contester l'importance des R-

D2 extrastriataux dans la réponse aux AP. Ces études ont ramené les R-D2 sur le devant de la scène en liant l'occupation des R-D2 striataux à une amélioration des symptômes psychotiques [218, 219]. En somme, la faible affinité pour les R-D2 ne peut être considérée comme marqueur d'atypicité, mais elle peut cependant renseigner sur le comportement de certaines molécules. En sus, l'existence de différences ailleurs que dans le striatum pourrait apporter des nouveaux éléments pour conforter cette hypothèse.

2. La dissociation rapide: « the fast-off theory »

Dans cette hypothèse, on postule que la différence entre un AP typique et un autre de caractère atypique est la vitesse avec laquelle ses deux molécules se dissocient des R-D2. Initialement cette hypothèse est apparue comme corollaire de la faible affinité des APA aux R-D2. En effet, il a été avancé que ces récepteurs longuement occupés par des APT ne peuvent pas subir une stimulation normale par la DA endogène [220, 221]. L'affinité reste cependant un concept qui décrit un état d'équilibre obtenu entre le ligand et son récepteur à une concentration donnée. Pour ce, son interprétation ne peut être absolue et le concept de dissociation a été, pour ce, introduit. La constante de dissociation K_d (=l'inverse de l'affinité) est évaluée par le ratio de la constante de dissociation par la constante d'association d'une molécule. Considérant que les constantes d'association des différents AP sont quasi-similaires pour les R-D2 (en changeant les concentrations), seule la constante de dissociation entrera en ligne de compte pour différencier deux molécules. Ainsi, les AP présentant la plus haute affinité vont se dissocier plus lentement. Ceux moins affins aux R-D2 auront une vitesse de dissociation plus rapide [220, 221].

Le point fort de cette hypothèse réside dans la conjugaison des paramètres pharmacodynamiques des AP à leur réponse physiologique. En effet, en se liant fortement et se dissociant lentement des R-D2, les APT ne permettront pas l'accès à la DA. Les APA par contre seront permissifs d'une réponse aux fluctuations physiologique de la DA environnante. Ce faisant, ces récepteurs gardent une interaction « physiologique » avec la DA qui prévient l'apparition des EPS. Dans la nouvelle version de cette hypothèse il a été précisé que la stimulation dopaminergique des R-D2 libérés de

leurs ligands n'est pas un phénomène aléatoire. Cette stimulation exige que la vitesse de dissociation de la molécule en question doit se produire dans le même intervalle du temps que les pics de concentration de la DA endogène [220]. Cependant, malgré que la dissociation plus rapide de la CLZ par rapport aux APT ait été confirmée, et que cette hypothèse explique parfaitement le comportement de certains AP (amisulpiride), une lacune majeure demeure à combler. En effet, comment deux AP peuvent disposer d'une efficacité clinique semblable tout en détenant deux vitesses de dissociation différentes. Par ailleurs, comment expliquer que des molécules atypiques présentent une dissociation similaire à celle de l'HAL (cas du sertindole, de la risperidone, de l'asenapine, et du ziprasidone). Cette hypothèse, quoique fortement intéressante, ne peut rendre compte du continuum de l'atypicité et continue toujours à être confrontée par les autres hypothèses.

3. L'affinité à des récepteurs dopaminergiques autres que les R-D2

Si le blocage des R-D2 est la définition première d'une molécule antipsychotique, l'antagonisme des autres récepteurs dopaminergiques est au même titre un concept prouvé pour les deux classes des AP [222]. L'affinité des AP à d'autres récepteurs dopaminergiques peut même dépasser celle pour les R-D2, comme dans le cas de la CLZ (en ce qui concerne les R-D1 et les R-D4, voir tableau 3). Les récepteurs concernés sont surtout les R-D1, R-D3 et les R-D4. Pour commencer, il a été révélé que la CLZ est un agoniste partial des R-D1 qu'elle occupe à un plus grand taux que les autres AP [223]. De même une plus grande affinité aux R-D4 a été associée à la CLZ [90]. Le R-D3 a par contre suscité un plus grand intérêt vu sa localisation spécifique dans les régions limbiques du striatum et donc sa probable implication dans la pathologie de la schizophrénie. Nous discutons ce point plus loin dans l'ouvrage. L'affinité à une autre classe de récepteurs a par contre motivé un très grand nombre d'études, voire même la synthèse de molécules qui ont été testées en clinique. Il s'agit des récepteurs serotoninergiques.

Tableau 3: Différentes affinités des AP à différentes classes de récepteurs.

-: affinité très faible voire nulle, +: faible, ++: modérée, +++: élevée, ++++: très élevée

Récepteur/Antipsychotiques	Halopéridol	Clozapine	Olanzapine	Amisulpiride	Aripiprazole
Dopaminergiques	R-D1	+	+	++	-
	R-D2	++++	+	++	++++
	R-D3	+++	+	+	++
	R-D4	+++	++	++	-
Sérotoninergiques	5-HT1A	-	-	-	++
	5-HT1D	-	-	-	+
	5-HT2A	+	+++	+++	-
	5-HT2C	-	++	++	-
	5-HT6	-	++	++	-
	5-HT7	-	++	-	-
					++
Adrénnergiques	α 1	+++	+++	++	-
	α 2	-	+	+	-
Histaminiques	H1	-	+++	+++	-
Muscariniques	m1	-	++++	+++	-

(Tableau modifié et adapté à partir de Miyamoto, S, 2005 [209])

4-Hypothèse sérotoninergique:

Cette hypothèse prend origine des études démontrant que la CLZ, ainsi que d'autres APA, montrent une affinité plus élevée pour les récepteurs 5-HT_{2A} (R-5HT_{2A}) par rapport aux R-D2 (voir tableau 3). Les adeptes de cette hypothèse ont avancé que l'affinité à ces récepteurs serait le substrat de la différence entre les AP typiques et atypiques. Dans ce contexte, les APA agissent comme des agonistes inverses des R-5HT_{2A} pour contrer leur activation excessive tout en bloquant de façon modérée les R-D2 [224-227]. Cette hypothèse s'aligne avec les études démontrant les changements de la neurotransmission sérotoninergique ayant lieu chez les schizophrènes [228, 229]. Elle s'inspire également du contrôle sérotoninergique exercé sur la neurotransmission dopaminergique. Cependant, pour une affinité similaire aux R-5HT_{2A}, les AP se comportent différemment quant à la génération d'EPS [221]. En plus l'affinité aux R-5HT_{2A} ne semble pas corrélée avec le blocage des R-D2 et donc du seuil d'apparition des effets indésirables [230, 231]. En réponse à ces contre-arguments, l'hypothèse sérotoninergique dans sa version revisitée, propose d'intégrer l'affinité à d'autres récepteurs sérotoninergiques autres que le R-5HT_{2A}, tels que les récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT_{2C}, 5-HT₆ ou encore 5-HT₇ [225, 232]. Cette hypothèse a le mérite de renforcer l'arsenal thérapeutique avec de nouveaux antipsychotiques (APA) présentant une affinité plus élevée aux R-5HT_{2A} et représentant des traitements de première ligne en psychiatrie (olanzapine...)

5.6. Les mécanismes post-récepteurs

Si les mécanismes relatifs au blocage et/ou l'activation de récepteurs ont servi de tronc commun pour le débat sur l'atypicité, les mécanismes au-delà des récepteurs, eux, restent moins explorés. Ces mécanismes en aval de la liaison d'un AP à son récepteur sont également dénommés les mécanismes post-récepteurs. Ils se déclinent en deux types: des mécanismes relatifs aux cascades signalétiques sollicitées par la liaison de la molécule AP à un récepteur donné et des mécanismes relatifs à la modulation de

l'expression de certains gènes. Les mécanismes relatifs aux cascades signalétiques constituent la traduction directe de l'action pharmacodynamique sur les récepteurs dopaminergiques, étant la principale cible des AP. Ces mécanismes calquent, dans leur complexité, la diversité des voies de signalisation que peut déclencher les R-D2. Cependant, le nombre d'études consacrées à explorer ces voies reste limité par rapport à d'autres médicaments. En plus, la modulation complexe que peut exercer l'une ou l'autre classe des AP rend l'interprétation des résultats parfois difficile. On sait toutefois que les AP, antagonistes des R-D2, sont logiquement médiateurs de l'activation des voies qui étaient réprimées par l'activation de ces récepteurs. Ceci est le cas pour les voies dépendantes de la PKA qui sont inhibées par l'activation des R-D2. Ainsi, les AP ont été démontré capables d'augmenter la production de l'AMPc dans différents modèles d'étude. L'effet des deux classes d'AP sur d'autres cascades telles que la voie des MAPkinases ou la voie de Akt/GSK3 est plus compliqué. Cet effet dépend énormément du type cellulaire utilisé (in vivo ou in vitro), de la région étudiée (on note par exemple une régulation différentielle des APT de ERK dans le cortex et dans le striatum), du paradigme expérimental (durée de traitement, le temps d'attente après la dernière dose administrée...) (pour une revue voir [233]). Nous présentons dans les tableaux 4 et 5, un résumé des effets des AP sur les voies de signalisation.

Cependant, l'activation ou inactivation de ces cascades devrait se produire rapidement après la liaison de l'AP à son récepteur. Il est connu toutefois qu'un temps de la latence est nécessaire entre le début du traitement et l'apparition d'amélioration clinique [234]. Pour ce, il a été avancé que les mécanismes post-récepteurs relatifs aux cascades signalétiques restent un maillon intermédiaire dans le chaînon conduisant aux adaptations comportementales et cellulaires inhérentes à l'action des AP. Le dernier maillon serait les gènes qui, modulés, vont traduire une action pharmacologique en une réponse cellulaire à long terme et ceci en modifiant l'expression génique.

Plusieurs études utilisant des puces à ADN (des Microarrays) se sont attardées sur l'étude de gènes dont l'expression est modulée (expression augmentée ou abaissée) suite à l'administration d'AP. Ces études documentent la modulation de plusieurs

dizaines de gènes par l'action des deux types de molécules. Ces gènes appartiennent à différentes classes. Nous citons: les gènes codant pour des protéines présynaptiques comme la Vamp1 (pour vesicle associated membrane) ou la syntaxine 1A, ou la Snap25 (pour synaptosomal associate protein 25 kDa). Ces gènes sont généralement modulés de la même façon par HAL et la CLZ. Cette modulation a été interprétée comme un effet des AP sur la plasticité synaptique [235]. Par ailleurs, des gènes qui ont démontré une association positive avec la physiopathologie de la schizophrénie sont également affectés par les AP. En guise d'exemple: les gènes Arrb2, Bcl2-like 1 (Bcl2l1), COMT, les gènes codant pour les récepteurs glutamatergiques [235]. Les AP modulent également l'expression de facteurs neurotrophiques tels que le BDNF [233]. Une autre classe de gènes suscite notre intérêt, les facteurs de transcription. Ces gènes ont la capacité de se lier à l'ADN et peuvent donc dicter des changements profonds à long terme, d'où leur importance. Il a été démontré que les AP affectent l'expression de plusieurs facteurs de transcription tels que: Homer1, Arc, Zif286... Mais classiquement le facteur de transcription le plus étudié reste le c-fos. C-fos étant un facteur de transcription et un gène d'induction précoce. L'induction de c-fos a été avancée comme « read-out » du profil pharmacologique des AP. En effet, une induction au niveau du NAc serait un point commun de tous les AP qui induisent ce facteur [236]. Par contre, l'induction au niveau cortical a été proposée comme paramètre évaluant l'efficacité sur les symptômes négatifs par les APA [237]. Le potentiel de générer des EPS serait corrélé à une induction de c-fos dans le striatum dorsal, ce qui est indicatif de la production des EPS [238]. Cependant, il s'est avéré que le c-fos n'interagit pas avec l'enképhaline, présumée être le pivot des effets à long terme de l'HAL [239]. Ce qui nous laisse penser que d'autres facteurs de transcription seraient plus propices à expliquer les effets de cet AP.

Tableau 4: Cascades signalétiques modulées par un traitement aigu à base de traitement antipsychotique.

La voie de signalisation	Traitement Aigu	
	Halopéridol, ou autre APT	Clozapine ou autre APA
La voie de la PKA	↑ activité de la PKA dans le striatum dorsolatéral [240]	↓ activité dans le PFC [240]
DARPP-32	↑ phosphorylation au niveau de la Thr34 [241, 242]	↑ phosphorylation au niveau de la Thr34 et Thr75 [242]
Les voies des MAPKinases	↑ phosphorylation ERK1/2 dans les neurones en culture [243]	↑ phosphorylation ERK1/2 dans les neurones en culture [243]
	↑ phosphorylation ERK1/2 dans les cellules PC12 [244]	↑ phosphorylation ERK1/2 dans les cellules PC12 [244]
	↑ phosphorylation ERK1/2 dans le striatum dorsal de la souris [241, 245]	↓ phosphorylation ERK1/2 dans le striatum dorsal de la souris [241, 245]
	↑ phosphorylation ERK1/2 dans le cortex les 30 premières minutes	↑ phosphorylation ERK1/2 dans le PFC [245]
	suivie par ↓ phosphorylation ERK1/2 [245, 246]	
Akt/GSK3	↑ phosphorylation d'Akt1 au Thr308 [247]	↑ phosphorylation de la GSK-3β a la Ser9 [248]
Voie dépendantes de la β-Arrestine-2	tous les AP (à l'exception de l'aripiprazole) bloquent le recrutement de la β-Arrestine-2 [249]	

Tableau inspiré de Molteni et al; 2009 [233].

Tableau 5: cascades signalétiques modulées par un traitement chronique à base d'antipsychotiques.

La voie de signalisation	Traitement chronique	
	Halopéridol, ou autre APT	Clozapine ou autre APA
La voie de la PKA	↑ activité de la PKA dans le striatum [250]	↓ activité de la PKA dans le striatum, hippocampe, et cortex frontal [250]
DARPP-32		
Les voies des MAPKinases	Pas d'effet spécial [251]	↑ phosphorylation ERK1/2 dans le PFC [251]
	↑ phosphorylation ERK1/2 dans le Nac deux heures après le traitement [246]	
	↑ phosphorylation ERK1/2 dans la membrane 24 heures après le traitement [246]	
Akt/GSK3	↑ phosphorylation au Thr308 et Ser473 [247]	
	↑ phosphorylation de la GSK-3β a la Ser9 [247]	
Voie dépendantes de la β-Arrestine-2		

Tableau inspiré de Molteni et al; 2009 [233].

5.7. La supériorité des antipsychotiques atypiques: réalité ou illusion

En absence d'hypothèse parfaite les deux classes de médicaments règnent toujours sur la pharmacologie des désordres psychotiques. Néanmoins, la supériorité des APA est toujours revendiquée. Cette supériorité est toutefois ni homogène ni solide. En effet, ces dernières années des études de grande envergure durant sur des années et portant sur une grande population de sujets schizophrènes ou naïfs se sont penchées sur le sujet afin d'établir un bilan objectif quant à l'efficacité et l'innocuité des deux classes d'AP. Trois études phares retiennent notre attention. Il s'agit de l'étude CATIE (Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness) lancée par le NIH, l'étude CUtLASS (Cost Utility of the Latest Antipsychotic Drugs in Schizophrenia Study) menée en Angleterre et l'étude EUFEST (European First-Episode Schizophrenia Trial) menée en Europe sur 498 patients [252]. Ces études de par le monde ont conclu en l'absence de supériorité présumée. Cette conclusion touche aussi bien l'efficacité clinique que les effets indésirables, tout en intégrant les coûts des différents traitements et l'adhérence des patients. Ces études, outre la révision des protocoles cliniques, appellent à une nouvelle gestion des effets indésirables des APT. Les effets indésirables associés aux deux classes d'AP sont de nature, de fréquence et de gravité diverses.

Chapitre V: Les dyskinésies tardives

« La symptomatologie constitue un groupement clinique bien typique : la langue participe activement à cette agitation motrice continue ; le mouvement est toujours rythmé et consiste habituellement en un va et vient d'avant en arrière avec saillie, entre les arcades dentaires et les lèvres. Lorsque le mouvement est plus complexe, la pointe se dirige alors latéralement, pouvant soulever les joues, sans dominance nette pour la droite ou la gauche. Plus rarement, c'est un mouvement encore plus complexe d répétition avec torsion de la langue sur elle-même (...). Les lèvres participent à la dyskinésie sous forme de mouvements stéréotypés de succion, de pincement, d'éversion, de mâchonnement incessant en synergie alors avec une contraction rythmée des mâchoires. » (Première classification des DT donnée par Sigwald en 1959).

1. Description

La dénomination dyskinésie tardive (DT) désigne un ensemble de mouvements anormaux involontaires et sans objectif. Ces mouvements sont inhérents à la prise prolongée de médicaments dotés de propriétés antagonistes dopaminergique [253-255]. On parle donc d'une condition iatrogène secondaire à un traitement pharmacologique. Ils apparaissent habituellement après un délai d'au moins 3 mois de prise médicamenteuse, et après le premier mois d'utilisation chez les personnes âgées (DSM-IV-TR, [256] (d'où la qualification de tardives). Les DT portent principalement sur la sphère oro-faciale (lèvres, langue et bouche). Pour ce, les DT étaient désignées au début par le terme « syndrome buccolinguomasticatoire ». Les mouvements anormaux au niveau de la musculature orofaciale sont de nature variable. On retrouve des mouvements de rétraction, de claquement, de protraction de la langue (« fly-catching »), de mâchonnement, des mouvements de léchage...Néanmoins, d'autres systèmes musculaires peuvent être affectés par les DT [254, 255]. Ainsi, les DT peuvent être décrites pour l'hémiface supérieure, le tronc, le cou, les membres supérieurs et inférieurs. Ces mouvements se traduisent plutôt par des redressements involontaires du tronc, par des mouvements de flexions-extension alternés, par un pianotage involontaire des doigts, par des balancements des bras, par des croisements des jambes, ... Des

stéréotypies vocales (gémissements...) et respiratoires (respirations arythmiques et bruyantes) [255].

D'autres troubles moteurs tardifs peuvent être associés au traitement par les AP. C'est le cas de dystonies tardives ou d'acathisie tardive. Ces manifestations sont moins communes que dans les DT. Ils présentent certains points de différence rendant le diagnostic différentiel plus aisé. Ces troubles diffèrent des DT par leurs manifestations cliniques: les dystonies sont des mouvements de contraction musculaire, et l'acathisie est l'impossibilité de maintenir la position assise. Ils diffèrent également par leur chronologie d'apparition: ils sont généralement détectés avant les DT. Ils diffèrent aussi dans leur gestion thérapeutique: ils ne répondent pas aux mêmes traitements préconisés pour les DT [257].

Les répercussions des DT sont loin d'être négligeables. Elles sont premièrement d'ordre physique. En guise d'exemple, les DT orofaciales peuvent causer des lésions de la gencive, des troubles mandibulaires (à titre de dégénérescence de l'articulation temporomandibulaire, ou de luxation mandibulaire), une douleur buccofaciale chronique. Ces troubles peuvent engendrer une perte de poids voire une cachexie ou des troubles de l'élocution [255]. En sus, les DT du tronc et des membres peuvent perturber la locomotion et augmenter les chutes traumatisantes [258]. De surcroît, les DT sont généralement irréversibles [259].

Elles sont, par conséquent, des troubles potentiellement invalidants qui imposent un carcan aux malades et entravent leur vie sociale et leur réhabilitation. Rappelons aussi que la DT peut survenir notamment chez des schizophrènes souffrant déjà problèmes de stigmatisation et de problèmes d'intégration sociale. Ces sujets souvent anosognosiques n'ont pas toujours conscience de l'existence de ces mouvements dyskinétiques que leur entourage se charge volontiers de leur signaler. Par ailleurs, les sujets sous AP, contraints à cette condition, sont plus enclins à l'abandon du traitement.

Plusieurs médicaments peuvent être qualifiés de dyskinésigènes. Il s'agit principalement de médicaments AP, antiémétiques, antiparkinsoniens, antidépresseurs

tricycliques et inhibiteurs de la recapture de la sérotonine, de lithium, d'antiépileptiques, ou d'antihistaminiques [260]. Plus rarement, les contraceptifs oraux ont été incriminés dans le développement de dyskinésies. Néanmoins, le terme DT est associé habituellement à l'usage d'AP.

La prévalence des DT est évaluée à 30% (estimation moyenne) des patients traités avec les APT [258]. Cette prévalence change énormément en fonction de la population étudiée, pour cela, il est plus rationnel de considérer l'incidence annuelle de des DT plutôt que leur prévalence [258, 261]. Cette incidence tourne constamment autour de 5% pour la première année d'exposition. Elle est de plus en plus importante avec le nombre d'années d'exposition. Une donnée de plus en plus pertinente affirme que les APA peuvent causer à leur tour des DT. En effet, l'incidence annuelle des DT chez des sujets traités par les APA chiffre à 3.9% alors qu'elle est de 5.5% pour les sujets sous APT. De même cette incidence varie entre les molécules du groupe [262]. Dans une méta-analyse faite sur 54 études cliniques, la rispéridone s'affiche comme la molécule la plus dyskinésigène de son groupe, talonnée par la ziprasidone et l'olanzapine. La quietiapine et la clozapine se classent aux derniers rangs avec un potentiel quasi-nul pour la CLZ [263]. Notons que même les tous nouveaux APA comme l'aripirazole ne sont pas épargnés.

D'autre part, l'épidémiologie de la DT varie également en fonction de la tranche d'âge étudiée. En effet, l'incidence des DT culmine chez les personnes âgées faisant abstraction des molécules utilisées. Ce qui se traduit par une incidence de 5.2% indépendamment du traitement en cause (typique ou atypique soit-il) [262]. Effectivement, l'âge est considéré le facteur de risque le plus important et le moins controversé dans l'apparition des DT. La prévalence des DT est multipliée par un facteur de 4-5 chez les sujets âgés de 60 ans ou plus (la prévalence peut atteindre 56% chez cette population). L'apparition des DT est également plus précipitée chez les sujets âgés. D'autres variables comme le sexe féminin, la présence d'autres désordres neurologiques, la dose cumulative, l'utilisation de certains APT (Hal, Fluphénazine) ou de certaines

formulations (les formulations à libération prolongée), s'affichent comme autres facteurs de risque potentiels [261].

La chronologie d'évolution de la DT tout comme son pronostic est imprédictible. Dans 60% des cas, les DT persistent même après arrêt du traitement [264]. Cependant, les DT peuvent s'améliorer spontanément. Par ailleurs, des cas de rémission spontanée ont également rapportés [265]. Contrairement à d'autres types de dyskinésies, les fenêtres thérapeutiques (cessation du traitement pour une période) ne sont pas bénéfiques pour les DT. L'exacerbation des DT préexistantes voir même l'apparition de nouveaux désordres, suite au retrait, ont été rapportées [266]. L'émergence de cette « dyskinésie de retrait » est le plus fréquemment observée chez les sujets jeunes.

Des stratégies cliniques ont été adoptées pour soulager la DT. Ces stratégies s'articulent autour quelques molécules qui ont démontré un potentiel de bénéfice comme: la tétrabénazine (Nitoman), le clonazépam (Rivotril), la vitamine B6 [267]. Ces molécules ne sont toutefois efficaces que chez un nombre limité de patient [267]. Deux nouvelles approches qui se basent sur les injections de toxine botulique (chez les patients avec prédominance faciale), ou la stimulation électrique profonde du GP montrent une efficacité importante. L'utilisation de ces deux approches ne peut toutefois être répandue à tous les patients vue les contraintes techniques et financières [268].

Comme nous l'avons mentionné dans l'histoire des AP, les DT furent décrites dès l'aube de la découverte des NL classiques. L'introduction des APA a incarné donc l'espoir de voir disparaître un tel effet indésirable invalidant. Cependant, trois décennies plus tard, il devient clair que l'espoir n'était qu'illusion. Les DT remontent en surface avec les études qui montrent que des APA causent l'apparition des DT. La CLZ est le moins dyskinésigène dans son groupe. Toutefois, les effets indésirables qui lui sont associés limitent son utilisation clinique. D'autre part, les désordres psychologiques sont de plus en plus diagnostiqués. Et les AP (de façon générale) sont de plus en plus appelés à des applications psychiatriques autres que la schizophrénie. Nous nous retrouvons ainsi devant une situation où face au tarissement des alternatives thérapeutiques nous devons composer avec les AP actuellement disponibles. Par conséquent, une prise en charge

globale et une appréhension plus approfondie des DT doivent être de mise. Il s'avère impératif de cerner la physiopathologie de ces troubles. Dans cette optique, il a été indispensable de développer des modèles qui se rapprochent le plus des DT observées chez l'humain.

2. Les modèles animaux de la dyskinésie tardive¹

2.1 Le modèle des rongeurs

Alors que le cochon d'inde a été utilisé pour modéliser les DT, depuis les années 1970, les souris et les rats restent les espèces les plus sollicitées [269]. Le paradigme expérimental habituellement utilisé consiste à administrer un médicament AP en chronique (3 semaines habituellement) et de suivre le long du traitement l'apparition de mouvements anormaux. La visualisation des mouvements se déroule habituellement lors de sessions de 2-5 minutes dans une cage munie d'un miroir, après avoir habitué l'animal à son environnement. Les protocoles incluant l'HAL sont les plus fréquents et les plus communs. Les autres APT sont moins étudiés et leurs résultats moins validés. Outre la catalepsie rappelant la rigidité secondaire aux APT chez l'humain, les rongeurs répondent en montrant des mouvements anormaux exclusivement oraux [269]. Les mouvements anormaux universellement répertoriés consistent en des mouvements oraux simulant le mâchonnement en dehors de toute activité physiologique de mastication ou de recherche de nourriture, et rappelant les dyskinésies orofaciales. Ces mouvements ont été baptisés Vacuous Chewing movements ou VCM. Ces VCM se présentent en salves d'intensité modérée accompagnées de la protraction de la langue. La prévalence de ces VCM chez les rongeurs traités en chronique par les APT est estimée entre 30-50% [269-271]. Toutefois, deux types de VCM peuvent être distingués: les VCM précoces et les VCM tardifs. Les VCM précoces s'installent un à vingt-et-un jours après l'exposition aux APT. Ces VCM s'améliorent suite à l'administration d'anticholinergiques. Pour ce, il a été proposé que ces VCM modélisent mieux les EPS (parkinsonisme,

¹ Les informations sur les modèles animaux des DT sont principalement tirées de la revue du Dr. Blanchet (Blanchet et al ; 2012)

dystonie) plutôt que les DT. Les VCM tardifs, quant à eux, semblent mieux calquer les DT. En effet, ils se déclarent à partir de 3 mois du traitement et ne répondent pas aux anticholinergiques. Globalement, les VCM disparaissent dans les 2 semaines suivant l'arrêt du traitement en cause. Une rémission plus lente à été également documentée [269, 270, 272]. Autre que la réponse comportementale, les rongeurs recevant le traitement AP, développent des changements biochimiques et histologiques proches de ceux observés chez l'humain. Particulièrement les signes de la dégénérescence neuronale au niveau de la SNc ou des changements de la morphologie des synapses au niveau du striatum ont été retrouvés chez ce modèle [273].

Ce modèle demeure le modèle le plus utilisé pour les DT. En effet, ce modèle permet une approche plus simple pour étudier les DT tout en garantissant la reproduction de certains traits caractéristiques du phénomène. La popularité de ce modèle s'explique aussi par la facilité d'accès aux rongeurs, par la simplicité du protocole et par les couts faibles qu'il exige. Néanmoins, ce protocole ne permet pas une reproduction parfaite de la phénoménologie des DT observée chez l'humain. En effet, malgré que les VCM rappellent fortement les dyskinésies orofaciales, le canevas plus global des DT n'est pas retrouvé dans ce modèle. Pour ce, on parle de modèle analogue qui reproduit une partie des symptômes cliniques [270]. Par ailleurs, l'hypersensibilisation persistante des R-D2 chez les rongeurs suite à un traitement AP n'est pas constamment retrouvée chez l'humain. De même la chronologie d'apparition plus précoce et la disparation plus hâtive des VCM ne correspondent pas parfaitement à ce qui est observé chez l'humain [269, 270, 272].

D'autres modèles rongeurs sont utilisés. Il s'agit de modèles se basant sur l'utilisation de souris transgéniques. Dans ces modèles on tente de reproduire la réponse aux AP de façon générale ou la phénoménologie des DT de façon spécifique. Ceci se produit en modulant (augmentant, réduisant ou annulant) l'expression d'un gène sensé être impliqué dans la physiopathologie des DT ou du mécanisme d'action des AP. Dans ce cadre, il a été proposé que la souris mutante R-D3 KO (n'exprime pas les R-D3) peut servir de substrat d'étude pour la DT. Cette proposition est motivée par l'association

existant entre les variations génétiques des R-D3 et la DT. Toutefois, la souris mutante présente une hyperactivité locomotrice qui rappelle davantage les EPS plus que les DT [274]. Pour cela, le modèle en question n'a pas connu le succès escompté. Autre que les rongeurs d'autres espèces animales ont été investiguées. Il s'agit principalement de primates non humains.

2.2. *Le modèle du primate non-humain*

Ce modèle a été proposé aux années soixante-dix comme approche efficace pour modéliser les DT [275]. Les premières études faites principalement sur deux espèces, les macaques et les Cebus, étaient en quelque sorte fastidieuses et les résultats parfois mitigés. Une étude a même duré cinq années [276]. Et pour ce, le modèle n'a pas connu un grand essor. Les protocoles d'administration désormais plus affinés et la connaissance des AP plus profonde, il devient actuellement plus facile de solliciter les espèces de PNH pour l'étude des DT. Il devient largement admis que suite à un protocole d'administration d'AP similaire à celui utilisé en clinique, les singes peuvent manifester des mouvements anormaux hautement stéréotypés reproduisant fidèlement les DT chez l'humain [269, 277].

De façon générale, les primates expriment la DT avec des taux satisfaisants pareils ou supérieurs à ceux observés chez l'humain [277]. Néanmoins, quelques différences inter-espèces ont été documentées. En guise d'exemple, chez les macaques, seulement 8% des singes exposés aux AP pendant une durée moyenne de 14 mois vont développer des DT [269]. Les babouins, quant à eux, montrent une sensibilité différente à l'HAL et à ses métabolites. En effet, alors qu'ils supportent moins l'HAL, ils répondent parfaitement à l'un de ses dérivés [269]. Par ailleurs, des singes du nouveau monde ont été sollicités. Il s'agit surtout du singe écureuil (*Saimiri sciureus*), du singe capucin (*Cebus apella*) et des ouistitis (*Callithrix jacchus*). Chez ces espèces également, l'incidence des DT est variable. Les taux oscillent entre 0% pour les singes écureuils, 45% pour les singes capucins et 71% pour les ouistitis. Il faut mentionner que tout comme chez l'humain, la déclaration

des DT est imprévisible et variable même au sein de l'espèce. Une durée minimale d'un an est généralement nécessaire[269].

Les protocoles médicamenteux actuellement utilisés reposent sur l'administration chronique de l'HAL ou de la Fluphénazine (deux APT, qu'on pense être les plus dyskinésigènes). Quoique controversé, la formulation du médicament semble jouer un rôle dans l'apparition de DT. D'une étude à l'autre et d'une espèce à l'autre une formulation en particulier (formulation dépôt ou forme orale simple) serait plus propice au phénomène. Le phénotype observé chez le singe rappelle fortement ce qui est observé en clinique. En effet des mouvements involontaires à titre de mouvements orofaciaux anormaux, des contractions du front, des mouvements de mâchonnement, la protraction de la langue, et la rétraction de la langue, la rotation du cou, ou des mouvements d'extension-flexion sont constamment répertoriés chez le singe sujet à ce paradigme expérimental. Ceci rend la visualisation et l'évaluation des DT chez les primates plus facile [269]. Pour augmenter l'applicabilité du modèle et diminuer les couts générés certains moyens peuvent être utilisés pour amorcer l'apparition de DT (sans interférer avec les autres types de réactions dues aux AP). Parmi ces moyens, on cite l'utilisation de singes âgés, l'administration hebdomadaire du médicament AP. Un autre point de ressemblance avec l'humain, le retrait du traitement AP cause l'apparition d'une forme de dyskinésie de retrait dans une population de singes ayant au préalable les DT [218, 269, 276-278]. Pour tous ces avantages, le modèle de PNH est considéré un modèle optimal pour les DT. Néanmoins, l'accès difficile aux singes, les coûts élevés qui découlent de leur étude, et la durée importante du protocole, sont des facteurs qui entravent la popularisation de ce modèle.

Les différents modèles que nous avons présentés sont d'apport précieux dans l'étude des DT. Ces modèles ont constitué très souvent le point de départ d'hypothèses visant le déchiffrement de DT.

3. Les hypothèses avancées

3.1. L'hypersensibilité des récepteurs dopaminergiques

L'hypothèse dopaminergique est l'hypothèse la plus classique et la plus populaire concernant la pathophysiologie des DT [279]. Cette hypothèse s'est construite autour d'un fait partagé par tous les APT: chez les rongeurs les APT causent une up-regulation, c.à.d. une augmentation, de la densité des R-D2 [270]. Très tôt, il a été proposé que de cette up-regulation découlerait une hypersensibilité des R-D2 à leur ligand naturel, la DA [280].

Le blocage des R-D2 étant l'apanage de tous les APT [210], qui occupent les R-D2 pour de longues périodes (quelques jours) et avec des affinités élevées [161, 281]. La CLZ, l'icône de l'atypicité présente un profil différent quant à l'occupation des R-D2: elle présente une affinité moindre pour les R-D2 qu'elle occupe de façon éphémère (12-24h) [161, 281]. Ainsi il a été postulé que le blocage résultant en une hypersensibilisation des R-D2 serait la cause derrière l'apparition des DT, puisque la CLZ ne cause pas de tels troubles moteurs [279, 281]. Cette hypothèse a été confortée par les études démontrant que l'augmentation de la dose de l'agent dopa-bloquant cause une amélioration des symptômes des DT et par celles démontrant qu'un retrait brusque des AP causerait une exacerbation des DT [258, 270].

Cependant, malgré la place qu'elle occupe dans les études étiologiques sur les DT, l'hypothèse dopaminergique relève beaucoup de faiblesses. En effet, et commençant par les modèles animaux (rongeurs), l'up-regulation des R-D2 est rencontrée chez tous les animaux (rongeurs) traités par l'halopéridol aussi bien ceux présentant des troubles moteurs (VCM) ou ceux sains de ces effets [270]. De plus, tous les animaux sous HAL démontrent une up-régulation des R-D2, mais chez l'humain seule une population connaît les DT. Par ailleurs, l'up-regulation se développe peu après le commencement du traitement chronique par les APT(dans les deux premières semaines [282]), alors que les VCM (ou les DT) mettent longtemps pour se manifester [270]. Les données chez l'humain sont également mitigées quant à ce phénomène d'up-regulation qui ne semble pas faire l'unanimité et ne soutiennent pas l'hypothèse dopaminergique en l'absence d'une corrélation entre la densité des R-D2 et l'intensité des DT dans le cas où cette densité est affectée [258, 270, 283, 284].

De cette hypothèse il est impératif de retenir l'implication des altérations de la neurotransmission dopaminergique dans l'apparition des DT. En attendant de préciser le sens de cette implication d'autres hypothèses ont pu être développées.

3.2. L'hypothèse GABAergique

Dans ses termes les plus simples, cette hypothèse propose une baisse du « turnover » du GABA compensée par une augmentation des récepteurs GABAergiques. La baisse du « turnover » GABAergique serait la cause d'une dérégulation d'une population de neurones striataux GABAergiques [285]. Cette population a été ultérieurement identifiée comme les interneurones GABAergiques géants parvalbumine (+) [286]. La conséquence serait un déséquilibre entre la voie directe et indirecte des GB. Ce déséquilibre se traduirait, selon cette hypothèse, par l'apparition de mouvements anormaux. Cette hypothèse tire son origine des études sur les modèles animaux démontrant la baisse de l'ARNm d'une enzyme clé dans la synthèse du GABA: la GAD (glutamic acid dehydroxylase) dans les GB [287]. Cette baisse a lieu au niveau du GPe. Ceci devrait affecter à la baisse la transmission GABAergique issue de ce noyau. Par conséquent, une perturbation du contrôle modulateur des GB sur l'exécution corticale se traduirait par les DT. Un autre argument en faveur de cette hypothèse repose sur le déclenchement de dyskinésies suite à des lésions réalisées spécifiquement au niveau de ces interneurones, et ceci chez un modèle animal de DT [288]. Par ailleurs, l'injection intra-nigrale d'un antagoniste GABAergique; la bicuculine semble déclencher des dyskinésies [283]. Cependant, les études de chimie analytique faisant appel à des techniques de pointe, comme la spectroscopie par résonance magnétique, n'ont pas détecté de différences significatives quant aux concentrations du GABA chez les différentes populations de schizophrènes (avec ou sans DT). D'autre part, le lien direct entre les interneurones GABA et les DT n'a pas pu être démontré à ce jour.

3.3. La dégénérescence des neurones du striatum causée par l'excitotoxicité et le stress oxydatif

Dans cette hypothèse on avance que la DT serait la résultante de dégénérescence neuronale des interneurons striataux causée par l'exacerbation de stress oxydatif. Ce stress peut être engendré par l'augmentation du métabolisme de la DA. Cette augmentation est inhérente à l'usage chronique d'AP. Un effet cytotoxique est effectivement décrit pour HAL dans les cellules en culture. Cet effet résulte de la génération de radicaux libres et du stress oxydatif conséquent. Dans une autre version de cette hypothèse on propose que le blocage des récepteurs dopaminergiques présynaptiques (hétéro-récepteurs contrôlant entre autre la libération de glutamate) par les AP se traduit par une augmentation de la libération du glutamate. Cette augmentation de glutamate déclenche des cascades apoptotiques et impliquées dans le stress oxydatif. Ce qui aboutit à la mort neuronale. L'augmentation de métabolites glutamatergiques dans le liquide cébrospinal des schizophrènes s'aligne avec cette hypothèse. Cependant, les études d'imagerie longitudinales (IRM à l'occurrence) reviennent avec des résultats mitigés sur la neurotoxicité [254, 258, 286].

3.4. L'hypothèse génétique

L'avènement de la pharmacogénomique (science qui étudie la relation entre la réponse aux médicaments et le phénotype génétique) a dévoilé que les variations géniques des enzymes de métabolisme des xénobiotiques peuvent affecter la réponse aux AP. En effet, les AP sont principalement substrats de CYP450, et CYP2D6. Ces enzymes connaissent un grand nombre de variations génétiques. Ce qui a laissé envisager que les DT peuvent être liées à un trait génétique particulier touchant la réponse aux AP. Dans ce dessein plusieurs études se sont attardées sur les gènes dont l'expression peut varier dans le cadre de DT. Les gènes qui ressortent en premier de ces études sont, sans surprise, des gènes touchant le métabolisme des médicaments eux mêmes. C'est le cas de variation génique touchant le CYP450 ou CYP2D6, et le

CYP1A2[289]. Une autre classe importante est celle relative aux transmissions neuronales et à la plasticité synaptique. Les gènes relatifs à la signalisation dopaminergique neuronale occupent la deuxième place après les gènes du métabolisme. Deux variations ont été classiquement associées aux DT. Il s'agit principalement du polymorphisme touchant le R-D3 (*D3DR Ser9Gly*) ainsi que le polymorphisme rs1800497 C/T touchant le R-D2. Pour le R-D3 une glycine qui remplace une sérine en position 9 confère une plus grande activité dopaminergique et est associée à un taux plus élevé de DT. Le polymorphisme des R-D2, d'effet moins spectaculaire, semble prédisposer aux DT[289]. Les études d'association géniques ont également rapporté une potentielle association entre les DT et les polymorphismes des R-D4 et de l'enzyme assurant la dégradation de la DA: la COMT. Pour alimenter l'hypothèse du stress oxydatif d'autres gènes ont été criblés. Seuls quelques gènes mitochondriaux semblent être affectés en cours du processus des DT. De façon disparate, d'autres associations s'avèrent positives avec les gènes codant pour les NMDA, leurs sous unités, ou les gènes affectant les récepteurs membranaires (RGS2) ou les gènes impliqués dans le développement des régions motrices cérébrales [289]. Ces études offrent une nouvelle dimension à la physiopathologie des DT. Mais tout comme pour la schizophrénie elles sont loin d'offrir une relation de causalité directe. De même chaque gène à part n'affecte qu'une portion infime des sujets dyskinétiques.

3.5. Hypothèse sérotoninergique

L'implication probable de la 5HT dans les mouvements anormaux est une hypothèse aussi vieille que l'hypothèse dopaminergique. D'autre part, nous pouvons parler, aujourd'hui, d'une implication certaine du système sérotoninergique dans des dyskinésies induites par des médicaments dopaminergiques (les dyskinésies induites par la L-dopa ou LID) [290, 291]. Les fondements de l'hypothèse sérotoninergique dans les DT sont, d'ailleurs, pareils à ceux de l'hypothèse sérotoninergique dans les LID. Ces fondements puisent leur inspiration dans l'inhibition sérotoninergique exercée sur la transmission dopaminergique. Le rôle inhibiteur de la transmission de la 5-HT est

dépendente de ses récepteurs. Les études qui se sont employées à démontrer cette hypothèse se sont concentrées sur une classe de récepteurs, les 5-HT_{1A}. En effet, ces récepteurs 5-HT_{1A}, de localisations présynaptique et postsynaptique, assurent une dualité fonctionnelle. L'activation des 5-HT_{1A} présynaptique réduit la libération de la 5HT et permet ainsi une levée de l'inhibition sérotoninergique exercée sur la transmission dopaminergique [292, 293]. La DA, ainsi libérée va s'opposer au blocage des récepteurs D2 par les AP. Deux grands types de protocoles expérimentaux scandent cette hypothèse. Premièrement, il a été démontré qu'un agoniste des R-5HT_{1A}, le 8-OH-DPAT (8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetraline) empêche l'apparition de catalepsies habituellement observées suite à l'administration d'antagonistes D2 [294-296]. Cet effet était associé à l'activation des autorécepteurs 5HT_{1A} situés au niveau du noyau raphé médian[296]. Dans le même paradigme, l'agoniste des 5HT_{1A} évoque également une baisse des métabolites de la DA que les AP sont censés augmenter [297]. L'autre type de protocoles vise à étudier les effets d'une augmentation du tonus sérotoninergique sur l'apparition de dyskinésies ou d'EPS liés aux AP. Dans ce cadre, des inhibiteurs des enzymes dégradant la 5HT ou des précurseurs de la 5-HT ont été administrés aux animaux ayant reçu des médicaments AP [294]. Ces études s'accordent sur l'exacerbation de mouvements anormaux causés par les AP, dans un contexte d'augmentation du tonus inhibiteur sérotoninergique de la DA. En outre, rappelons qu'un pilier de l'atypicité des APT reste l'affinité aux récepteurs sérotoninergiques. Malgré que la force de cette hypothèse beaucoup de questions restent sans réponse. En guise d'exemple, l'action du 8-OH-DPAT n'est pas partagée par tous les agonistes des 5HT_{1A}. De même, l'8-OH-DPAT est également associé à une action sur les récepteurs postsynaptiques, qui va augmenter donc le tonus sérotoninergique [294].

3.6. Autres hypothèses

Une hypothèse, plus innovatrice que les hypothèses ci-haut citées, postule que l'apparition des DT serait liée directement à l'installation d'un phénomène de plasticité aberrante [286]. Cette plasticité erronée fait appel à un dysfonctionnement des

récepteurs NMDA. Elle aboutit à un déséquilibre entre la voie directe et indirecte qui se traduit par un « codage » aberrant des mouvements anormaux. Comme arguments à cette hypothèse, les études comparatives des effets des AP ont révélé qu'HAL réduit l'expression des récepteurs NMDA alors que la CLZ facilite leur activation. De plus les troubles de la plasticité synaptique deviennent quasi-évidents chez les modèles animaux de mouvements anormaux autres que les DT, c'est le cas de LID, ou de la MH. D'autre part, une plasticité synaptique anormale a été décrite chez le rat suite à une administration chronique d'HAL. De même chez l'humain, des schizophrènes avec des épisodes psychotiques multiples présentent des troubles de plasticité comparés à des patients après un premier épisode [286]. Cette hypothèse semble attrayante. Particulièrement car elle promet un lien entre l'hypersensibilité des R-D2 et la clinique des DT. Cependant, plusieurs autres points restent à clarifier.

Dans le laboratoire d'accueil nous travaillons sur un facteur de transcription: Nur77 que nous pensons être un candidat potentiel associé à la physiopathologie des DT. Ce qui nous pousse à proposer une nouvelle hypothèse derrière le développement des DT.

Chapitre VII: Les récepteurs nucléaires Nurs

1. Les Nurs et les RXR

Les récepteurs nucléaires (RN) sont, par opposition aux récepteurs membranaires, des récepteurs présents au niveau du noyau. Cette présence peut être constitutive ou secondaire à une translocation à partir du cytoplasme. Les RN agissent en guise de facteurs de transcriptions (FT). Ce qui signifie que ces récepteurs reconnaissent des séquences spécifiques de l'ADN situées au niveau des séquences régulatrices de gènes cibles et que cette interaction conditionne la régulation de l'expression génique de la cible à la hausse ou à la baisse. Dans le cas de récepteurs hormonaux ou de récepteurs nucléaires adoptés, la liaison du ligand spécifique au récepteur amorce le recrutement d'une batterie de protéines qui va aboutir à décompacter la chromatine et à déclencher la fonction transcriptionnelle de ces récepteurs [298]. Parmi la superfamille des RN, deux sous familles attirent particulièrement notre attention. Il s'agit de la famille des Nurs et de la famille des rétinoïdes.

Les Nurs sont identifiés comme un sous-groupe des récepteurs orphelins, les NR4A (Classe IV). Ce groupe inclut trois membres: Nur77 (également dénommé NR4A1, ou NGFI-B), Nurr1 (ou NR4A2) et Nor1 (ou NR4A3). Au niveau structurel, les Nurs disposent de certaines particularités les distinguant des autres RN. De façon générale, les RN adoptent une structure répondant à un modèle précis [299]. Dans cette structure, la région LBD (ligand binding domain, ou domaine liant le ligand) est attribuée à la liaison des ligands des RN. Le domaine AF-2(A/B) agit en tant que région modulatrice permettant le recrutement de cofacteurs ou de corépresseurs de la transcription. Chez les Nurs, le domaine AF-2 de la région LBD adopte une conformation inhabituelle [300]. Au niveau de ce domaine la présence de résidus hydrophobes empêche le logement de ligands. En prime, le domaine AF-1 est plus long chez les Nurs. Ce qui facilite le recrutement des cofacteurs de la transcription. Ces deux particularités confèrent aux Nurs une activité transcriptionnelle constitutive qui semble ne pas dépendre pas de la

présence d'un ligand pour être déclenchée [300, 301]. Par ailleurs, aucun ligand n'a été identifié pour les Nurs. Pour cela on parle de récepteurs orphelins [300].

D'autre part, les Nurs agissent à titre de gènes d'induction précoces ou IEG (pour immediate early genes). Les Nurs sont rapidement induits suite à une armada de signaux physiologiques (voir figure 5): les acides gras, le stress, les prostaglandines, les facteurs de croissance, les cytokines inflammatoires, les phorbols d'ester...Ils constituent par conséquent des détecteurs très sensibles aux signaux de l'environnement cellulaire [302]. Pour ce, les Nurs ont été associés à une multitude de mécanismes cellulaires en périphérie et au niveau du SNC.

En périphérie, les Nurs peuvent revêtir un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire (figure 5). En effet, les Nurs ont un rôle modulateur sur les processus apoptotiques. Ils peuvent déployer des propriétés pro-apoptotiques ou anti-apoptotiques en fonction du contexte cellulaire et de la cascade signalétique engagée. De même, ils sont impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaires. Pour ce, les Nurs sont devenus des acteurs très importants dans les cascades affectées par différents cancers [303]. Outre leur rôle dans le cycle cellulaire, ils exercent un rôle important dans les mécanismes associés à l'homéostasie des lipides et des carbohydrates [304]. Dans ce cadre, il a été démontré que les Nurs peuvent être appelés à des applications thérapeutiques, puisque, de surcroit, ils ont été associés aux mécanismes d'action de certains médicaments hypoglycémiant [305, 306]. Par ailleurs, les membres du groupe des NR4A remplissent un rôle neuroendocrinien; et ceci en modulant l'expression du gène codant pour l'hormone de libération de la corticotropine (CRH pour *Corticotropin releasing hormone*) et du gène codant pour la pro-opiomélanocortine (POMC)[307]. D'avantage, ils influencent la synthèse d'hormones stéroïdiennes au niveau des surrénales et des testicules [308]. L'importance des Nurs s'étend à l'inflammation. Au niveau des macrophages, les Nurs semblent jouer un rôle important dans la recapture des LDL oxydés, dans la transformation de macrophages en cellules spumeuses, voir même dans le développement de plaques athérosclérotiques [309]. En prime, plusieurs cytokines inflammatoires et de cascades associées affectent l'expression des Nurs [310].

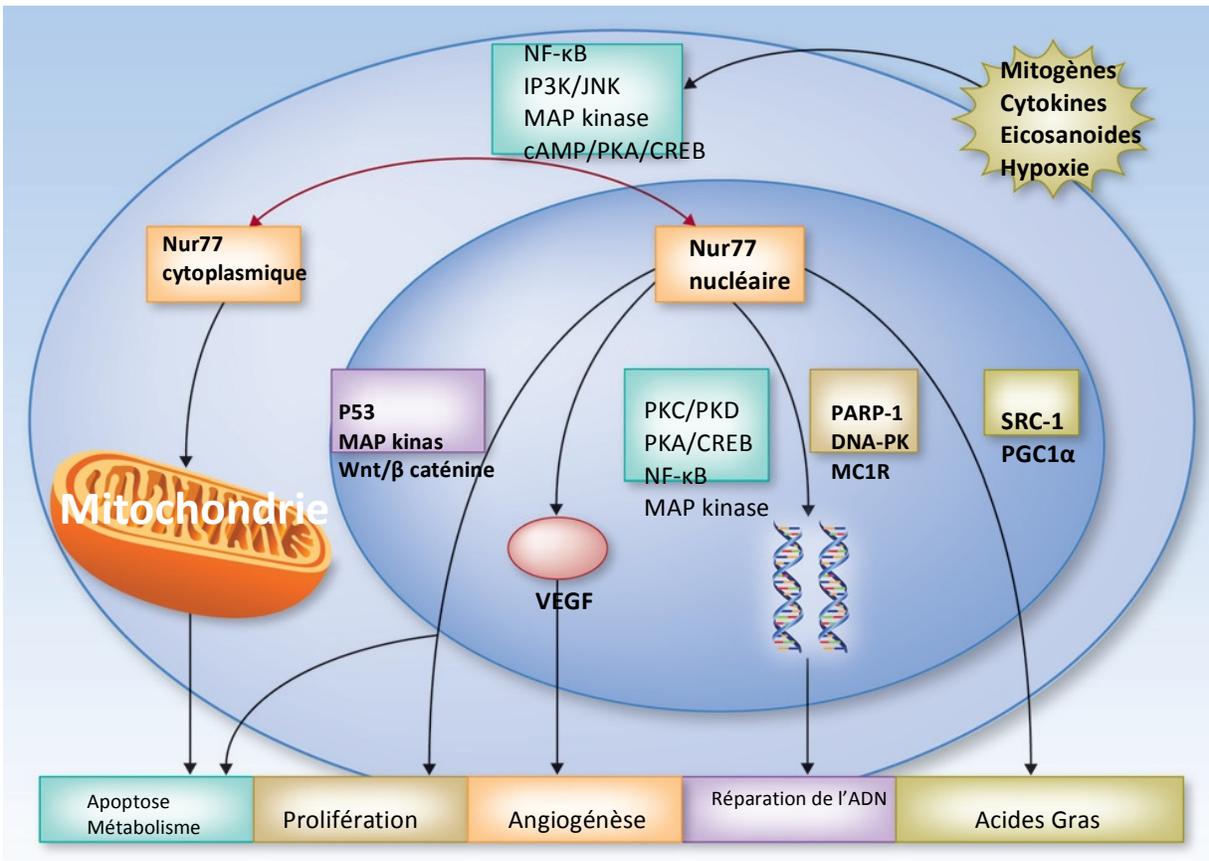


Figure 5: Mécanismes cellulaires impliquant Nur77 en périphérie

Les Nurus sont impliqués dans une myriade de fonctions cellulaires. Leur expression est induite par une variété de stimuli via une multitude de cascades signalétiques, incluant les voies de la protéine kinase A (PKA)/CREB, NF-κB, du phosphoinositide 3-kinase (IP3K)/AKT, *c-jun*-NH₂-kinase (JNK), et des MAP kinases. MAP, mitogen-activated protein; MC1R, melanocortin 1 receptor; PGC1α, peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1-α; PK, protein kinase; PKC, protein kinase C; PKD, protein kinase D; SRC-1, steroid receptor coactivator 1. Figure tirée et adaptée de Mohan et al, 2012 [310].

Les mécanismes par lesquels les Nurs assurent cette panoplie de rôles en périphérie sont relativement bien élucidés. Par ailleurs, on sait que ces mécanismes dépendent des liaisons effectuées sur les régions promotrices des gènes. Ces liaisons font appel à des séquences spécifiques de l'ADN dénommées éléments de réponse. Ces derniers changent en fonction de la conformation adoptée par les Nurs. En effet, les Nurs peuvent agir en tant que monomères, d'homodimères ou d'hétérodimères [301]. Dans chacune des situations un élément de réponse spécifique serait sollicité. Spécialement, les Nurs et en exclusivité Nur77 et Nurr1, peuvent former des hétérodimères avec une autre classe des RN, à savoir les récepteurs des rétinoïdes (RXR). Il existe deux sous-familles de récepteurs nucléaires aux rétinoïdes: la sous famille des RAR pour Retinoic Acid Receptors, et la sous famille des récepteurs RXR pour Retinoic Acid Receptors. Les RAR sont activés par tous les acides rétinoïques et sont impliqués dans la signalisation classique des rétinoïdes dérivés de la vitamine A. Les récepteurs RXR sont activés exclusivement par l'acide 9-cis rétinoïque [311], et à un degré moindre par l'acide docosahexanoïque ADH, un acide gras polyinsaturé [312]. Les RXR sont des partenaires d'hétérodimérisation de plusieurs récepteurs, autres que les Nurs [313, 314]. Néanmoins, l'hétérodimérisation entre Nur77 (ou Nurr1) et RXR est dotée de quelques spécificités. En fait, le RXR en hétérodimère avec Nur77 agit comme partenaire actif alors qu'il est habituellement silencieux ou permissif en présence d'autres partenaires [315]. L'hétérodimère formé cible un élément de réponse spécifique au niveau de l'ADN et confère des propriétés spécifiques aussi bien aux Nurs qu'aux RXR [315].

Par opposition aux systèmes périphériques, peu de données existent sur le rôle des Nurs au niveau du SNC. Cependant, les études consacrées au sujet s'accordent sur un rôle des Nurs dans un éventail de fonctions cérébrales. On sait maintenant que Nurr1 est indispensable pour l'expression et le maintien du phénotype dopaminergique des neurones du mésencéphale au cours du développement et à leur survie à l'âge adulte [316]. De même Nor1 semble également jouer un rôle important dans le développement neuronal [317]. Nur77 est par contre non détecté à l'âge embryonnaire. Son importance est associée au cerveau adulte [318] ; chose sur laquelle notre laboratoire s'est attardée.

Nos études ont conclu à un rôle important joué par Nur77 dans la transmission dopaminergique et plus spécifiquement dans les mécanismes d'action des AP.

2. Nur77 dans sa relation avec le système dopaminergique

L'expression de Nur77 fait défaut à l'âge embryonnaire [318]. Elle culmine par contre au niveau du cerveau adulte. Cette expression apparait essentiellement au niveau du tubercule olfactif, du cortex (PFC), du striatum, du NAc, de l'hippocampe, de l'hypothalamus, et de l'amygdale [278, 319]. Ce qu'on constate pour ces structures est qu'il s'agit principalement de structures ciblées par les projections dopaminergiques. Par contre, les territoires de neurones dopaminergiques (SN, VTA) eux-mêmes n'expriment que faiblement les ARNm de Nur77 dans les conditions de base [319]. En s'inspirant de cette distribution, Nur77 a été proposé comme un facteur potentiel pour la régulation d'homéostasie de la transmission dopaminergique. Dans cette optique, le laboratoire d'accueil a entrepris une série d'études biochimiques, génétiques et pharmacologiques afin de sonder la nature de la relation entre Nur77 et la DA. En somme, ces études dépeignent la relation entre Nur77 et la transmission dopaminergique comme une relation de ying-yang [301]. Dans cette relation la modification ou la manipulation d'un partenaire évoque une réaction compensatoire de l'autre. Pour commencer, le laboratoire d'accueil s'est intéressé aux conséquences d'une ablation génétique de Nur77 en réalisant une caractérisation comportementale pharmacologique et biochimique des souris Nur77 KO. Cette caractérisation a révélé que les souris Nur77 (-/-) présentent un phénotype global normal. Cependant, quelques changements au niveau comportemental ont pu être détectés. Par rapport à leur congénères Nur77 (+/+), les souris Nur77 KO sont spontanément hyperactives. En sus, elles sont plus sensibles à une faible dose d'agoniste D2 (Quinpirole) [320]. Rappelons que le quinpirole administré à faible dose agit préférentiellement sur les autorécepteurs dopaminergiques. Par ailleurs, l'analyse biochimique des cerveaux de ces souris démontrent des modifications des paramètres définissant le « turnover » de la DA. En effet, chez ces souris on trouve une expression plus élevée de la TH qui s'oppose à une baisse des niveaux d'expression de la COMT. Ces

résultats opposent donc deux processus: la synthèse de la DA (associée à la TH) et la dégradation de la DA (associée à la COMT) [320]. Pour ce, il a été avancé que Nur77 pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'homéostasie de la neurotransmission dopaminergique au niveau de la voie mésolimbique. Pour mener plus loin ces résultats, l'étude d'un modèle où le système dopaminergique est défaillant était impérative. Pour ce, le laboratoire a opté pour l'étude de l'expression de Nur77 dans différents modèles de la MP. Ces études concordent sur les changements drastiques de la réponse de Nur77 évoqués par la manipulation de la transmission dopaminergique. En effet, la dénervation dopaminergique unilatérale par la 6-OH-DA (6-hydroxy-DA) s'accompagne d'une induction importante de Nur77 au niveau des neurones de la voie indirecte. Cette augmentation est confinée à la partie lésée du striatum. Paradoxalement, le traitement chronique par la L-Dopa chez la souris 6-OHDA balance l'induction de Nur77 dans la partie intacte cette fois et dans les cellules de la voie directe [321]. La combinaison de la dénervation dopaminergique à l'ablation génétique de Nur77 illustre une sensibilité accrue chez l'animal. Cette sensibilité se traduit par l'exacerbation de comportement rotatoire induit par la L-Dopa [321]. Une étude faite en dehors de notre laboratoire a également souligné une sensibilité accrue à la MPTP (toxine qui cause une dénervation totale des neurones dopaminergiques) chez la souris Nur77 KO [322].

Outre ces études, nous avons entrepris des études pharmacologiques où nous avons focalisé sur la réponse de Nur77 aux différentes substances agissant sur le système dopaminergique. Il a été démontré qu'une administration aiguë d'un agoniste des R-D2 (Quinpirole) ou des R-D1 (SKF82958) diminue l'expression du transcrite (ARNm) de Nur77. La combinaison des deux agonistes engendre plutôt une augmentation de son expression dans le striatum [323]. L'expression de Nur77 est également modulée par les psychostimulants qui augmentent l'activité dopaminergique. En effet, la cocaïne et l'amphétamine induisent Nur77 dans le NAc, le striatum et le PFC [324, 325].

En somme, ces études confortent l'hypothèse du laboratoire défendant l'étroite relation entre la DA et Nur77. Si la schizophrénie serait un trouble de la transmission dopaminergique et les AP des molécules antagonistes de la transmission

dopaminergique, nous sommes donc en droit de s'attendre à des changements de Nur77 dans ces contextes.

3. Nur77 dans sa relation avec la schizophrénie

Pour décortiquer le rôle de Nur77 dans la schizophrénie, des études ont procédé à l'évaluation de son expression dans un modèle rongeur de la maladie, à savoir le rat adulte portant une lésion néonatale de l'hippocampe ventral. Chez ces rongeurs, il a été dénoté une baisse des niveaux d'expression de Nur77 dans le PFC et dans le cortex cingulaire [326]. En prime, ces animaux comparés à leurs congénères montrent une réponse exagérée à l'amphétamine [326]. Chez l'humain l'analyse des tissus *post-mortem* a montré une diminution de l'expression de Nur77 dans le cortex préfrontal des schizophrènes rappelant celle observée chez l'animal [327]. Pour faire le lien entre ces études il a été proposé que la baisse de l'expression de Nur77 corrèle avec la baisse de l'activité au niveau préfrontal, et aussi avec l'hypersensibilité sous-corticale aux psychostimulants [328, 329]. Ces deux concepts étant des pierres angulaires dans les mécanismes qui sous-tendent l'apparition des symptômes de la schizophrénie (selon l'hypothèse dopaminergique). D'autre part, le rôle de Nur77 dans la schizophrénie semble passer par son rôle dans le mécanisme d'action des médicaments AP.

4. Nur77 dans sa relation avec les antipsychotiques

Dans une série d'études, le laboratoire d'accueil s'est penché sur l'étude de la réponse aux AP chez les rongeurs. Ces études ont été conduites dans un contexte génétique normal ou modifié. Chez la souris Nur77 (+/+), l'administration d'un APT: HAL, provoque une forte induction de Nur77 dans le striatum, dans le NAc et dans le PFC. Par contre, l'administration de la CLZ, un APA, n'affecte pas l'expression striatale de Nur77 [278, 330]. L'induction de Nur77 consécutive à l'administration d'HAL ne désensibilise pas dans le temps [278]. Contrairement à l'induction de c-fos qui atteint son maximum à la première heure suivant le traitement aigu puis disparaît [331]. En étudiant le patron d'induction de l'ARNm suscité par différents AP typiques et atypiques dans le striatum,

Maheux, et al; ont démontré que l'expression de Nur77 corrèle avec le ratio d'affinité 5HT2A/D2. Ainsi, un index qui prédit le profil typique ou atypique d'un AP, en se basant sur le ratio des affinités 5HT2A/D2, peut être établi. D'autre part, et comme avancé précédemment, l'expression de Nur77 est quasi nulle dans la SN et la VTA dans les conditions de base. Cependant, l'administration d'AP, notamment l'HAL et l'Olanzapine augmentent l'expression de Nur77 à des niveaux considérables dans ces régions [330].

Par ailleurs, on sait que les APT administrés chez la souris engendrent deux types de réponses: les catalepsies (modèle pour les EPS) [332] et les VCM (représentant les DT). Chez la souris Nur77 (-/-), la réponse cataleptique est modulée à la baisse [333]. Les VCM par contre se voient exacerbées, suite au traitement chronique à l'HAL chez la souris KO [334]. Dans le même sens, l'administration de l'HAL induit l'expression du neuropeptide ENK et neurotensine chez la souris Nur77 (+/+). Ces effets font défaut chez la souris mutante [334]. L'effet de l' HAL sur l'ENK semble tributaire de Nur77 puisque l'absence de lien entre l'induction de l'ENK et le c-fos est confirmée [239, 335]. Par ailleurs, une autre étude a démontré que les agonistes rétinoïdes, ADH et 9-cis-RA ont des rôles bénéfiques quant aux VCM causés par l'HAL. Ces rôles sont, toutefois, dépendants de l'expression génique de Nur77 et ne peuvent se manifester dans un contexte d'ablation génétique du ce dernier [333].

En somme, ces observations sont congruentes avec un rôle de Nur77 dans le mécanisme d'action des AP. Ce rôle semble intervenir plutôt dans les effets indésirables qu'engendrent ces médicaments et dans les cascades qui illustrent la différence entre les deux classes d'AP. En parallèle avec ce rôle, une étude d'association génique, réalisée sur une cohorte de schizophrènes, a montré une association positive existant entre un polymorphisme (SNP) exprimé dans la région non codante 3'-UTR de l'ARNm du *Nur77* chez l'humain (NR4A1) et le développement des dyskinésies tardives dans cette population [336]. Cette association est très spécifique. En effet, elle ne concerne que le gène Nur77 (Nor1 et Nurr1 ne montrent pas d'association avec les DT) qu'elle lie spécifiquement aux DT (et non à la schizophrénie)[336].

Pour toutes ces raisons, nous pensons que Nur77 est un acteur très important dans le mécanisme d'action des AP. Nous proposons de l'utiliser comme marqueur de l'effet pharmacologique de ces médicaments. Ceci nous mène aux objectifs de la présente thèse.

Chapitre VIII: hypothèse et objectifs généraux et spécifiques de la thèse

Les dyskinésies tardives sont des effets indésirables des médicaments AP qui ont été décrits depuis plus d'une cinquantaine d'années. Cependant, le mécanisme par lequel ces effets prennent naissance reste controversé [279]. De surcroît, l'alternative pharmacologique aux médicaments dès lors existants ne comble pas les attentes vis-à-vis de ces effets indésirables.

Nous proposons que le blocage chronique des récepteurs dopaminergiques soit effectivement responsable d'un phénomène d'hypersensibilisation mais contrairement à l'hypothèse classique, cette hypersensibilisation porterait sur des paramètres de la transmission dopaminergique autres que les récepteurs D2. De même nous postulons que cette hypersensibilisation se traduirait par des altérations des cascades signalétiques au niveau du striatum. Ces altérations aboutissent à des changements portant sur le récepteur nucléaire (Nur77) [337], qui est hautement associé au système dopaminergique. L'induction de ces récepteurs déclencherait des cascades associées à la compensation ou à la genèse des DT. Pour ce, nous aspirons à une caractérisation plus approfondie des DT chez le modèle le plus proche de l'homme, les singes ; puisque nous pensons que la compréhension des mécanismes des DT passe obligatoirement par une meilleure connaissance des modifications ayant lieu suite à l'administration des médicaments AP. Pour atteindre cet objectif final nous avons fixé un nombre d'objectifs spécifiques. En effet, au cours de cette thèse:

1. Nous allons étudier de façon approfondie les effets comportementaux inhérents aux différents AP. Pour ce, nous avons réalisé une étude comportementale de longue durée (6-12 mois) chez un nombre considérable de singes capucins (n=23). Les animaux ont reçu soit un antipsychotique typique HAL, soit un antipsychotique atypique la CLZ. Les animaux non traités nous ont servi comme animaux contrôles.

Cette partie a été réalisée exclusivement par le co-directeur de cette thèse (Dr P.Blanchet) [269].

2. Nous avons voulu revoir la réponse des marqueurs du système dopaminergique à l'administration chronique des AP. Nous avons entrepris des analyses de l'expression des récepteurs dopaminergiques, D1, D2 et D3, dans les cerveaux des animaux de cette cohorte.
3. Comme le système dopaminergique, à lui seul, est incapable d'expliquer l'apparition des DT [279, 286], nous nous sommes penché sur l'étude d'autres marqueurs non dopaminergiques. Pour parvenir à cet objectif, nous avons analysé l'expression des récepteurs mGluR5.
4. Pour toutes les raisons avancées quant aux rôles potentiels de Nur77 dans les mécanismes d'action des AP, nous proposons Nur77 comme balise ou marqueur (read-out) des DT. Nous avons procédé à l'étude de l'expression de ce marqueur dans le cadre de notre étude. Dans une étude parallèle, nous nous questionnons sur l'impact que peut avoir la mutation génétique de Nur77 sur l'expression de ce facteur de transcription et ultérieurement sur les DT.
5. Nous nous intéressons aux modifications biochimiques qui peuvent avoir lieu suite à un traitement chronique par les AP. Pour ce nous avons effectué une caractérisation de l'expression des kinases ERK1/2 dans ces conditions.
6. Un dernier objectif pour cette thèse était de savoir si les DT causées par les AP partagent des points communs avec un autre type de dyskinésie causé par une autre classe de médicaments agissant sur le système dopaminergique, à savoir les dyskinésies induites par la L-Dopa.

Les études réalisées pour parvenir à ces objectifs ainsi que les résultats obtenus sont présentés sous forme de trois articles ainsi que sous la forme d'un chapitre regroupant les études non publiées.

Chapitre IX: Haloperidol-induced striatal *Nur77* expression in a non-human primate model of tardive dyskinesia

1. Contribution du candidat

Les analyses comportementales ont été réalisées en totalité par le co-directeur de la candidate: le Dr. Pierre Blanchet. La candidate a coupé les cerveaux des animaux, sujets de la cohorte, et a réalisé toutes les hybridations in situ et toutes les analyses quantitatives rapportées dans l'article. Cet article a été publié en 2013 dans *European Journal of Neuroscience* **38**(1): p. 2192-8

2. Article# 1: Haloperidol-induced striatal *Nur77* expression in a non-human primate model of tardive dyskinesia

Souha Mahmoudi, Pierre J. Blanchet and Daniel Lévesque

Abbreviated title: *Nur77* and monkey tardive dyskinesia

Abstract

Tardive dyskinesia (TD) is a delayed and potentially irreversible motor complication arising in patients chronically exposed to antipsychotic drugs. As several modern (so-called atypical) antipsychotic drugs are common offenders, the widening clinical indications for prescription as well as exposure of vulnerable individuals, TD will remain a significant drug-induced unwanted side effect. In addition, the pathophysiology of TD remains elusive and therapeutics difficult. Based on rodent experiments, we have previously shown that the transcriptional factor *Nur77* (also known as NGFI-B or Nr4a1) is induced in the striatum following antipsychotic drug exposure as part of a long-term neuroadaptive process. To confirm this, we exposed adult capuchin (*Cebus apella*) monkeys to prolonged treatments with haloperidol (median 18.5 months, N=11) or clozapine (median 6 months, N=6). Six untreated animals were used as controls. Haloperidol-treated animals developed mild TD movements similar to those found in humans. No TD was observed in the clozapine group. Postmortem analysis of *Nur77* expression measured by *in situ* hybridization revealed a stark contrast between the two drugs, as *Nur77* mRNA levels in the caudate-putamen were strongly upregulated in animals exposed to haloperidol while spared following clozapine treatment. Interestingly, within the haloperidol-treated group, TD-free animals showed higher *Nur77* expression in putamen subterritories compared to dyskinetic animals. This suggests that *Nur77* expression might be associated with a reduced risk to TD in this experimental model and could provide a novel target for drug intervention.

Introduction

Tardive dyskinesia (TD) is a troublesome and potentially irreversible motor complication encompassing all persistent, abnormal, involuntary movements occurring in the setting of chronic therapy with dopamine receptor-blocking agents, such as antipsychotic drugs and metoclopramide (Kenny, Hunter et al; 2008, Blanchet, Parent et al; 2012). The resulting movement disorder is most often stereotyped in nature and typically involves the orofacial musculature. As TD remains an elusive drug complication over 50 years since its initial description, it is not surprising that the treatment options available are non-specific and produce mixed results (van Harten and Tenback 2011).

New generations of antipsychotic drugs such as clozapine and olanzapine are defined as drugs active in the treatment of schizophrenia but with a lesser propensity to induce motor symptoms (Miyamoto, Duncan et al; 2005). Unfortunately, the early hope that second-generation (so-called atypical) antipsychotic drugs would afford a disappearance of TD has been challenged by a recent literature review, which reports that a proportion of one-third of patients chronically exposed to commonly used antipsychotic drugs such as risperidone and olanzapine still displays TD (Woods, Morgenstern et al; 2010). In fact, the only atypical antipsychotic drug associated with a no significant induction of TD is clozapine (Tarsy and Baldessarini 2006). The annual risk remains greater in older adults, particularly in those living with a dementing illness (Lee, Sykora et al; 2005), and severe forms of TD still develop with the new antipsychotic drugs (de Leon 2007). As a consequence of the persistence of TD in the community, combined with the aging of the population, and the enlarging spectrum of conditions for which antipsychotic drugs are prescribed (*e.g.*, bipolar disorder, depression), TD will remain a significant problem in human pharmacotherapy. In addition, the results of recent large trials and meta-analyses have shown that there is no effectiveness or tolerability advantage when comparing the first and second generations of antipsychotic drugs (Rosenheck, Perlick et al; 2003,

Jones, Barnes et al; 2006, Leucht, Corves et al; 2009, Peluso, Lewis et al; 2012). Therefore, a better understanding of the molecular mechanisms leading to tardive motor complications may help to design antipsychotic drugs devoid of these untoward effects or develop more effective adjunct anti-dyskinetic agents.

It is well documented that typical antipsychotic drugs rapidly induce genes like *c-fos*, *Zif268* and *Nur77* (Nerve-growth factor Inducible gene B [NGFI-B], Nr4a1) in the rodent striatum, a key structure in the regulation of motor control (Herrera and Robertson, 1996, Herdegen and Leah 1998, Lévesque and Rouillard 2007). *Nur77* is a transcription factor of the nuclear receptor family that is rapidly induced after treatment with typical antipsychotic drugs (D₂ antagonists) (Beaudry, Langlois et al; 2000, Maheux, Ethier et al; 2005). Previous reports from our laboratory implicated *Nur77* in a neuroadaptive response mounted against abnormal motor behaviors following typical antipsychotic drug exposure in rodents (reviewed in (Lévesque and Rouillard 2007)). For example, *Nur77* knockout mice not only showed spontaneous vacuous chewing movements (VCM), a behavior that displays some similarities to human TD (Turrone, Remington et al; 2002, Blanchet, Parent et al; 2012), but also worsened haloperidol-induced VCM compared to wild type mice (Ethier, Kagechika et al; 2004). This suggests that neurochemical changes induced by genetic deletion of *Nur77* might have recapitulated some susceptibility processes observed in TD. *Nur77* can display a functional transcriptional activity through heterodimerization with Retinoid X Receptor (RXR) (Perlmann and Jansson 1995). Interestingly, we have shown that retinoid drugs (called rexinoids) can modulate haloperidol-induced VCM in wild-type mice, whereas rexinoids remained without effect in *Nur77* knockout mice (Ethier, Kagechika et al; 2004). This suggests that *Nur77*/RXR transcriptional complex might represent an interesting pharmacological target to reduce abnormal involuntary movements induced by antipsychotic drugs (Lévesque and Rouillard 2007). In addition, *Nur77* mRNA up-regulation is sustained during subchronic typical antipsychotic drug administration in rodents without apparent desensitization, suggesting that *Nur77* not only participate in

the initiation of a neuroadaptive signaling cascade, but also to more prolonged effects (Beaudry, Langlois et al; 2000, Langlois, Beaudry et al; 2001)

We also recently showed that a single nucleotide polymorphism (SNP, rs2603751) located in the 3'-UTR (untranslated regulatory region) of the *Nur77* mRNA displayed a nominal association with the risk of developing TD, as well as with TD intensity based on Abnormal Involuntary Movement Scale (AIMS) scores, in a group of schizophrenia patients (Novak, Gallo et al; 2010).

In the present study, we chronically exposed *Cebus apella* monkeys to typical and atypical antipsychotic drugs in an attempt to associate TD induction and intensity of *Nur77* mRNA levels in various parts of the monkey basal ganglia. The results indicate that *Nur77* mRNA levels are upregulated within the haloperidol-treated group and TD-free animals showed higher *Nur77* expression compared to dyskinetic animals.

Material and methods

Animals and treatments

Handling of primates proceeded in accordance to the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. All procedures, including means to minimize discomfort, were approved by the Institutional Animal Care Committee of University of Montreal. Animals were housed separately in observation cages in a temperature-controlled room and exposed to a 12-hour light/dark cycle. They were fed once daily in the afternoon, and water was provided *ad libitum*. The number of animals was kept to a minimum, and all efforts were made to avoid animal stress and suffering.

Twenty-four adult female capuchin (*Cebus apella*) monkeys were used. All monkeys first underwent bilateral ovariectomy in order to reproduce the hormonal status and TD susceptibility of postmenopausal women (Yassa and Jeste 1992). Twelve animals were injected on a weekly basis with a depot preparation of haloperidol decanoate (0.1-0.9 mg/kg, i.m.) for up to 36 months. A low dose was given initially and titrated upward, and the maintenance dose individually adjusted to prevent overt sedation, bradykinesia, or acute dystonic reaction. Benztropine i.m. was occasionally needed during the initial titration phase to stop prolonged dystonic reactions. The drug protocol was briefly suspended a few times to ensure that TD manifestations were not masked by parkinsonian features. During the last 3 weeks of exposure, the haloperidol group (N=11) was switched to an oral preparation (0.125-0.3 mg/kg, twice daily) given in a fruit within a dose range proposed previously (Gunne and Barany 1979), the last dose being administered 3 hours prior to sacrifice, in order to lessen the variability in drug absorption and dopamine receptor blockade between animals prior to brain collecting. In our experience, such a brief oral drug switch has no impact on group allocation and TD intensity. A separate drug-exposed group of 6 animals received the atypical antipsychotic clozapine individually adjusted to tolerance, given twice daily (5-8 mg/kg/dose) in a fruit and treated 5 days a week for 6 months, until 3 hours prior to sacrifice (cumulative doses ranging from 600-960 mg/kg). clozapine was chosen because it represents the best TD-sparing atypical antipsychotic drug (Woods, Morgenstern et al; 2010). Six animals were left untreated as controls. One TD-free animal died unexpectedly 22 months after initiation of haloperidol exposure.

TD measure

The orofacial (forehead, lips, tongue, jaw), neck, trunk, and limb movements were scored along a primate equivalent of the Abnormal Involuntary Movements Scale (AIMS), with each body segment scored between 0-4 points from absent to severe TD, for a maximum score of 40 points. During drug exposure, the presence of TD was deemed unequivocal when it was persistent over time and when a minimum of two separate body segments

scored at least 1 point, or a minimum of one body part scored at least 2 points. Motor rating took place over 15 min each hour for 4 consecutive hours in the morning in the fasting state, before administration of the antipsychotic drug dose, behind a one-way mirror, with the animals kept in their home cage. The final score used for each animal is the cumulative score obtained for all 4 observations.

Tissue preparations

Three hours after drug dosing, the animals were anesthetized with ketamine (15 mg/kg i.m.) followed by pentobarbital (35 mg/kg i.v.). After clamping the abdominal aorta, they were perfused intracardially with 3 liters of physiologic saline solution. The brains were then rapidly removed, immersed in 2-methylbutane at -50°C for 15 sec, and then kept frozen at -80°C. Hemisected brains were cut into coronal sections of 12 µm on a cryostat (-20°C). The slices were thaw-mounted onto SuperFrostPlus (Fisher Scientific Ltd, Nepean, ON, Canada) 75 x 50 mm slides and stored at -80°C until use.

Complementary RNA probe preparation and synthesis

In order to label *Nur77* mRNA in monkey brain tissues, we have produced a complementary RNA (cRNA) probe from total RNA of human caudate-putamen tissues (Mahmoudi, Samadi et al; 2009). The cRNA probe for *Nur77* stems from an 814 bp (nucleotides 19 to 832) fragment of the full-length human cDNA (GeneBank accession no: NM002135) subcloned into pCRII/TOPO and linearized with Bam HI. The antisense probe was synthesized with a T₇ RNA polymerase. Synthesis of the specific [³⁵S]UTP-labeled cRNA probe for *Nur77* was performed as previously described (Beaudry, Langlois et al; 2000, Mahmoudi, Samadi et al; 2009).

In situ hybridization procedure

In situ hybridization with tissue sections was done at 58°C overnight in a standard hybridization buffer containing 50% formamide . Tissue sections were then apposed against BiomaxMR (Kodak, New Haven, CT) radioactive sensitive films for 5 to 7 days. Quantification of the autoradiograms was performed using computerized analysis (ImageJ 1.45s software, Wayne Rasband, NIH). Digital brain images were taken using a Grayscale Digital Camera (Model CFW-1612M, Scion Corporation, Maryland, USA). Optical gray densities were transformed into nCi/g of tissue equivalent using standard curves generated with ¹⁴C-microscales (ARC 146A-¹⁴C standards, American Radiolabelled Chemicals Inc., St-Louis). Brain areas investigated included anterior and posterior parts of the caudate nucleus and putamen corresponding to Bregma 2.70 to 0.45 (anterior caudate-putamen) and Bregma -6.30 to -8.10 (posterior caudate-putamen) in the atlas of Paxinos, respectively (Paxinos 2009). Anterior and posterior caudate-putamens have been subdivided into medial and lateral caudate (CM, CL), and dorsolateral (PDL), dorsomedial (PDM), ventrolateral (PVL) and ventromedial putamen (PVM). Average levels of labeling for each area were calculated from three adjacent brain sections of the same animals. Background intensities were taken in white matter tracts for each section and were subtracted from every measurement.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with Prism version 5.0 program (Graph Pad Software Inc. San Diego, CA, USA). All data were expressed as group means \pm S.E.M. We performed a Shapiro-Wilk normality test to estimate if the data display a Gaussian distribution (normally distributed population). All data sets passed the normality test (with an a level of 0.05) indicating that no significant departure from normality can be assumed. Then, we proceeded to parametric statistical comparison of mRNA levels in controls, haloperidol- and clozapine-treated groups using a one-way analysis of variance (ANOVA). We first performed a test of homogeneity using Bartlett's test, followed by a logarithmic transformation (when Bartlett's test was significant) and finally applied a one-way ANOVA on transformed data. When the ANOVA revealed significant differences,

a Tukey's test was performed as *post hoc* analysis. Comparison between dyskinetic and non-dyskinetic haloperidol-treated animals was performed using an unpaired t-test with a two-tailed p value. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Behavioral observations

The chronic haloperidol regimen proposed was well tolerated. Motor slowing, action tremor, and sedation were generally mild if present. Acute dystonic reactions prior to TD induction occurred in 5 out of 11 animals, requiring benztropine (in two animals, intramuscular benztropine 0.5 mg/kg/dose prior to TD onset, for a cumulative dose of 11.5 mg over 10 months) and a reduction in antipsychotic drug dose. By the time of sacrifice, no animal had received benztropine co-treatment for over 24 months. We feel this approach is advantageous to avoid interference with food intake, optimize general well-being, and facilitate TD rating. A total of 5 capuchins treated with haloperidol developed lasting TD. The latency of onset of TD was variable, with a mean (\pm SD) of 19 (\pm 12) months (median, 18.5 months; range 7-35 months), while the mean duration of drug exposure in the TD-free animals was 19 (\pm 4.5) months (median, 17.5 months; range 16-27 months). The cumulative i.m. drug exposure (mg/kg) up to the onset of TD or the time of the last observation for the TD-free group was 34.3 (\pm 37.9) and 41.5 (\pm 16.4), respectively. The abnormal purposeless movements were similar to those found in humans and typically stereotyped in nature, at times admixed with mild dystonic features. Variable orofacial dyskinetic movements were seen in all but one animal, including forehead contractions, chewing movements, tongue protrusions, and lip retraction (Fig. 1). Neck rotations, brief back extension, and flexion/extension movements of the toes, were also seen. Upper limb involvement was rarely observed.

The mean cumulative motor score of haloperidol-treated animals showing TD was 16.5 (± 8.5) points. The orofacial scores accounted for 39% of the mean TD score for the whole group. In contrast, chronic clozapine treatment was well tolerated and caused only mild behavioral changes such as a decrease in general activity, sedation, and hypersalivation. No acute dystonic reaction or TD was documented.

Nur77 mRNA levels were selectively induced by haloperidol

Nur77 mRNA levels were evaluated using a specific complementary RNA probe from the human *Nur77* DNA sequence. The hybridization signal was consistent with previous *Nur77* mRNA reports in primates (Mahmoudi, Samadi et al; 2009). The non-specific signal was very low (not shown). A relatively high basal *Nur77* expression was observed in caudate-putamen nuclei (Fig. 2, Table 1), whereas very low basal levels of *Nur77* were observed in nucleus accumbens (Acc), and external and internal segments of the globus pallidus (GPe and GPi, respectively) (Fig. 2). Haloperidol treatment strongly increased *Nur77* mRNA levels in all caudate and putamen subterritories in the anterior level (Fig. 3), while the typical antipsychotic drug significantly increase *Nur77* mRNA levels in posterior lateral caudate, and posterior ventromedial and ventrolateral putamen (Fig. 4). Clozapine treatment remained without effect in all caudate-putamen areas (Figs. 3 and 4). Haloperidol also induced *Nur77* expression in various cortical areas including frontal, insular, temporal and secondary somatosensory cortices (Fig. 2). In the nucleus accumbens, both haloperidol and clozapine tended to increase *Nur77* (CTL = 0.4 ± 0.2 ; HAL = 9.6 ± 3.6 and CLZ = 11.2 ± 5.4 nCi/g of tissue), but significance was not reached because of the important variability inherent to such low signals.

Nur77 mRNA levels were selectively elevated in some putamen areas in animals not showing TD

We then performed a further analysis in which we separated TD from TD-free haloperidol-treated animals. No significant *Nur77* mRNA levels difference between dyskinetic and non-dyskinetic haloperidol-treated animals was observed in the anterior caudate and putamen (Fig. 3, insets). However, animals not showing TD tended to have higher *Nur77* mRNA levels compared to dyskinetic animals in anterior lateral putamen subterritories, but these statistical comparisons did not reach significance (Fig. 3, insets). Interestingly, the statistical analysis indicated that animals not showing TD had significant higher *Nur77* mRNA levels compared to dyskinetic animals in posterior PDM, PVM and PVL putamen subterritories (Fig. 4, insets). According to the foregoing results, the relationship between *Nur77* expression and TD scores seems to be all-or-none rather than linear in nature. However, the limited TD score range in our sample and the relatively small number of TD animals examined (N=5) may explain this lack of linearity.

Discussion

The present results confirm the sensitivity of *Cebus apella* monkeys to display TD during long-term antipsychotic drug exposure, about half of our animals under chronic depot haloperidol developing TD after a median period of 18 months. The abnormal movements observed were similar to those found in humans and typically stereotyped in nature, without concomitant acute dystonic reaction. Clozapine caused no acute dystonic reaction or TD during the 6-month exposure, reflecting clinical experience (Tarsy and Baldessarini 2006). But, since clozapine exposure was shorter than haloperidol in the present experiment, the two drugs cannot be directly compared in terms of their liability to trigger TD. For the purpose of drug impregnation, we feel the oral clozapine dose selected (between 5-8 mg/kg/dose, twice daily) was sufficient and compared favorably to the chronic oral daily dosing protocol (5.2 mg/kg/day) previously administered to rhesus monkeys (Lidow and Goldman-Rakic 1994). Single s.c. dosing at 2 mg/kg is not

well tolerated in capuchins with TD and triggers an atypical acute dystonic reaction (Peacock and Gerlach 1999) [270]. Further, single oral doses of 10 mg/kg have produced a marked decrease in locomotion in rhesus (Kumar, Palit et al; 2003).

Chronic treatments with typical antipsychotic drugs induced immediate-early genes such as stable forms of Fos (FosB/ Δ FosB) or *Nur77* in the striatum of rodents, whereas atypical antipsychotic drugs do not, suggesting that induction of immediate-early genes in the striatum is associated with the sustain extrapyramidal side effects of typical antipsychotic drugs (Beaudry, Langlois et al; 2000, Rodriguez, Garcia et al; 2001, Grande, Zhu et al; 2004). Acute haloperidol as well as metoclopramide, a 5-HT₃/D₂ antagonist commonly used to treat nausea and associated with a high incidence of TD (Pasricha, Pehlivanonv et al; 2006), can induce Fos immunoreactivity in monkey caudate-putamen (Deutch, Lewis et al; 1996). However, no data is available on the modulation of immediate-early genes after prolonged antipsychotic drug exposure in primates. The possibility of functionally significant species differences is particularly important to consider since differences between rodents and primates in certain anatomical, pharmacological, and molecular features of forebrain dopamine system have been observed (Berger, Gaspar et al; 1991, Joel and Weiner 2000). The present results show that caudate-putamen upregulation of *Nur77* expression is selectively associated with the chronic administration of a typical antipsychotic drug (haloperidol), whereas the atypical antipsychotic drug clozapine administration spared *Nur77* expression in the caudate-putamen. This nicely supports previous experiments in rodents that have shown a differential regulation of striatal *Nur77* expression between typical and atypical antipsychotic drugs (Beaudry, Langlois et al; 2000, Werme, Ringholm et al; 2000, Maheux, Ethier et al; 2005), and indicates that the long-term modulation of *Nur77* expression induced by antipsychotic drugs in rodents can be extended to primates. Although both haloperidol and clozapine tended to increase *Nur77* mRNA levels in the nucleus accumbens, in accordance with rodent data (Beaudry, Langlois et al; 2000, Werme, Ringholm et al; 2000, Maheux, Ethier et al; 2005), basal *Nur77* expression in the

nucleus accumbens is much lower than in caudate-putamen in primates, whereas it has similar expression in both brain areas in rodents (Beaudry, Langlois et al; 2000, Werme, Ringholm et al; 2000, Maheux, Ethier et al; 2005)

In mice, we have shown that gene ablation of *Nur77* (knockout) generated spontaneous vacuous chewing movements (VCM) reminiscent of TD, and exacerbated haloperidol-induced VCM (Ethier, Kagechika et al; 2004). This suggests that *Nur77* upregulation induced by this typical antipsychotic drug is associated with cellular neuroadaptive events that tend to protect against the development of involuntary abnormal movements. The upregulation of *Nur77* in posterior putamen subterritories specifically observed in our TD-free monkeys is supportive of this view. Conceivably, this system is eventually overwhelmed during chronic drug exposure, leading to the delayed expression of motor complications associated with antipsychotic drugs. Alternatively, the regulation of *Nur77* in central dopaminergic circuits under conditions of dopamine D₂ receptor blockade could be genetically determined. We recently identified a single nucleotide polymorphism (SNP, rs2603751) located in the 3'-untranslated region (3'-UTR) of the *Nur77* mRNA that displayed a nominal association with the risk of TD, as well as with the severity of TD based on AIMS scores in a group of schizophrenia patients (Novak, Gallo et al; 2010). The non-coding 3'-UTR of transcripts has been recognized to be important for the control of gene expression (Shim and Karin 2002), raising the possibility that the SNP rs2603751 might alter *Nur77* expression. Indeed, using reporter plasmids in HEK293 cells containing the *Nur77* 3'-UTR along with the native allele (T allele), or the mutated allele (C allele) associated with a higher risk of TD, we observed that the expression of the reporter gene is significantly reduced in the presence of the *Nur77* 3'-UTR containing the mutated allele (unpublished observation, Mahmoudi and Lévesque), suggesting that this SNP might be associated with a reduction of *Nur77* expression. Thus, it is tempting to speculate that the induction of TD by a typical antipsychotic drug is linked with lower *Nur77* expression and that individuals bearing this SNP have a higher susceptibility to develop TD, compared to those bearing the native allele. In order to support this claim, the presence of this *Nur77* SNP correlated with high

TD scores and low brain *Nur77* expression levels must be sought in a large number of patients treated with antipsychotic drugs.

The absence of modulation of *Nur77* expression in non-dyskinetic clozapine-treated monkeys may seem contradictory to haloperidol data, where non-dyskinetic animals showed higher *Nur77* mRNA levels. However, the pharmacological profile of clozapine is much more complex than haloperidol. We have previously shown that the differential effect of typical and atypical antipsychotic drugs on *Nur77* expression is at least in part explained by interactions of atypical drugs with serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A/C} receptor subtypes, which prevent the induction of striatal *Nur77* expression (Maheux, Vuillier et al; 2012) In other words, the resulting intracellular signaling pathways induced by certain atypical antipsychotic drugs, such as clozapine, which combines complex effects on dopamine, 5-HT, and many other receptor activities, do not trigger TD, thereby avoiding the need to switch on nuclear *Nur77* transcription.

Interestingly, the relationship between *Nur77* mRNA expression and TD was observed in medio-dorsal portions of the caudal putamen (Fig. 4), which display sensorimotor functionality relative to their cortical inputs in primates (Parent and Hazrati 1995). In other areas sharing associative functionality, such as the caudate nucleus and anterior putamen (Parent and Hazrati 1995), *Nur77* mRNA levels were upregulated, but no relationship between *Nur77* expression and TD was apparent. The animals exposed for several months to haloperidol developed TD mainly in the orofacial region, but other body segments, including neck and forelimbs, were also affected. Thus, although somatotopic organization of the primate basal ganglia associates ventral portions of the putamen with orofacial movements (Nambu 2011), neuroanatomical alterations in brain dopamine circuits in TD could well vary from one animal to another.

In conclusion, the latency of onset, individual susceptibility, phenomenologic expression of the purposeless movements, and persistence of TD signs, make the non-human primate experimental TD model convincingly similar to the human condition. In this unique model, we confirmed the inverse relationship between striatal *Nur77* expression and TD-like movements previously documented in rodents, supporting the validity of these observations to the human condition. We have previously shown that haloperidol-induced expression of neuromodulatory neuropeptides enkephalin and neurotensin is blunted in *Nur77* knockout mice (Ethier, Beaudry et al; 2004), suggesting that this transcription factor might contribute to the modulation of gene expression involved in the control of dopamine neurotransmission homeostasis. By promoting adaptive gene expression patterns, activation of transcriptional factors of the nuclear receptor family may provide an interesting novel approach for drug intervention in the prevention and palliation of TD.

Acknowledgments

The authors wish to thank Mrs. Marie-Therese Parent, as well as the staff of the animal care facilities at Université de Montréal and Institut National de Recherche Scientifique (Armand-Frappier Institute, Laval, Canada), for their assistance and expertise during the animal experiments. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR, MOP-81321). S.M. holds a doctoral fellowship from the “Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQS)”.

Conflict of interest

The authors have no actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationship with other people or organizations that could inappropriately influence, or be perceptive to influence the present work.

Abbreviations:

3'-UTR, 3'-untranslated regulatory region

Acc, nucleus accumbens

AIMS, abnormal involuntary movement scale

CL, caudate lateral

CM, caudate medial

cRNA, complementary RNA

GPe, external globus pallidus

GPi, internal globus pallidus

NGFI-B, Nerve-Growth Factor Inducible gene B

PDL, putamen dorsolateral

PDM, putamen dorsomedial

PVL, putamen ventrolateral

PVM, putamen ventromedial

SNP, single nucleotide polymorphism

TD, tardive dyskinesia

VCM, vacuous chewing movement

References

- Beaudry, G., Langlois, M.-C., Weppe, I., Rouillard, C. & Lévesque, D. (2000) Contrasting patterns and cellular specificity of transcriptional regulation of the nuclear receptor Nerve Growth Factor-Inducible B by haloperidol and clozapine in the rat forebrain. *J. Neurochem.*, **75**, 1694-1702.
- Berger, B., Gaspar, P. & Verney, C. (1991) Dopaminergic innervation of the cerebral cortex: unexpected differences between rodents and primates [published erratum appears in Trends Neurosci 1991 Mar;14(3):119]. *Trends Neurosci.*, **14**, 21-27.
- Blanchet, P.J., Parent, M.T., Rompré, P.H. & Lévesque, D. (2012) Relevance of animal models to human tardive dyskinesia. *Behav. Brain Funct.*, **8**, 12.
- de Leon, J. (2007) The effect of atypical versus typical antipsychotics on tardive dyskinesia: a naturalistic study. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, **257**, 169-172.
- Deutch, A.Y., Lewis, D.A., Whitehead, R.E., Elsworth, J.D., Iadarola, M.J., Redmond, Jr., D.E. & Roth, R.H. (1996) Effects of D₂ dopamine receptor antagonists on Fos protein expression in the striatal complex and entorhinal cortex of the nonhuman primate. *Synapse*, **23**, 182-191.
- Ethier, I., Beaudry, G., St-Hilaire, M., Milbrandt, J., Rouillard, C. & Lévesque, D. (2004a) The transcription factor NGFI-B (*Nur77*) and retinoids play a critical role in acute neuroleptic-induced extrapyramidal effect and striatal neuropeptide gene expression. *Neuropsychopharmacology*, **29**, 335-346.
- Ethier, I., Kagechika, H., Shudo, K., Rouillard, C. & Lévesque, D. (2004b) Docosahexaenoic acid reduces haloperidol-induced dyskinesias in mice: involvement of *Nur77* and retinoid receptors. *Biol. Psychiatry*, **56**, 522-526.

- Grande, C., Zhu, H.W., Martin, A.B., Lee, M., Ortiz, O., Hiroi, N. & Moratalla, R. (2004) Chronic treatment with atypical neuroleptics induces striosomal FosB/ Δ FosB expression in rats. *Biol. Psychiatry*, **55**, 457-463.
- Gunne, L.M. & Barany, S. (1979) A monitoring test for the liability of neuroleptic drugs to induce tardive dyskinesia. *Psychopharmacology (Berl)*, **63**, 195-198.
- Herdegen, T. & Leah, J.D. (1998) Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, **28**, 370-490.
- Herrera, D.G. & Robertson, H.A. (1996) Activation of *c-fos* in the brain. *Prog. Neurobiol.*, **50**, 83-107.
- Joel, D. & Weiner, I. (2000) The connections of the dopaminergic system with the striatum in rats and primates: an analysis with respect to the functional and compartmental organization of the striatum. *Neuroscience*, **96**, 451-474.
- Jones, P.B., Barnes, T.R., Davies, L., Dunn, G., Lloyd, H., Hayhurst, K.P., Murray, R.M., Markwick, A. & Lewis, S.W. (2006) Randomized controlled trial of the effect on Quality of Life of second- vs first-generation antipsychotic drugs in schizophrenia: Cost Utility of the Latest Antipsychotic Drugs in Schizophrenia Study (CUtLASS 1). *Arch. Gen. Psychiatry*, **63**, 1079-1087.
- Kenney, C., Hunter, C., Davidson, A. & Jankovic, J. (2008) Metoclopramide, an increasingly recognized cause of tardive dyskinesia. *J. Clin. Pharmacol.*, **48**, 379-384.
- Kumar, R., Palit, G. & Dhawan, B.N. (2003) Comparative behavioural effects of typical and atypical antipsychotic drugs in rhesus monkey. *Eur. J. Pharmacol.*, **462**, 133-138.
- Langlois, M.-C., Beaudry, G., Zekki, H., Rouillard, C. & Lévesque, D. (2001) Impact of antipsychotic drug administration on the expression of nuclear receptors in the neocortex and striatum of the rat brain. *Neuroscience*, **106**, 117-128.

- Lee, P.E., Sykora, K., Gill, S.S., Mamdani, M., Marras, C., Anderson, G., Shulman, K.I., Stukel, T., Normand, S.L. & Rochon, P.A. (2005) Antipsychotic medications and drug-induced movement disorders other than parkinsonism: a population-based cohort study in older adults. *J. Am. Geriatr. Soc.*, **53**, 1374-1379.
- Leucht, S., Corves, C., Arbter, D., Engel, R.R., Li, C. & Davis, J.M. (2009) Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. *Lancet*, **373**, 31-41.
- Lévesque, D. & Rouillard, C. (2007) Nur77 and retinoid X receptors: crucial factors in dopamine-related neuroadaptation. *Trends Neurosci.*, **30**, 22-30.
- Lidow, M.S. & Goldman-Rakic, P.S. (1994) A common action of clozapine, haloperidol, and remoxipride on D₁- and D₂-dopaminergic receptors in the primate cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 4353-4356.
- Maheux, J., Ethier, I., Rouillard, C. & Lévesque, D. (2005) Induction patterns of transcription factors of the *Nur* family (*Nurr1*, *Nur77* and *Nor-1*) by typical and atypical antipsychotics in the mouse brain: Implication for their mechanism of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **313**, 460-473.
- Maheux, J., Vuillier, L., Mahfouz, M., Rouillard, C. & Lévesque, D. (2012) Modulation of haloperidol-induced patterns of the transcription factor *Nur77* and *Nor-1* expression by serotonergic and adrenergic drugs in the mouse brain. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **15**, 509-521.
- Mahmoudi, S., Samadi, P., Gilbert, F., Ouattara, B., Morissette, M., Grégoire, L., Rouillard, C., Di Paolo, T. & Lévesque, D. (2009) *Nur77* mRNA levels and L-Dopa-induced dyskinesias in MPTP monkeys treated with docosahexaenoic acid. *Neurobiol. Dis.*, **36**, 213-222.

- Miyamoto, S., Duncan, G.E., Marx, C.E. & Lieberman, J.A. (2005) Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Mol. Psychiatry*, **10**, 79-104.
- Nambu, A. (2011) Somatotopic organization of the primate Basal Ganglia. *Front. Neuroanat.*, **5**, 26.
- Novak, G., Gallo, A., Zai, C.C., Meltzer, H.Y., Lieberman, J.A., Potkin, S.G., Voineskos, A.N., Remington, G., Kennedy, J.L., Lévesque, D. & Le Foll, B. (2010) Association of the orphan nuclear receptor NR4A1 with tardive dyskinesia. *Psychiatr. Genet.*, **20**, 39-43.
- Parent, A. & Hazrati, L.-N. (1995) Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, **20**, 91-127.
- Pasricha, P.J., Pehlivanov, N., Sugumar, A. & Jankovic, J. (2006) Drug Insight: from disturbed motility to disordered movement - a review of the clinical benefits and medicolegal risks of metoclopramide. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.*, **3**, 138-148.
- Paxinos, G. (2009) *The rhesus monkey brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, Boston.
- Peacock, L. & Gerlach, J. (1999) New and old antipsychotics versus clozapine in a monkey model: adverse effects and antiamphetamine effects. *Psychopharmacology (Berl)*, **144**, 189-197.
- Peluso, M.J., Lewis, S.W., Barnes, T.R. & Jones, P.B. (2012) Extrapyrimal motor side-effects of first- and second-generation antipsychotic drugs. *Br. J. Psychiatry*, **200**, 387-392.
- Perlmann, T. & Jansson, L. (1995) A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev.*, **9**, 769-782.

- Rodriguez, J.J., Garcia, D.R., Nakabeppu, Y. & Pickel, V.M. (2001) FosB in rat striatum: normal regional distribution and enhanced expression after 6-month haloperidol administration. *Synapse*, **39**, 122-132.
- Rosenheck, R., Perlick, D., Bingham, S., Liu-Mares, W., Collins, J., Warren, S., Leslie, D., Allan, E., Campbell, E.C., Caroff, S., Corwin, J., Davis, L., Douyon, R., Dunn, L., Evans, D., Frecska, E., Grabowski, J., Graeber, D., Herz, L., Kwon, K., Lawson, W., Mena, F., Sheikh, J., Smelson, D. & Smith-Gamble, V. (2003) Effectiveness and cost of olanzapine and haloperidol in the treatment of schizophrenia: a randomized controlled trial. *JAMA*, **290**, 2693-2702.
- Shim, J. & Karin, M. (2002) The control of mRNA stability in response to extracellular stimuli. *Mol. Cells*, **14**, 323-331.
- Tarsy, D. & Baldessarini, R.J. (2006) Epidemiology of tardive dyskinesia: is risk declining with modern antipsychotics? *Mov. Dis.*, **21**, 589-598.
- Turrone, P., Remington, G. & Norega, J.N. (2002) The vacuous chewing movement (VCM) model of tardive dyskinesia revisited: is there a relationship to dopamine D₂ receptor occupancy? *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **26**, 361-380.
- van Harten, P.N. & Tenback, D.E. (2011) Tardive dyskinesia: clinical presentation and treatment. *Int. Rev. Neurobiol.*, **98**, 187-210.
- Werme, M., Ringholm, A., Olson, L. & Brené, S. (2000) Differential patterns of induction of NGFI-B, Nor1 and *c-fos* mRNAs in striatal subregions by haloperidol and clozapine. *Brain Res.*, **863**, 112-119.
- Woods, S.W., Morgenstern, H., Saksa, J.R., Walsh, B.C., Sullivan, M.C., Money, R., Hawkins, K.A., Gueorguieva, R.V. & Glazer, W.M. (2010) Incidence of tardive dyskinesia with atypical versus conventional antipsychotic medications: a prospective cohort study. *J. Clin. Psychiatry*, **71**, 463-474.

Yassa, R. & Jeste, D.V. (1992) Gender differences in tardive dyskinesia: a critical review of the literature. *Schizophr. Bull.*, **18**, 701-715.

Table 1. Basal *Nur77* mRNA levels in monkey caudate nucleus and putamen in control animals

<i>Nur77</i> mRNA levels (nCi/g tissue)			
		Anterior level	Posterior level
Caudate nucleus			
	CM	366 ± 38	149 ± 10
	CL	325 ± 27	197 ± 10
Putamen			
	PDM	317 ± 47	174 ± 4
	PDL	344 ± 37	149 ± 11
	PVM	204 ± 21	111 ± 8
	PVL	256 ± 13	110 ± 15

Data represent means ± SEM. Abbreviations: lateral (CL) and medial (CM) portions of the caudate nucleus as well as in dorsolateral (PDL), dorsomedial (PDM), ventrolateral (PVL)

and ventromedial (PVM) portions of the putamen. These values were used to establish 100 % control values of *Nur77* mRNA levels presented in Figures 3 and 4.

Figure legends

Figure 1. Representative photographs of tardive dyskinesia manifestations in two female capuchins displaying forehead muscle retraction, neck twisting and lip retraction (top panel), and tongue protrusion (lower panel). The figure was adapted with permission from Blanchet et al; 2012.

Figure 2. Representative autoradiograms showing the *in situ* hybridization signals obtained with the monkey radiolabeled *Nur77* mRNA probe. Representative examples of monkey brain coronal sections taken at anterior **A)** and posterior **B)** levels of the caudate-putamen in control (CTL), haloperidol (HAL)- and clozapine (CLZ)-treated groups. The left panels illustrate schematic representations of caudate nucleus and putamen subdivision areas used for quantification. Abbreviations are: Acc, nucleus accumbens, lateral (CL) and medial (CM) portions of the caudate nucleus, dorsolateral (PDL), dorsomedial (PDM), ventrolateral (PVL) and ventromedial (PVM) portions of the putamen, GPe, external globus pallidus and GPi, internal globus pallidus.

Figure 3. Modulation of *Nur77* mRNA levels in antipsychotic drug-treated monkeys in the anterior caudate-putamen. *Nur77* mRNA levels were measured in control (CTL), haloperidol- (HAL) and clozapine (CLZ)-treated monkeys in the anterior caudate nucleus and putamen. *Nur77* mRNA levels were evaluated in lateral (CL) and medial (CM) portions of the caudate nucleus as well as in dorsolateral (PDL), dorsomedial (PDM), ventrolateral (PVL) and ventromedial (PVM) portions of the putamen. Values are expressed in percent (%) of control values. Absolute values in nCi/g tissue of controls are presented in Table 1. Histogram bars represent means \pm SEM (N=5-11 per group) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs CTL group). Inset graphs represent *Nur77* mRNA levels in haloperidol-treated animals that have been subdivided into dyskinetic (Dysk) and non-dyskinetic (No-dysk) groups.

Figure 4. Modulation of *Nur77* mRNA levels in antipsychotic drug-treated monkeys in the posterior caudate-putamen. *Nur77* mRNA levels were measured in control (CTL), haloperidol- (HAL) and clozapine (CLZ)-treated monkeys in the posterior caudate nucleus and putamen. *Nur77* mRNA levels were evaluated in lateral (CL) and medial (CM) portions of the caudate nucleus as well as in dorsolateral (PDL), dorsomedial

(PDM), ventrolateral (PVL) and ventromedial (PVM) portions of the putamen. Values are expressed in percent (%) of control values. Absolute values in nCi/g tissue of controls are presented in Table 1. Histogram bars represent means \pm SEM (N=5-11 per group) (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs CTL group). Inset graphs represent *Nur77* mRNA levels in haloperidol-treated animals that have been subdivided into dyskinetic (Dysk) and non-dyskinetic (No-dysk) groups (## $p < 0.01$ vs Dysk group).



Figure 1

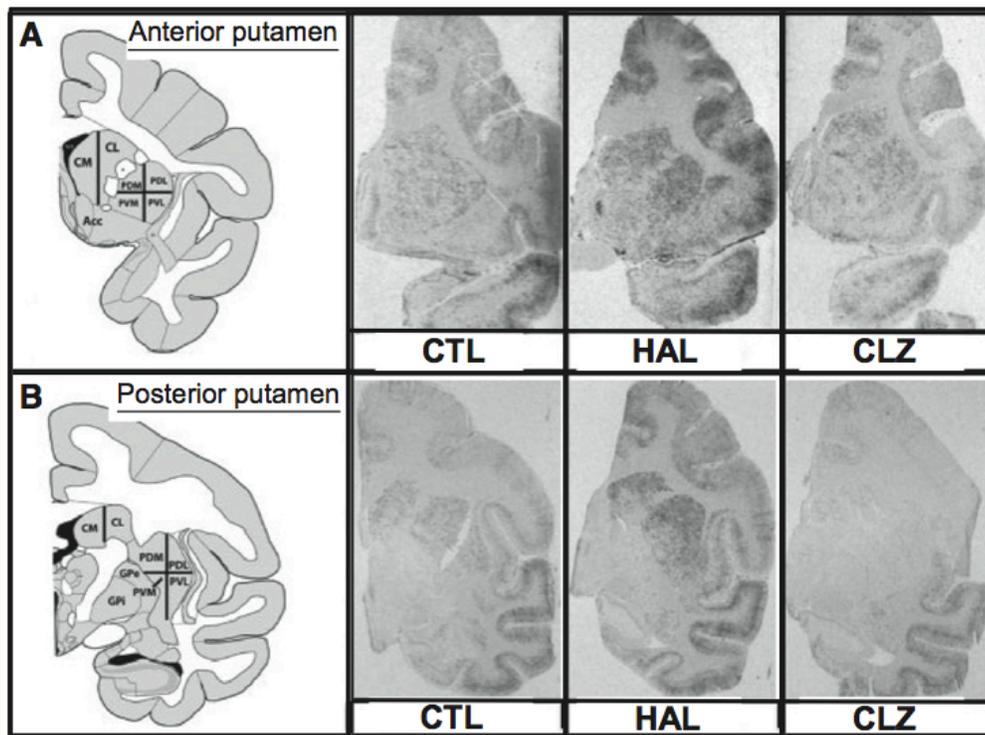


Figure 2

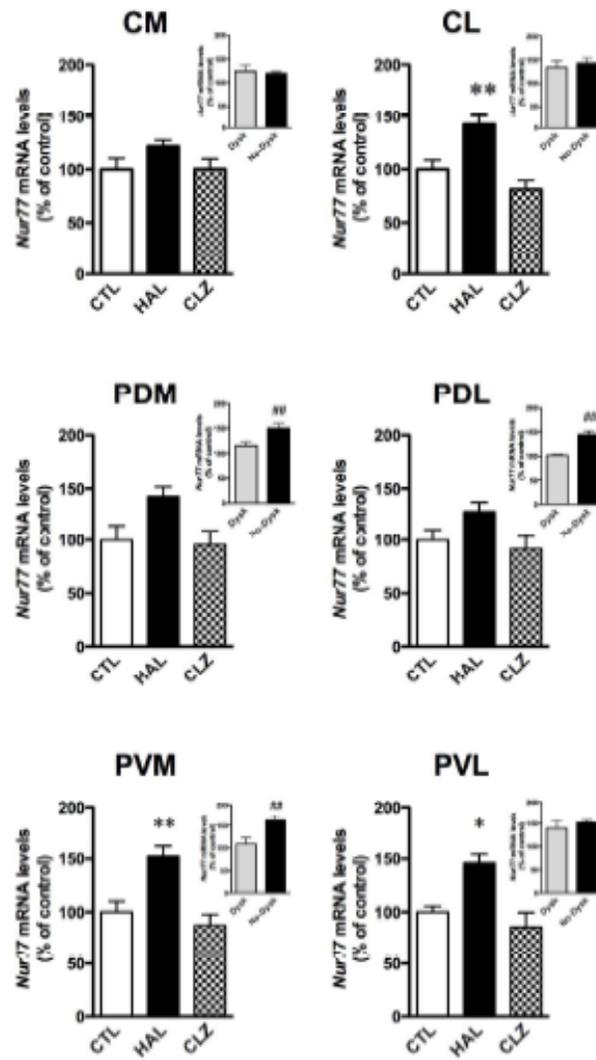


Figure 3

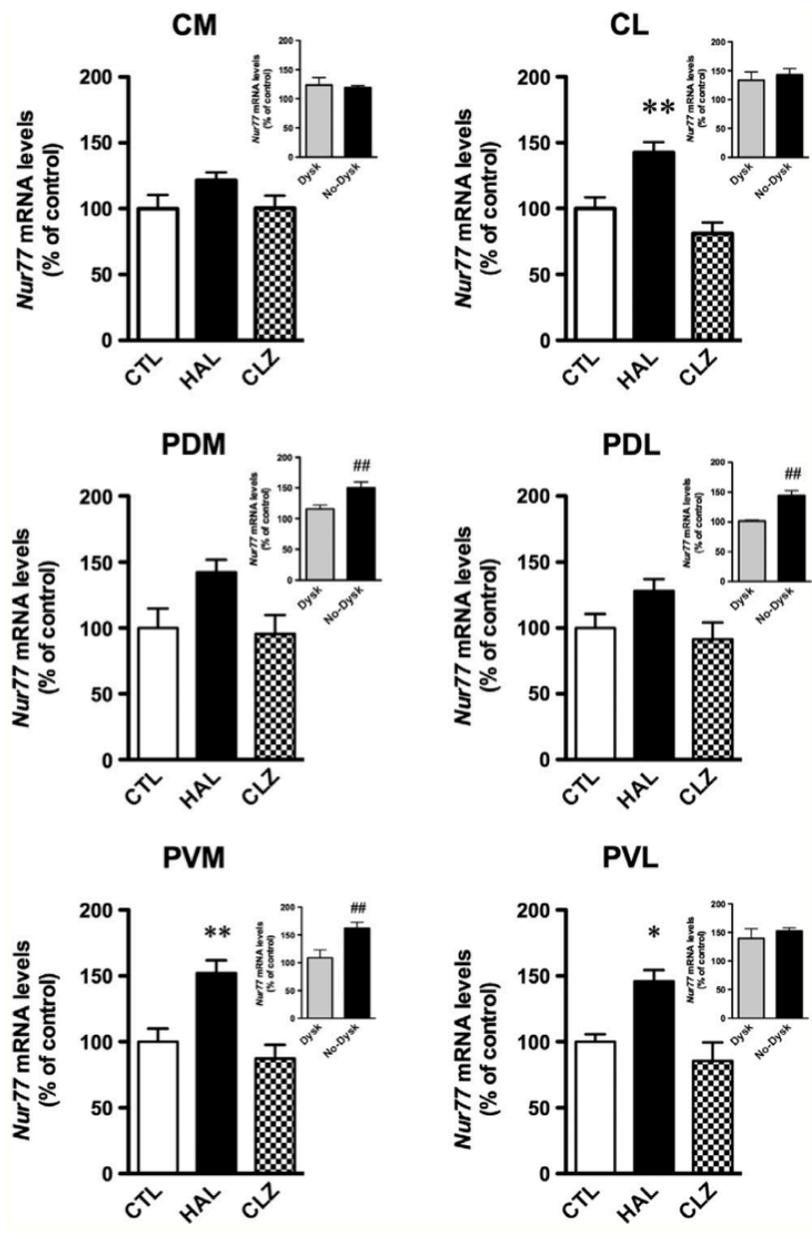


Figure 4

Chapitre X: Upregulation of dopamine D3 receptors, not D2, correlates with tardive dyskinesia in a non-human primate model

1. Contribution du candidat

L'article ci-présenté est un article en voie de soumission. La candidate a assuré tous les aspects techniques du travail (différentes autoradiographies, hybridation in situ double et analyses statistiques). La rédaction de l'article a été assurée par le co-directeur de la présente thèse (P. Blanchet) aidé par le directeur de recherche (Lévesque. D).

2. Article# 2 : Upregulation of dopamine D3 receptors, not D2, correlates with tardive dyskinesia in a non-human primate model

Souha Mahmoudi, Daniel Lévesque, and Pierre J. Blanchet

Abbreviated title: Tardive dyskinesia and dopamine receptors in monkeys

Keywords: dopamine receptors, antipsychotic drugs, haloperidol, clozapine, caudate-putamen, striatum, basal ganglia, tardive dyskinesia, monkey, autoradiography, *in situ* hybridization

Abstract

Tardive dyskinesia (TD) is a delayed and potentially irreversible motor complication arising in patients chronically exposed to dopamine receptor antagonists. Typical antipsychotic drugs, several modern (so-called atypical) antipsychotic drugs, and metoclopramide, are associated with generation of TD. The dopamine D₂ receptor supersensitivity hypothesis in TD, which stemmed from early rodent studies, lacks strong support in humans. To investigate the neurochemical basis of TD, we chronically exposed adult capuchin monkeys to haloperidol (median 18.5 months, N=11) or clozapine (median 6 months, N=6). Six unmedicated animals were used as controls. Five haloperidol-treated animals developed mild TD movements, and no TD was observed in the clozapine group. Using receptor autoradiography, we measured dopamine D₁, D₂, and D₃ receptor levels. We also examined the D₃ receptor/preprotachykinin mRNA co-expression, and quantified enkephalin mRNA levels, in striatal sections. Unlike clozapine, haloperidol strongly induced dopamine D₃ receptor binding sites in the anterior caudate-putamen, particularly in TD animals, and binding levels positively correlated with TD intensity. Interestingly, D₃ receptor upregulation is observed in striatonigral output pathway. In contrast, D₂ receptor binding was comparable to controls, and dopamine D₁ receptor binding reduced in the anterior (haloperidol and clozapine) and posterior

(clozapine) putamen. Enkephalin mRNA widely increased in all animals, but to a greater extent in TD-free animals. These results indicate that upregulated D₃ receptors are associated with TD in this non-human primate model, adding new insights to the dopamine receptor supersensitivity hypothesis. The D₃ receptor could provide a novel target for drug intervention in human TD.

Introduction

Tardive dyskinesia (TD) is an unsolved and potentially disabling condition encompassing all delayed, persistent, and often irreversible abnormal involuntary movements arising in one-third of subjects during long-term exposure to centrally-acting dopamine receptor-blocking agents, such as antipsychotic drugs (APD) used in various psychiatric and behavioural disorders, and metoclopramide used for gastroesophageal reflux and diabetic gastroparesis (1-2). In a prospective study, the adjusted TD incidence rate-ratio for those treated with newer-generation (so-called “atypical” antagonists with greater affinity for serotonin 5-HT_{2A} receptors over D₂ receptors) antipsychotic drugs alone was 0.68 (95% CI, 0.29-1.64) compared to first-generation (typical or conventional antagonists with high affinity for D₂ receptors) antipsychotic drugs alone, in favor of the former drug class. Nonetheless, the overall TD prevalence, incidence, and incident case severity differed little from a cohort examined at the same site before the advent of modern antipsychotics (3). The resulting movement disorder is usually stereotyped in nature and typically involves the orobuccolingual musculature, including twisting and protruding movements of the tongue, lip smacking and puckering, facial grimacing, and chewing movements. Movements may be confined to the oral area to produce the classical “bucco-linguo-masticatory syndrome”, or spread to the axial and limb musculature. Oral dyskinesia may be an under-recognized source of pain, tooth wear, and impaired retention of dental prosthetic devices (4). Chewing difficulty, related to the dyskinetic movements or inability to wear dentures, and dysphagia, may occur. Speech is impaired in a fraction of cases, adding to the social embarrassment patients experience due to cosmetic reasons or loudness of the dyskinetic movements. Unfortunately, TD is often irreversible and treatment options are non specific and produce mixed results. Lately, pallidal deep brain stimulation proved to be a reversible effective strategy against severe refractory TD (5), confirming the role of altered pallidothalamic transmission in

TD. However, this invasive and costly technique has limited general applicability, especially in elders.

The pathogenesis of TD has proved complex and difficult. Very few, well controlled, clinicopathological correlations have been published. The hypothesis of the existence of dopamine D₂ receptor supersensitivity in TD stemmed from rodent studies in which exposure to conventional antipsychotic drugs was rapidly and almost constantly associated with increased affinity (6) and numbers of D₂ receptors (7-10), and increased mRNA levels (10-11). However, this hypothesis fails to explain several aspects of the syndrome, such as its delayed onset in humans, induction in only a fraction of drug-exposed individuals, and potential irreversibility even after prolonged drug withdrawal (12-15). The lack of relation between oral TD-like movements and changes in striatal dopamine receptors in rats after long-term drug treatment (16-17), and of strong electrophysiological evidence for supersensitivity of striatal neurons to local drug applications in rats under chronic exposure to haloperidol (18), has cast doubt on this hypothesis. The positron emission tomography (PET) studies available failed to show a difference in D₂ receptor density between antipsychotic drug-treated patients with or without TD (19-20), and no post-mortem evidence for striatal dopamine D₂ receptor upregulation was found in TD patients (21-23). Increased D₂ receptor density was observed in the lateral pallidum in 6 TD subjects in a single post-mortem study, along with reduced density in the striatum (23).

In the past decade, the dopamine D₃ receptor has drawn attention as a possible mediator of movement disorders, including levodopa-induced dyskinesia (24-25). Several groups proposed that there might be a genetic predisposition to TD in some ethnic groups carrying the gly9 polymorphism in the dopamine D₃ receptor gene (26-27), which reportedly enhances 7-fold the affinity to dopamine compared to the ser9 receptor (28). This polymorphism is also present in capuchin monkeys (29). While the D₃ receptor is

not seen as a prime target of antipsychotic drugs *in vivo* in humans (30), these drugs display strong affinity for D₃ receptors *in vitro* and could therefore regulate its binding profile under long-term exposure. The impact of such potential chronic regulation on TD risk is unknown.

In the present study, we chronically exposed *Cebus apella* monkeys to typical or atypical antipsychotic drugs to revisit the dopamine receptor supersensitivity hypothesis, in an attempt to correlate TD induction and severity with dopamine D₁, D₂, and D₃ receptor levels measured by autoradiography with selective ligands in various parts of the basal ganglia. We also examined markers of direct and indirect striatal output neurons by *in situ* hybridization (31-32).

Materials and methods

Animals and treatments

Handling of primates proceeded in accordance to the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. All procedures, including means to minimize discomfort, were approved by the Institutional Animal Care Committee of University of Montreal. Animals were housed separately in observation cages in a temperature-controlled room and exposed to a 12-h light/dark cycle. They were fed once daily in the afternoon, and water was provided *ad libitum*. The number of animals was kept to a minimum, and all efforts were made to avoid animal stress and suffering.

Twenty-four adult female capuchin (*Cebus apella*) monkeys were used. A detailed description of treatments and behavioral measures can be found elsewhere (33). Briefly, 11 animals were injected on a weekly basis with a depot preparation of haloperidol

decanoate (0.1-0.9 mg/kg, i.m.) for up to 36 months. A low dose was given initially and titrated upward, and the maintenance dose individually adjusted to prevent overt sedation, bradykinesia, or acute dystonic reactions. A separate drug-exposed group of 6 animals received the atypical antipsychotic drug clozapine at clinically relevant doses in monkeys (34), individually adjusted to tolerance, given twice daily (5-8 mg/kg/dose) in a fruit 5 days a week for 6 months, until 3 h prior to sacrifice (cumulative doses ranging from 600-960 mg/kg). Six animals were left untreated as controls.

TD measure

The orofacial (forehead, lips, tongue, jaw), neck, trunk, and limb movements were scored along a primate equivalent of the Abnormal Involuntary Movements Scale (AIMS), with each body segment scored between 0-4 points from absent to severe TD, for a maximum score of 40 points. During drug exposure, the presence of TD was deemed unequivocal when it was persistent over time and when a minimum of two separate body segments scored at least 1 point, or a minimum of one body part scored at least 2 points. Motor rating took place over 15 min each hour for 4 consecutive hours in the morning in the fasting state, before administration of the antipsychotic drug dose, behind a one-way mirror, with the animals kept in their home cage. The final score used for each animal is the cumulative score obtained for all 4 observations. TD scores have been reported elsewhere (33).

Tissue preparation

Three hours after drug dosing, the animals were anesthetized with ketamine (15 mg/kg i.m.) followed by pentobarbital (35 mg/kg i.v.). After clamping the abdominal aorta, they were perfused intracardially with 3 liters of physiologic saline solution. The brains were then rapidly removed, immersed in 2-methylbutane at -50°C for 15 sec, and then kept frozen at -80°C. Hemisected brains were cut into coronal sections of 12 µm on a cryostat

(-20°C). The slices were thaw-mounted onto SuperFrostPlus (Fisher Scientific Ltd, Nepean, ON, Canada) 75 x 50 mm slides and stored at -80°C until use.

[³H]SCH23390 binding. D₁ receptor autoradiography was adapted with minor modifications (35). Brain sections were pre-incubated for 15 min in a 15 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5.7 mM ascorbic acid and 0.1 mM EDTA. Slides were then incubated for 1 h in the same buffer containing 2 nM [³H]SCH23390 (specific activity 91 Ci/mmol; PerkinElmer, Woodbridge, ON, Canada). Non-specific binding was evaluated in the presence of 1 μM SCH23390. Slides were then washed (2 x 5 min) in ice-cold Tris-HCl buffer. Sections were dipped for 10 sec in cold water, dried and apposed to BioMaxMR film (Kodak, New Haven, CT). Autoradiograms were generated after 6 weeks of film exposure.

[¹²⁵I]iodosulpiride binding. D₂/D₃ receptor autoradiography was adapted with minor modifications (36). Brain sections were pre-incubated for 15 min in a 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5.7 mM ascorbic acid and 10 μM hydroxyquinoline. Slides were then incubated for 1 h in the same buffer containing 0.2 nM [¹²⁵I]iodosulpiride (specific activity 2200 Ci/mmol; PerkinElmer, Woodbridge, ON, Canada). Non-specific binding was evaluated in the presence of 2 μM raclopride. Slides were then washed (2 x 5 min) in ice-cold Tris-HCl buffer. Sections were dipped for 10 sec in cold water, dried and apposed to BioMaxMR film (Kodak, New Haven, CT). Autoradiograms were generated after 24 h of film exposure.

[¹²⁵I]7-hydroxy-PIPAT binding. D₃ receptor autoradiography was adapted with minor modifications (37). Brain sections were pre-incubated for 30 min in a 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 100 mM NaCl. Slides were then incubated for 1 h in a buffer

containing 50 mM Tris-HCl, 40 mM NaCl, 300 μ M guanosine triphosphate (GTP) to convert D₂ high affinity receptor state to its low affinity state for dopamine, 5 μ M 1,3-di(2-tolyl)guanidine (DTG) to prevent labeling sigma sites and 0.2 nM [¹²⁵I]7-hydroxy-PIPAT (specific activity 2200 Ci/mmol; PerkinElmer, Woodbridge, ON, Canada). Non-specific binding was evaluated in the presence of 1 μ M dopamine. Slides were then washed (3 x 15 min) in ice-cold Tris-HCl buffer. Sections were dipped for 10 sec in cold water, dried and apposed to BioMaxMR film (Kodak, New Haven, CT). Autoradiograms were generated after 48 h of film exposure.

***In situ* hybridization**

Preproenkephalin (PPE) probe preparation. A cDNA oligonucleotide probe complementary to bases 388-435 (GenBank accession no. NM_006211) of the human PPE sequence of the cloned PPE-A cDNA was labeled at the 3'-end by terminal transferase (New England Biolabs, Whitby, ON, Canada) with a [³⁵S]-dATP (1250 Ci/mmol, PerkinElmer, Woodbridge, ON, Canada) using a 3'-terminal deoxynucleotidyl-transferase enzyme kit (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC, Canada). The reaction was carried out at 37°C for 30 min and labeled oligonucleotide was purified on a QIAquick Nucleotide removal Kit (QIAGEN, Inc., Mississauga, ON, Canada).

PPE mRNA hybridization. All solutions and buffers were prepared with distilled water treated with diethyl pyrocarbonate (0.01%) to inhibit RNase activity and autoclaved. The sections were dried at 4°C under vacuum with desiccant. The sections were fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde prepared in 0.1 M sodium phosphate buffer (PBS; pH 7.4) at room temperature and then rinsed 2 times for 5 min in PBS (pH 7.4) at room temperature. The sections were rinsed in 2X NaCl/sodium citrate (SSC) buffer for 10 min at room temperature and then incubated in a fresh solution of 0.25% acetic anhydride in 0.1 M triethanolamine (pH 8.0) for 10 min at room temperature. The slides were then rinsed briefly twice in 2X SSC and once in 0.1 M PBS (pH 7.4) and then incubated for 30

min in 0.1 M Tris-glycine buffer (pH 7.0) at room temperature. The slide-mounted sections were finally rinsed twice for 2 min in 2X SSC, dehydrated in a series of ascending concentrations of ethanol (50, 70, 80, 95%, and 2 times in 100%, 1 min each), air-dried, and stored at room temperature for 2–3 h under vacuum with desiccant. For *in situ* hybridization, the [³⁵S]-labeled oligonucleotide probe was added in hybridization buffer to reach a concentration of 1 x 10⁷ cpm/slide. Hybridization buffer was composed of 50% formamide, 10% dextran sulfate, 1X Denhardt's solution, 0.25 mg/ml yeast tRNA, 0.5 mg/ml denaturated salmon sperm DNA, and 4X SSC. An amount of 100 µl of hybridization buffer containing labeled probe was added to each slides. The sections were covered with glass coverslips and incubated at 37°C for 15 h in a humid chamber. After incubation, the coverslips were floated off in 2X SSC at room temperature, and the slide-mounted sections were washed for 1 h in 1X SSC at room temperature. The slides were then washed successively in 1X and 0.5X SSC for 1 h each at 40°C. Finally, the slides were air-dried and dehydrated in a series of ascending concentrations of ethanol (50, 70, 80, 95%, and 2 times in 100%, 1 min each). The slide-mounted tissue sections were exposed to BioMax MR films (Kodak, New Haven, CT) for 15 days at room temperature. The films were developed and autoradiograms analyzed by densitometry.

Quantification of autoradiograms

Quantification of the autoradiograms was performed using computerized analysis (ImageJ 1.45s software, Wayne Rasband, NIH). Digital brain images were taken using a Grayscale Digital Camera (Model CFW-1612M, Scion Corporation, Maryland, USA). Optical gray densities were transformed into nCi/g of tissue equivalent using standard curves generated with ¹⁴C- or ³H-microscales (ARC 146A-¹⁴C or ARC 123A-³H standards, American Radiolabelled Chemicals Inc., St-Louis). The brain areas under examination included anterior and posterior parts of the caudate nucleus (CD) and putamen corresponding to Bregma 2.70 to 0.45 (anterior caudate-putamen) and Bregma -6.30 to -8.10 (posterior caudate-putamen) in the Paxinos atlas, respectively (38). Anterior and posterior putamen regions have been subdivided into medial (PM) and lateral (PL)

portions. Quantifications were also performed in nucleus accumbens (Acc), globus pallidus internal segment (GPi) and external segment (GPe), and substantia nigra compacta (SNc) and reticulata (SNr) levels. Average levels of labeling for each area were calculated from three to four adjacent brain sections of the same animals. Background intensities were taken in white matter tracts for each section and were subtracted from every measurement.

Double in situ hybridization procedure

The double *in situ* hybridization procedure was performed as described previously (39), with [³⁵S]UTP-labeled D₃ receptors and non-radioactive digoxigenin (Dig)-labeled preprotachykinin (PPT), which produces substance P (SP) (40). The SP neuropeptide is expressed in the same cell population as dynorphin and was chosen as a marker of the direct striatal efferent pathway activity because it displays higher basal expression than dynorphin (41). The SP probe was obtained from a 200 bp fragment (from nucleotides 78 to 277) of the rat PPT mRNA into pGEM-4Z vector. The antisense cRNA probe was obtained by plasmid linearization with EcoRI and polymerization with the T₇ RNA polymerase. Then, the neuropeptide cRNA probe was labeled with Dig using the Promega Riboprobe System with the Dig-RNA labeling mix (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) as previously described (39). Radioactive and Dig-labeled riboprobes were separated from non-hybridized nucleotides on mini Quick spin RNA columns (Roche Diagnostics, Laval, Qc, Canada). Double *in situ* hybridization was performed under the same conditions as those described for the single hybridization. The Dig cRNA probe (SP, 0.75 ng/μl) was added in the hybridization mix with the radioactive-labeled probe (4-5 x 10⁶ cpm/μl). After overnight incubation, an additional wash step using 50% formamide solution in 2X SSC buffer was performed to reduce non-specific Dig labeling. For Dig revelation, brain sections were blocked with 2% BSA and 0.3% Triton X-100 in buffer A (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl), for 30 min at room temperature. Slides were then incubated overnight at 4°C with an anti-Dig antibody conjugated with alkaline phosphatase (Boehringer-Ingelheim Canada, Laval, Qc, Canada). The next day, slides

were washed three times in buffer A for 10 min and then in buffer B (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl and 50 mM MgCl₂) for 10 min, and finally incubated in a chromogen solution (buffer B containing 330 µg/ml nitroblue tetrazolium chloride plus 180 µg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate and 1 mM levamisole). Intensity of staining was checked along the incubation. When an adequate staining was obtained, slides were incubated in buffer C (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA) for 30 min to stop the reaction. Slides were dried up and then dipped in LM-1 photographic emulsion (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ) previously melted at 42°C for 3 h. Two months later, emulsion was developed in D-19 developer (3.5 min) and fixed (5 min) in Rapid Fixer solution (Kodak, New Haven, CT). Slides were mounted using a water-soluble mounting medium. Single- and double-labeled cells were visualized and manually counted with an Axio Imager A.1 photo microscope (Carl Zeiss Canada Ltd, Montreal, Qc, Canada) at 400X magnification. Neuron counting was performed in 5-10 different fields within the anterior dorsal putamen. Double-labeled cells were identified by the apposition of more than 10 silver grains with the colored product of the Dig reaction. Neuron counting was estimated on 4 different sections obtained from a total of 4 animals per group investigated.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with Prism version 5.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). All data were expressed as group mean ± S.E.M. Statistical comparison of mRNA levels in controls, haloperidol- and clozapine-treated groups was performed using a one-way analysis of variance (ANOVA). We first performed a test of homogeneity using Bartlett's test, followed by a logarithmic transformation (when Bartlett's test was significant) and finally applied a one-way ANOVA on transformed data. When the ANOVA revealed significant differences, a Tukey's test was performed as *post hoc* analysis. Comparison between dyskinetic and non dyskinetic haloperidol-treated animals was performed using an unpaired t-test with a two-tailed p value. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Five out of 11 capuchins treated with haloperidol developed lasting TD without agonist provocation. The latency of onset of TD was variable, with a mean (\pm SD) of 19 (\pm 12) months (median, 18.5 months; range 7-35 months), while the mean duration of drug exposure in the TD-free animals was 19 (\pm 4.5) months (median, 17.5 months; range 16-27 months). The abnormal purposeless movements were similar to those found in humans and typically stereotyped in nature, at times admixed with mild dystonic features. The mean TD score of haloperidol-treated animals showing TD was 16.5 (\pm 8.5) points. In contrast, chronic clozapine treatment was well tolerated and caused neither acute dystonic reactions nor TD.

Effect of antipsychotic drugs on dopamine receptor binding site levels

[³H]SCH23390 specific binding distribution was homogenous throughout anterior and posterior caudate-putamen subterritories (Fig. 1A,B). Lower D₁ receptor binding capacities were observed nucleus accumbens and internal segment of the globus pallidus (Fig. 1A,B). Chronic haloperidol and clozapine treatments reduced [³H]SCH23390 specific binding to dopamine D₁ receptors by 50% in anterior caudate-putamen regions, whereas clozapine also produced a similar effect in more posterior areas (Fig. 1C). Pallidal expression of D₁ receptor remained unchanged following antipsychotic drug treatments (Fig. 1C).

[¹²⁵I]iodosulpride specific binding levels were high in nucleus accumbens, and all anterior and posterior caudate-putamen areas (Fig. 2A,B). Iodosulpride binding displayed a posterior putamen medial-to-lateral gradient of expression, as previously

documented for striatal dopamine D₂ receptor distribution (references) (Fig. 2B). Lower iodosulpride specific binding was found in the external segment of the globus pallidus, whereas almost undetectable labeling was observed in the internal segment of the globus pallidus in untreated control animals (Fig. 2B). Except for a small (17%) reduction of [¹²⁵I]iodosulpride specific binding to D₂ receptors by clozapine in the nucleus accumbens, chronic antipsychotic drug exposures were associated with caudate-putamen dopamine D₂ receptor binding sites at comparable levels to unmedicated controls (Fig. 2C), regardless of the motor status of the animals. Dopamine D₂ receptor binding site capacities were not altered by antipsychotic drugs in the external segment of globus pallidus (Fig. 2C), but a strong haloperidol-induced upregulation was observed in the internal segment of the globus pallidus (CTL = 100 ± 12%; HAL = 226 ± 9%, p < 0.01 vs CTL group; CLZ = 97 ± 39%). [¹²⁵I]iodosulpride specific binding to the substantia nigra *pars compacta* (Fig. 3A-C) or ventral tegmental area (CTL = 100 ± 13%; HAL = 102 ± 10%; CLZ = 88 ± 12%) also remained unchanged following chronic antipsychotic drug exposures.

[¹²⁵I]7-OH-PIPAT specific binding displayed an important anterior-to-posterior gradient of labeling in caudate-putamen subterritories in control animals (Fig. 4A,B). Within posterior putamen, [¹²⁵I]7-OH-PIPAT specific binding has an important gradient of distribution, which consist of a higher medial binding capacity compared to the lateral portion of the putamen (Fig. 4B). This putamen receptor binding distribution is opposite to the receptor binding distribution observed with [¹²⁵I]iodosulpride. Thus, although [¹²⁵I]iodosulpride intrinsically labels both D₂ and D₃ receptors, receptor distribution is consistent with selective labeling of [¹²⁵I]iodosulpride and [¹²⁵I]7-OH-PIPAT at dopamine D₂ and D₃ receptors, respectively, in the putamen of untreated animals in the present receptor autoradiography experimental conditions. High levels of [¹²⁵I]7-OH-PIPAT specific binding were observed in the internal segment of the globus pallidus in untreated animals (Fig. 4B). [¹²⁵I]7-OH-PIPAT specific binding distribution is also consistent with previous reports on the distribution of dopamine D₃ receptors in both

monkeys and humans (references). Unlike clozapine, haloperidol strongly upregulated [¹²⁵I]7-OH-PIPAT specific binding to dopamine D₃ receptors in all regions examined relative to controls (Fig. 4C). We also compared [¹²⁵I]7-OH-PIPAT specific binding in haloperidol-treated animals with or without TD. Monkeys showing TD had significantly higher D₃ receptor binding capacities compared to TD-free animals in anterior striatal areas examined (Fig. 4C, insets). Interestingly, D₃ receptor levels also correlated with TD intensity in the lateral putamen area (Fig. 5). Similar positive correlations between dopamine D₃ receptor levels and TD intensity were observed in all other anterior striatal areas (data not shown). In substantia nigra *pars reticulata*, both haloperidol and clozapine significantly upregulated [¹²⁵I]7-OH-PIPAT specific binding (Fig. 3D-F). In haloperidol-treated animals, dyskinetic animals displayed lower D₃ receptor binding capacities compared to non-dyskinetic animals (No-Dysk = 1.17 ± 0.08 and Dysk = 0.87 ± 0.09 uCi/mg tissue, p < 0.05). [¹²⁵I]7-OH-PIPAT binding levels were also upregulated in both segments of the globus pallidus, GPi (Fig. 4C) and GPe (CTL = 100 ± 9%; HAL = 219 ± 31%, p < 0.01 vs CTL group; CLZ = 148 ± 3%).

Effect of antipsychotic drugs on striatopallidal and striatonigral neuropeptide levels

Markers of direct (PPT/SP) and indirect (PPE) striatal output neuronal activity were also examined. ³⁵S-PPE-labeled probe showed strong signals throughout nucleus accumbens and caudate-putamen subterritories (Fig. 6A,B). The PPE mRNA signal, expressed in indirect striatopallidal output neurons, was increased by haloperidol and clozapine in all striatal subregions (Fig. 6C). However, haloperidol-exposed animals displayed significantly higher PPE mRNA levels compared to clozapine-treated monkeys in the putamen (Fig. 6C). An additional analysis of haloperidol-treated animals indicated that dyskinetic monkeys expressed significantly lower PPE mRNA levels compared to non-dyskinetic animals in the posterior dorsolateral putamen (No-Dysk = 263 ± 35 and Dysk = 159 ± 23 nCi/g tissue, p = 0.0352).

Localization of dopamine D₃ receptors in striatal cell subpopulations

We measured localization of the dopamine D₃ receptor mRNA in PPT-negative and PPT-positive cells of the striatum using double *in situ* hybridization procedure in which D₃ receptor ³⁵S-labeled probe can be visualized by silver grain accumulations, whereas PPT Dig-labeled probe appeared as cellular brown deposits (Fig. 7A). Quantification of single Dig-labeled cells (PPT/SP-positive cells) in controls and haloperidol-treated animals indicated similar PPT mRNA levels in both experimental conditions (Fig. 7B). However, the number of cells expressing D₃ receptor mRNA (single ³⁵S-labeled cells) was significantly increased in haloperidol-treated animals compared to controls in the anterior lateral putamen area (Fig. 7C). Although statistical analysis did not reach significance, ³⁵S-labeled cells (D₃ receptors) are preferentially observed in PPT-positive cells in basal conditions in lateral putamen (PPT⁻-cells = 1.2 ± 1.2%; PPT⁺-cells = 13.7 ± 7.6%). Interestingly, haloperidol treatment significantly and selectively increased (3.3-fold) the percentage of D₃ receptor-labeled cells in PPT-positive cells (Fig. 7D). Similar results were observed in the other brain areas examined (data not shown). Haloperidol treatment did not modulate the percentage of D₃-positive cells expressed in PPT-negative cells (Fig. 7D).

Discussion

Chronic antipsychotic drug impregnation in capuchins caused distinct changes on dopamine D₂-like receptors-expressing striatal output neurons. First, striatal D₂-labeled [¹²⁵I]iodosulpiride binding sites were found at comparable levels between unmedicated and medicated animals, including those with TD, in keeping with *in vivo* human PET imaging and post-mortem data in humans with TD (see Introduction). Thus, the primate model not only faithfully reproduces the phenomenology of human TD, but also the striatal dopamine D₂ receptors density taking place during long-term antipsychotic drug exposure. The latter results should not be construed as reflecting lack of regulation of

dopamine D₂ receptors by typical and atypical antipsychotics, but rather maintained availability or density of functional receptors during treatment. Nonetheless, they do not provide support to the dopamine D₂ receptor supersensitivity hypothesis of TD.

Antipsychotic drug exposure produced no D₃ receptor upregulation in the rat striatum, with D₃ receptor mRNA levels (10-11,67) and binding density (10,57) generally found unchanged. In contrast, we observed for the first time in monkeys that haloperidol, unlike clozapine, causes a robust upregulation in D₃ receptors in the striatonigral complex. This increase is most noticeable in TD animals, and correlates with TD intensity. These data suggest that pharmacological responses targeting the D₃ receptor may vary between rodents and primates, and underline the importance of primate modeling in TD studies.

In rodents, the D₃ receptor is mainly expressed in the ventral striatum, in the shell of the nucleus accumbens and islands of Calleja (Diaz et al 1995; Lévesque et al 1995). The distribution is different in primates, as we found the D₃ receptor widely distributed in striatal and extrastriatal regions, confirming previous results obtained in monkeys (Morissette et al 1998), human post-mortem brain tissues (64), and in PET-based brain imaging using the partially D₃ selective PHNO ligand (references). Our [¹²⁵I]7-OH-PIPAT binding results also revealed much higher D₃ receptor densities in the monkey basal ganglia compared with rat (10), with approximately one-half the levels obtained for the D₂ receptor in the putamen. Strong basal expression of D₃ receptor binding site (as labeled with [¹²⁵I]7-OH-PIPAT) in the GPi is consistent with localization in the striatonigral output pathway. This is supported by the preferential expression of D₃ receptor mRNA in PPT-positive cells in our double labeling *in situ* experiment. Very low levels of idosulpride binding are observed in the GPi, as opposed to 7-OH-PIPAT binding, in untreated animals. So, it was somewhat surprising to see a strong haloperidol-induced idosulpride binding in the GPi (associated with the striatonigral

pathway). This suggests that iodopsulpride labeling in the GPi, especially after haloperidol exposure, might reflect D3 receptor, instead of D2 labeling. This explanation is supported by recent PET imaging studies showing that [11C]raclopride and PHNO bindings in the globus pallidus mainly represent binding at the dopamine D3 receptor subtype (references).

Importantly, haloperidol (a potent preferential D₂ receptor antagonist) upregulated D₃ receptors in striatonigral (PPT-positive) pathway. This is somewhat surprising, because haloperidol has been shown to modulate multiple striatal components in cells associated with the indirect striatopallidal output pathway (cells expressing PPE and D₂ receptors), such as *c-fos*, deltaFosB, Fos-related antigens, Arc, and Nur77 (references). Dopamine D₃ receptor striatonigral upregulations have also been observed in L-dopa-treated rats bearing a unilateral 6-OHDA-induced lesion (Bordet et al 2000; Guigoni et al 2005) and L-dopa-treated MPTP monkeys (Bezard et al 2003). Dopamine D₃ receptors have also been associated with behavioral sensitization (Bordet et al 2000; Guillin et al 2001) and L-dopa-induced dyskinesia (Bezard et al 2003; Hsu et al 2004). Thus, the present data suggests that antipsychotic drug-induced tardive dyskinesia and L-dopa-induced dyskinesia share, at least partially, a common mechanism.

Overactivation of the dopamine D₁-expressing direct striatonigral pathway has been linked with hyperkinetic movements (42). The contribution of dopamine D₁ receptors to the emergence of TD was raised on the basis of the acute augmenting effect of a D₁ agonist on TD-like movements following long-term antipsychotic drug exposure in rats (43-44) and monkeys (45-46). An alternative hypothesis proposed that TD results from an imbalance between striatal dopamine D₁ and D₂ receptors (47-53), or interactions between D₁ receptor- and D₂ receptor-bearing striatal efferent pathways (54). Studies have generally found no correlation between dopamine D₁ receptors labeling or gene expression and oral TD-like movements in rats (55-59), and limited post-mortem data in

humans have found reduced striatal D₁ binding in TD subjects (23). Similarly, both haloperidol and clozapine reduced dopamine D₁ receptor binding sites by 50% in anterior caudate-putamen regions, while clozapine also produced a similar effect more posteriorly. This is surprising, since haloperidol and clozapine display distinct D₁ receptor occupancy *in vivo* in the striatum (negligible vs. <60%, respectively) (60), and regulation of DARPP-32 phosphorylation spares D₁ receptor-expressing neurons in mice exposed to haloperidol, while clozapine targets both D₁ receptor-expressing and D₂ receptor-expressing neuronal subtypes (61). Nonetheless, haloperidol and clozapine have moderate affinity for D₁ receptors (K_i=27 vs. 141 nM, respectively) (62), and might regulate these receptors in primates under long-term drug exposure. Although we found no correlation between D₁ receptor binding in the basal ganglia and TD, the reduction in D₁ receptor binding in posterior striatum produced by clozapine is of potential interest in view of its antidyskinetic properties in humans (63).

Finally, both typical (haloperidol) and atypical (clozapine) antipsychotics enhanced enkephalin mRNA levels in all striatal regions examined, to a larger magnitude in the haloperidol group in the putamen sectors (postero-lateral in particular), as reported previously (68-69). A greater effect with haloperidol relative to clozapine was also found when the met-enkephalin protein content was measured in rats (31). However, this elevation was more noticeable in our TD-free animals. In the past, striatal enkephalin overexpression resulting from antipsychotic drugs in rats has been interpreted as reflecting increased activity along the indirect striatopallidal pathway contributing to TD (69). However, differences in enkephalin mRNA between haloperidol-exposed rats with or without vacuous chewing movements have been observed in the nucleus accumbens, not in the motor striatum (54). Previous observations generated in murine and primate models of TD suggested that the nuclear receptor *Nur77* is induced in central dopaminergic pathways as part of a neuroadaptive response to fend off drug sensitization (33,70). Indeed, *Nur77* knockout mice display enhanced vacuous chewing response as compared to their littermates (Ethier et al 2004a), while chronically exposed

monkeys to haloperidol showing TD had significantly lower Nur77 mRNA levels (Mahmoudi et al 2013). In addition, haloperidol-induced Nur77 expression is selectively observed in ENK-expressing cells of the striatum (Ethier et al 2004b). Interestingly, haloperidol-induced enkephalin expression is totally blunted in Nur77 knockout mice, suggesting that this neuropeptide might be a target of Nur77-dependent transcriptional activity. Thus, it is tempting to speculate that enkephalin and Nur77 upregulations in TD-free haloperidol-treated animals, which are associated with the striatopallidal output pathway activity might protect the circuit against the generation of abnormal involuntary movements such as dyskinesia.

In conclusion, the foregoing results suggest that the dopamine receptor supersensitivity hypothesis should not entirely be dismissed, but that upregulated striatal D₃ receptors, not D₂, are associated with TD in a non-human primate model. The D₃ receptor could provide a novel target for drug intervention in human TD.

Acknowledgments

The authors wish to thank Mrs. Marie-T. Parent, as well as the staff of the animal care facilities at Université de Montréal and Institut National de Recherche Scientifique (Armand-Frappier Institute, Laval, Canada), for their assistance and expertise during the animal experiments. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR, MOP-81321). S.M. holds a doctoral fellowship from the “Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQS)”.

Abbreviations:

3'-UTR, 3'-untranslated regulatory region

Acc, nucleus accumbens

AIMS, abnormal involuntary movement scale

CL, caudate lateral

CM, caudate medial

cRNA, complementary RNA

GPe, external globus pallidus

GPi, internal globus pallidus

NGFI-B, Nerve-Growth Factor Inducible gene B

PDL, putamen dorsolateral

PDM, putamen dorsomedial

PVL, putamen ventrolateral

PVM, putamen ventromedial

SNP, single nucleotide polymorphism

TD, tardive dyskinesia

VCM, vacuous chewing movement

References

1. Blanchet PJ (2003): Antipsychotic drug-induced movement disorders. *Can J Neurol Sci* 30(Suppl. 1):S101-S107.
2. Pasricha PJ, Pehlivanov N, Sugumar A, Jankovic J (2006): Drug Insight: from disturbed motility to disordered movement--a review of the clinical benefits and medicolegal risks of metoclopramide. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3:138-148.
3. Woods SW, Morgenstern H, Saksa JR, Walsh BC, Sullivan MC, Money R, et al. (2010): Incidence of tardive dyskinesia with atypical versus conventional antipsychotic medications: a prospective cohort study. *J Clin Psychiatry* 71:463-474.
4. Blanchet PJ, Rompré PH, Lavigne GJ, Lamarche C (2005): Oral dyskinesia: a clinical overview. *Int J Prosthodont* 18:10-19.
5. Damier P, Thobois S, Witjas T, Cuny E, Derost P, Raoul S, et al. (2007): Bilateral deep brain stimulation of the globus pallidus to treat tardive dyskinesia. *Arch Gen Psychiatry* 64:170-176.
6. Clow A, Jenner P, Marsden CD (1978): An experimental model of tardive dyskinesias. *Life Sci* 23:421-424.
7. Klawans HL, Rubovits R (1972): An experimental model of tardive dyskinesia. *J Neural Transm* 33:235-246.
8. Gerlach J, Reisby N, Randrup A (1974): Dopaminergic hypersensitivity and cholinergic hypofunction in the pathophysiology of tardive dyskinesia. *Psychopharmacologia (Berl)* 34:21-25.
9. Burt DR, Creese I, Snyder SH (1977): Antischizophrenic drugs: chronic treatment elevates dopamine receptor binding in brain. *Science* 196:326-328.
10. Lévesque D, Martres MP, Diaz J, Griffon N, Lammers CH, Sokoloff P, Schwartz JC (1995): A paradoxical regulation of the dopamine D₃ receptor expression suggests

the involvement of an anterograde factor from dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:1719-1723.

11. D'Souza U, McGuffin P, Buckland PR (1997): Antipsychotic regulation of dopamine D1, D2 and D3 receptor mRNA. *Neuropharmacology* 36:1689-1696.
12. Fibiger HC, Lloyd KG (1984): Neurobiological substrates of tardive dyskinesia: the GABA hypothesis. *Trends Neurosci* 12:462-464.
13. Gunne LM, Häggström JE, Sjöquist B (1984): Association with persistent neuroleptic-induced dyskinesia of regional changes in brain GABA synthesis. *Nature* 309:347-349.
14. Casey DE, Gerlach J (1986): Is tardive dyskinesia due to dopamine hypersensitivity? *Clin Neuropharmacol* 9:134-136.
15. Waddington JL (1986): Further anomalies in the dopamine receptor supersensitivity hypothesis of tardive dyskinesia. *Trends Neurosci* 8:200.
16. Waddington JL, Cross AJ, Gamble SJ, Bourne RC (1983): Spontaneous orofacial dyskinesia and dopaminergic function in rats after 6 months of neuroleptic treatment. *Science* 220:530-532.
17. Shirakawa O, Tamminga CA (1994): Basal ganglia GABA_A and dopamine D₁ binding site correlates of haloperidol-induced oral dyskinesias in rat. *Exp Neurol* 127:62-69.
18. Jiang LH, Kasser RJ, Altar CA, Wang RY (1990): One year of continuous treatment with haloperidol or clozapine fails to induce a hypersensitive response of caudate putamen neurons to dopamine D1 and D2 receptor agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 253:1198-1205.
19. Blin J, Baron JC, Cambon H, Bonnet AM, Dubois B, Loc'h C, et al. (1989): Striatal dopamine D2 receptors in tardive dyskinesia: PET study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 52:1248-1252.
20. Andersson U, Eckernäs SA, Hartvig P, et al. (1990): Striatal binding of ¹¹C-NMSP studied with positron emission tomography in patients with persistent tardive dyskinesia: no evidence for altered dopamine D₂ receptor binding. *J Neural Transm [Gen Sect]* 79: 215-226.

21. Riederer P, Jellinger K, Gabriel E (1983): ³H-spiperone binding to post-mortem putamen in paranoid and non-paranoid schizophrenics. In: Pichot P, editor. *Psychiatry: The State of the Art*. New York: Plenum Press, 563-570.
22. Kornhuber J, Riederer P, Reynolds GP, Beckmann H, Jellinger K, Gabriel E (1989): ³H-Spiperone binding sites in post-mortem brains from schizophrenic patients: relationship to neuroleptic drug treatment, abnormal movements, and positive symptoms. *J Neural Transm* 75:1-10.
23. Reynolds GP, Brown JE, McCall JC, Mackay AVP (1992): Dopamine receptor abnormalities in the striatum and pallidum in tardive dyskinesia: a post mortem study. *J Neural Transm [GenSect]* 87:225-230.
24. Bezard E, Ferry S, Mach U, Stark H, Leriche L, Boraud T, Gross C, Sokoloff P (2003): Attenuation of levodopa-induced dyskinesia by normalizing dopamine D₃ receptor function. *Nat Med* 9:762-767.
25. Visanji NP, Fox SH, Johnston T, Reyes G, Millan MJ, Brotchie JM (2009): Dopamine D₃ receptor stimulation underlies the development of L-DOPA-induced dyskinesia in animal models of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 35:184-192.
26. Steen VM, Lovlie R, MacEwan T, McCreadie RG (1997): Dopamine D₃-receptor gene variant and susceptibility to tardive dyskinesia in schizophrenic patients. *Molec Psychiatry* 2:139-145.
27. Bakker PR, van Harten PN, van Os J (2006): Antipsychotic-induced tardive dyskinesia and the Ser9Gly polymorphism in the DRD₃ gene: a meta analysis. *Schizophr Res* 83:185-192.
28. Lundstrom K, Turpin MP (1996): Proposed schizophrenia-related gene polymorphism: expression of the Ser9Gly mutant human dopamine D₃ receptor with the Semliki Forest virus system. *Biochem Biophys Res Commun* 225:1068-1072.
29. Werge T, Elbaek Z, Andersen MB, Lundbaek JA, Rasmussen HB (2003): *Cebus apella*, a nonhuman primate highly susceptible to neuroleptic side effects, carries the GLY9 dopamine receptor D₃ associated with tardive dyskinesia in humans. *The Pharmacogenomics J* 3:97-100.

30. McCormick PN, Wilson VS, Wilson AA, Remington GJ (2013): Acutely administered antipsychotic drugs are highly selective for dopamine D2 over D3 receptors. *Pharmacological Res* 70:66-71.
31. Hong JS, Yang H-YT, Gillin JC, Costa E (1980): Effects of long-term administration of antipsychotic drugs on enkephalinergic neurons. In: Cattabeni F, Racagni G, Spano PF, Costa E, editors. *Long-Term Effects of Neuroleptics*. Advances in Biochemical Psychopharmacology, vol 24. New York: Raven Press, 223-232.
32. Ethier I, Beaudry G, St-Hilaire M, Milbrandt J, Rouillard C, Lévesque D (2004): The transcription factor NGFI-B (Nur77) and retinoids play a critical role in acute neuroleptic-induced extrapyramidal effect and striatal neuropeptide gene expression. *Neuropsychopharmacology* 29:335-346.
33. Mahmoudi S, Blanchet PJ, Lévesque D (2013): Haloperidol-induced striatal Nur77 expression in a non-human primate model of tardive dyskinesia. *Eur J Neurosci* 38:2192-2198.
34. Nyberg S, Chou Y-H, Halldin C (2002): Saturation of striatal D₂ dopamine receptors by clozapine. *Int J Neuropsychopharmacol* 5:11-16.
35. Savasta M, Dubois A, Scatton B (1986): Autoradiographic localization of D₁ dopamine receptors in the rat brain with [³H]SCH 23390. *Brain Res* 375:291-301.
36. Martres M-P, Bouthenet M-L, Sokoloff P, Schwartz J-C (1985): Widespread distribution of brain dopamine receptors evidenced with [¹²⁵I]iodosulpride, a highly selective ligand. *Science* 228:752-755.
37. Stanwood GD, Artymyshyn RP, Kung M-P, Kung HF, Lucki I, McGonigle P (2000): Quantitative autoradiographic mapping of rat brain dopamine D₃ binding with [¹²⁵I]7-OH-PIPAT: Evidence for the presence of D₃ receptors on dopaminergic and nondopaminergic cell bodies and terminals. *J Pharmacol Exp Ther* 295:1223-1231.
38. Paxinos G (2009): *The rhesus monkey brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, Boston.
39. Mahmoudi S, Samadi P, Gilbert F, Ouattara B, Morissette M, Grégoire L, et al. (2009): Nur77 mRNA levels and L-Dopa-induced dyskinesias in MPTP monkeys treated with docosahexaenoic acid. *Neurobiol Dis* 36:213-222.

40. Krause JE, Chirgwin JM, Carter MS, Xu ZS, Hershey AD (1987): Three rat preprotachykinin mRNAs encode the neuropeptides substance P and neurokinin A. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:881-885.
41. Gerfen CR, Young WS 3rd (1988): Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix compartments: an *in situ* hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study. *Brain Res* 460:161-167.
42. Guigoni C, Aubert I, Li Q, Gurevich VV, Benovic JL, Ferry S, et al. (2005): Pathogenesis of levodopa-induced dyskinesia: focus on D1 and D3 dopamine receptors. *Parkinsonism Rel Disord* 11: S25-S29.
43. Ellison G, Johansson P, Levin E, See R, Gunne L (1988): Chronic neuroleptics alter the effects of D1 agonist SKF38393 and the D2 agonist LY 171555 on oral movements in rats. *Psychopharmacology* 96:253-257.
44. Ikeda H, Adachi K, Hasegawa M, Sato M, Hirose N, Koshikawa N, Cools AR (1999): Effects of chronic haloperidol and clozapine on vacuous chewing and dopamine-mediated jaw movements in rats: evaluation of a revised animal model of tardive dyskinesia. *J Neural Transm* 106:1205-1216.
45. Lublin H, Gerlach J (1988): Behavioural effects of dopamine D-1 and D-2 receptor agonists in monkeys previously treated with haloperidol. *Eur J Pharmacol* 153:239-245.
46. Lublin H, Gerlach J, Peacock L (1992): Effect of D₁ and D₂ agonists in primates withdrawn from long-term treatment with haloperidol: the potential role of dopamine D₁ receptors in dyskinesia. *Clin Neuropharmacol* 15:448-458.
47. Rosengarten H, Schweitzer JW, Friedhoff AJ (1986): Selective D2 receptor reduction enhances a D1 mediated oral dyskinesia in rats. *Life Sci* 39:29-35.
48. Johansson P, Levin LE, Gunne L, Ellison G (1987): Opposite effects of D1 and D2 agonists on oral movements in rats. *Eur J Pharmacol* 134:83-88.
49. Gerlach J, Casey DE (1988): Tardive dyskinesia. *Acta Psychiatr Scand* 77:369-378.

50. Murray AM, Waddington JL (1989): The induction of grooming and vacuous chewing by a series of selective D-1 dopamine receptor agonists: two directions of D1:D2 interaction. *Eur J Pharmacol* 160:377-384.
51. Peacock L, Gerlach J (1997): A reanalysis of the dopamine theory of tardive dyskinesia: the D1/D2 imbalance hypothesis. In: Yassa R, Nair NPV, Yuan J, editors. *Neuroleptic-induced movement disorders*. Cambridge: Cambridge University, 141-160.
52. Ikeda H, Adachi K, Hasegawa M, Sato M, Hirose N, Koshikawa N, Cools AR (1999): Effects of chronic haloperidol and clozapine on vacuous chewing and dopamine-mediated jaw movements in rats: evaluation of a revised animal model of tardive dyskinesia. *J Neural Transm* 106:1205-1216.
53. Van Kampen JM, Stoessl AJ (2000): Dopamine D1A receptor function in a rodent model of tardive dyskinesia. *Neuroscience* 101:629-635.
54. Egan MF, Hurd Y, Hyde TM, Weinberger DR, Wyatt RJ, Kleinman JE (1994): Alterations in mRNA levels of D2 receptors and neuropeptides in striatonigral and striatopallidal neurons of rats with neuroleptic-induced dyskinesias. *Synapse* 18:178-189.
55. Glenthøj B, Arnt J, Hyttel J (1990): Effect of a dopamine D-1 agonist in rats treated chronically with zuclopenthixol. *Life Sci* 47:1339-1346.
56. Knable MB, Hyde TM, Egan MF, Tosayali M, Wyatt RJ, Kleinman JE (1994): Quantitative autoradiography of striatal dopamine D1, D2 and re-uptake sites in rats with vacuous chewing movements. *Brain Res* 646:217-222.
57. Florijn WJ, Tarazi FI, Creese I (1997): Dopamine receptor subtypes: differential regulation after 8 months treatment with antipsychotic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 280:561-569.
58. Sasaki T, Kennedy JL, Noregá JN (1998): Regional brain changes in [³H]SCH 23390 binding to dopamine D1 receptors after long-term haloperidol treatment: lack of correspondence with the development of vacuous chewing movements. *Behav Brain Res* 90:125-132.

59. Petersen R, Finsen B, Andreassen OA, Zimmer J, Jorgensen HA (2000): No changes in dopamine D1 receptor mRNA expression neurons in the dorsal striatum of rats with oral movements induced by long-term haloperidol administration. *Brain Res* 859:394-397.
60. Farde L, Nordström A-L, Wiesel F-A, Pauli S, Halldin C, Sedvall G (1992): Positron emission tomographic analysis of central D₁ and D₂ dopamine receptor occupancy in patients treated with classical neuroleptics and clozapine. Relation to extrapyramidal side effects. *Arch Gen Psychiatry* 49:538-544.
61. Bateup HS, Svenningsson P, Kuroiwa M, Gong S, Nishi A, Heintz N, Greengard P (2008): Cell type-specific regulation of DARPP-32 phosphorylation by psychostimulant and antipsychotic drugs. *Nature Neurosci* 11:932-939.
62. Sunahara RK, Guan H-C, O'Dowd BF, Seeman P, Laurier LG, Ng G, et al. (1991): Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature* 350(6319):614-619.
63. Littrell K, Magill AM (1993): The effect of clozapine on preexisting tardive dyskinesia. *J Psychosoc Nurs Ment Health Serv* 31:14-18.
64. Sun J, Xu J, Cairns NJ, Perlmutter JS, Mach RH (2012): Dopamine D₁, D₂, D₃ receptors, vesicular monoamine transporter type-2 (VMAT2) and dopamine transporter (DAT) densities in aged human brain. *PLoS One* 7(11):e49483
65. Surmeier DJ, Song W-J, Yan Z (1996): Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *J Neurosci* 16:6579-6591.
66. Ridray S, Griffon N, Mignon V, Souil E, Carboni S, Diaz J, et al. (1998): Coexpression of dopamine D₁ and D₃ receptors in islands of Calleja and shell of nucleus accumbens of the rat: opposite and synergistic functional interactions. *Eur J Neurosci* 10:1676-1686.
67. Wang W, Hahn KH, Bishop JF, Gao DQ, Jose PA, Mouradian MM (1996): Up-regulation of D3 dopamine receptor mRNA by neuroleptics. *Synapse* 23:232-235.
68. Normand E, Popovici T, Fellmann D, Bloch B (1987): Anatomical study of enkephalin gene expression in the rat forebrain following haloperidol treatment. *Neurosci Lett* 83:232-236.

69. Andreassen OA, Waage J, Finsen B, Jørgensen HA (2003): Memantine attenuates the increase in striatal preproenkephalin mRNA expression and development of haloperidol-induced persistent oral dyskinesias in rats. *Brain Res* 994:188-192.
70. Lévesque D, Rouillard C (2007): Nur77 and retinoid X receptors: crucial factors in dopamine-related neuroadaptation. *Trends Neurosci* 30: 22-30.

Figure legends

Figure 1. [³H]SCH23390 binding to D₁ receptors. **A)** The left panels illustrate schematic representations of monkey brain coronal sections taken at anterior (top) and posterior (bottom) levels of the basal ganglia subdivision areas used for quantification. **B)** Representative autoradiograms in anterior (top panels) and posterior (bottom panels) in untreated controls (CTL), haloperidol-treated (HAL) and clozapine-treated (CLZ) monkeys. **C)** Histograms showing binding results expressed in percentages relative to respective CTL group values (* p < 0.05 and ** p < 0.01 vs CTL respective groups). Abbreviations: Acc, nucleus accumbens; CD, caudate nucleus; PM, medial putamen; PL, lateral putamen; GPi, internal globus pallidus.

Figure 2. [¹²⁵I]iodosulpiride binding at D₂ receptors. **A)** The left panels illustrate schematic representations of monkey brain coronal sections taken at anterior (top) and posterior (bottom) levels of the basal ganglia subdivision areas used for quantification. **B)** Representative autoradiograms in anterior (top panels) and posterior (bottom panels) of [¹²⁵I]iodosulpiride binding in unmedicated control (CTL), haloperidol (HAL)- and clozapine (CLZ)-exposed groups. **C)** Histograms showing binding results expressed in percentages relative to CTL group values. (* p < 0.05 vs CTL group). Abbreviations: Acc, nucleus accumbens; CD, caudate nucleus; PM, medial putamen; PL, lateral putamen; GPe, external globus pallidus.

Figure 3. [¹²⁵I]iodosulpiride and [¹²⁵I]7-OH-PIPAT bindings in mesencephalic areas. **A, D)** The left panels illustrate schematic representations of monkey brain coronal sections taken at substantia nigra levels showing subdivision areas used for quantification. **B, E)** Representative autoradiograms of [¹²⁵I]iodosulpiride (**B**) and [¹²⁵I]7-OH-PIPAT (**E**) binding in unmedicated control (CTL) group. **C, F)** Histograms showing binding results

expressed in percentages relative to CTL group values for [¹²⁵I]iodosulpride (**C**) and [¹²⁵I]7-OH-PIPAT (**F**) in substantia nigra pars compacta (SNc) and substantia nigra pars reticulata (SNr), respectively. (* p < 0.05 vs CTL group).

Figure 4. [¹²⁵I]7-OH-PIPAT binding at D₃ receptors. **A)** Coronal sections taken as in figure 1. **B)** Representative autoradiograms from controls (CTL), haloperidol-treated (HAL) and clozapine-treated (CLZ) animals. **C)** Histograms showing binding results expressed in percentages relative to CTL group values (** p < 0.05 and *** p < 0.01 vs CTL groups). Insets: comparison of [¹²⁵I]7-OH-PIPAT binding in haloperidol-treated monkeys without (No-dysk) and with (Dysk) tardive dyskinesia (* p < 0.05 vs No-dysk respective group). Abbreviations: Acc, nucleus accumbens; CD, caudate nucleus; PM, medial putamen; PL, lateral putamen; GPi, internal globus pallidus.

Figure 5. Linear regression curve showing correlation between [¹²⁵I]7-OH-PIPAT binding (nCi/mg tissue) in lateral putamen (PL) and tardive dyskinesia scores in 5 monkeys chronically exposed to haloperidol. Regression analysis indicates that the correlation explains about 80% of the variance in the group.

Figure 6. Preproenkephalin (PPE) mRNA hybridization. **A)** Coronal sections taken as in figure 1. **B)** Representative autoradiograms obtained from untreated controls (CTL), haloperidol-treated (HAL) and clozapine-treated (CLZ) animals. **C)** Histograms showing densitometry results expressed in percentages relative to CTL group values (* p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001 vs CTL respective groups; # p < 0.05, ## p < 0.01 and ### p < 0.001 vs HAL group). Abbreviations: Acc, nucleus accumbens; CD, caudate nucleus; PM, medial putamen; PL, lateral putamen.

Figure 7. Double *in situ* hybridization procedure with [³⁵S]UTP-labeled D₃ receptors and non-radioactive dioxygenin(Dig)-labeled preprotachykinin (PPT), which produces substance P (SP). Neuron counting was measured in 5-10 different fields within the anterior dorsal putamen, on 4 different sections obtained from a total of 3 animals per group.: **A)** Examples of D₃-labeled cell (black arrow), SP-labeled cell (white arrow), and double-labeled D₃/SP cells (arrowheads) identified by the apposition of more than 10 silver grains with the colored product of the Dig reaction (photograph magnification 400X). **B)** Histograms showing number of single-labeled cells/mm² for the PPT/SP probe in controls (CTL) and haloperidol-treated (HAL) animals. **C)** Histograms showing number of single-labeled cells/mm² for the D₃ receptor probe in controls (CTL) and haloperidol-treated (HAL) animals (* p < 0.05 vs CTL group). **D)** Histograms showing the percentage of D₃ receptor-labeled cells in SP⁻-cells and SP⁺-cells in controls (CTL) and haloperidol-treated (HAL) animals (* p < 0.05 vs CTL SP⁺-cells group).

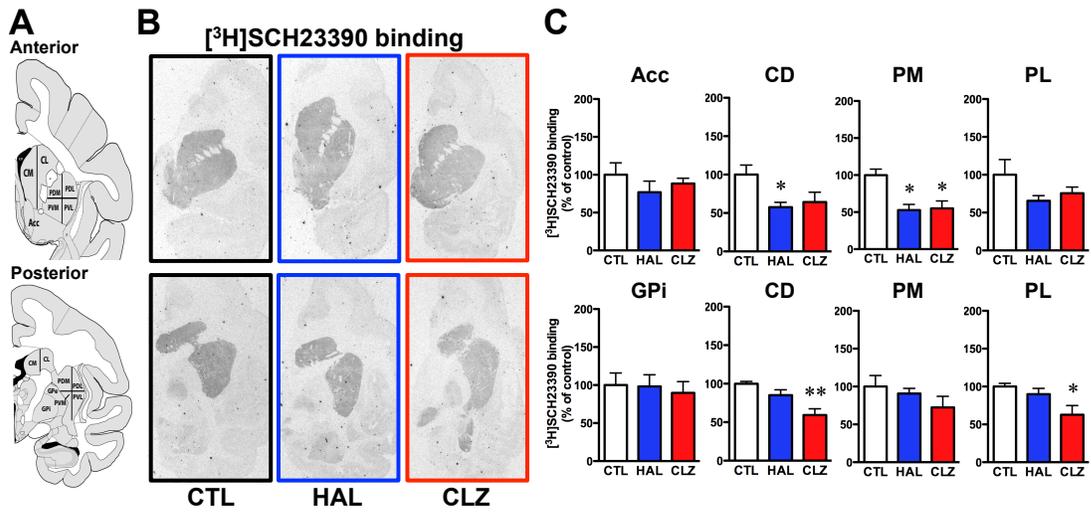


Figure 1

¹²⁵I]iodosulpride binding

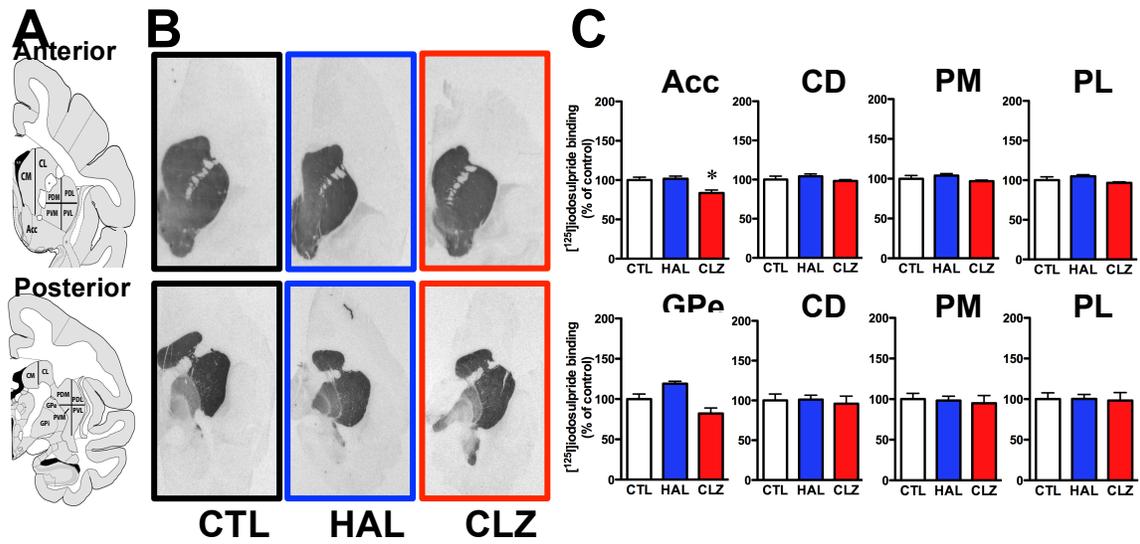


Figure 2

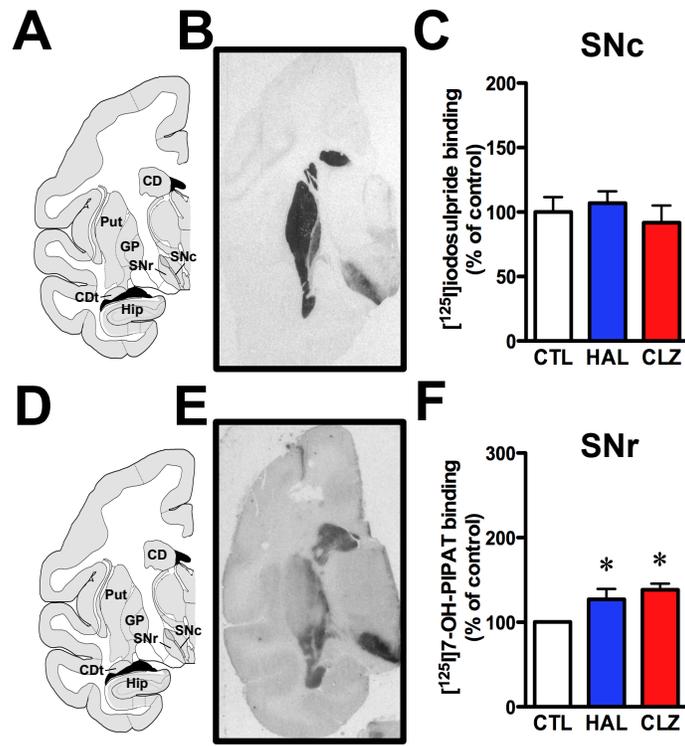


Figure 3

125 I]7-OH-PIPAT binding

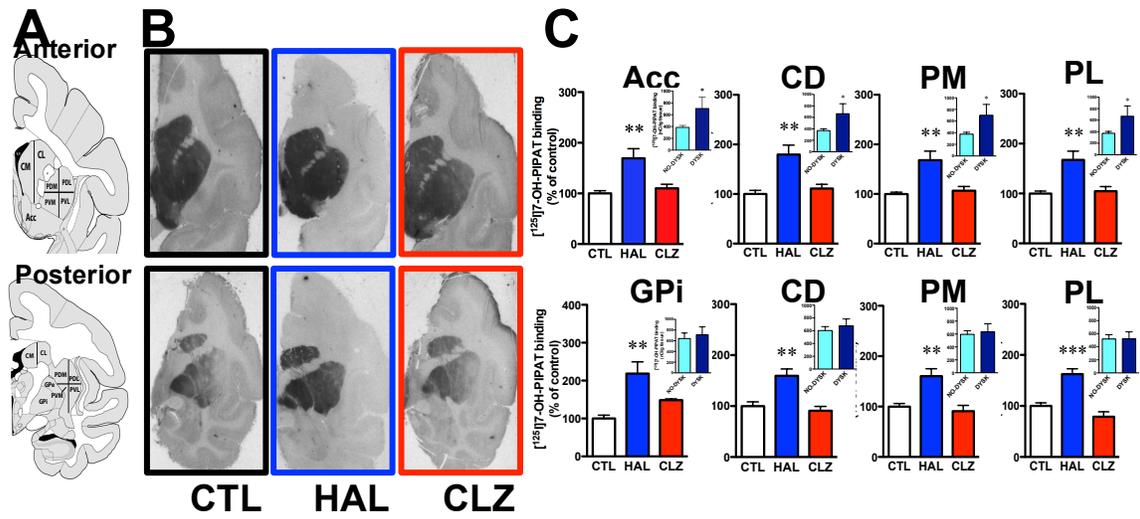


Figure 4

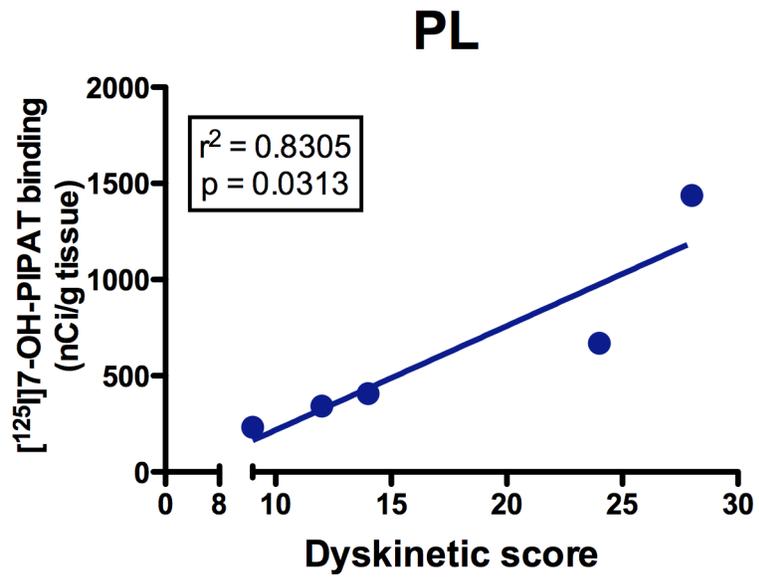


Figure 5

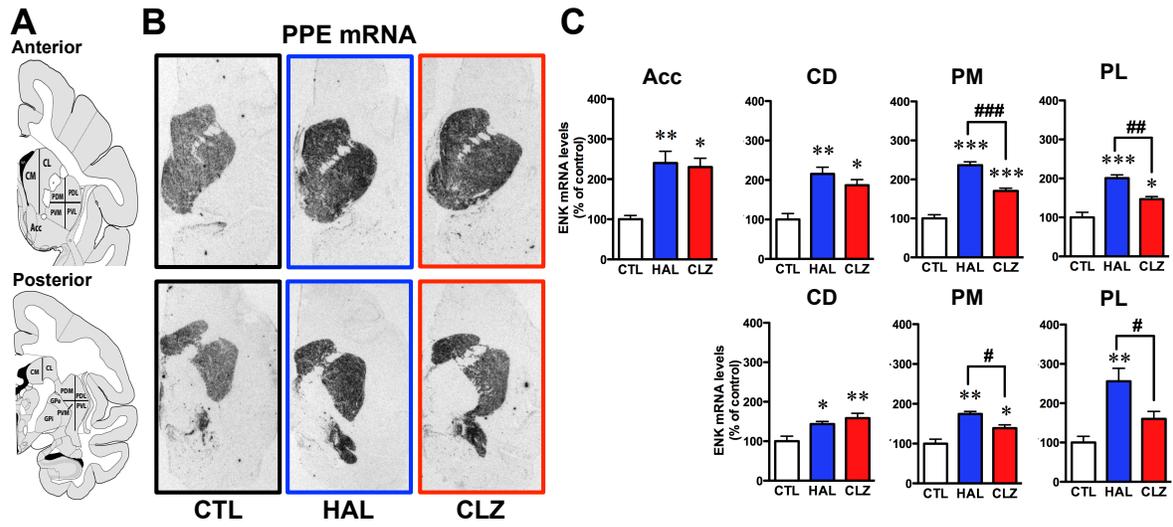


Figure 6

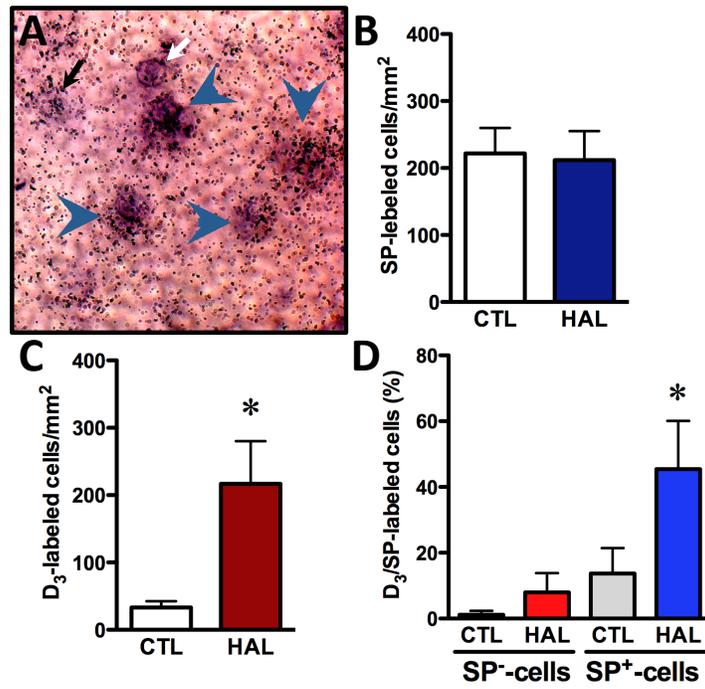


Figure 7

Chapitre XI: *Nur77* mRNA levels and L-Dopa-induced dyskinesias in MPTP monkeys treated with docosahexaenoic acid

1. Contribution du candidat

L'étude menée dans cet article a été entreprise sur des cerveaux de singes qui ont servi pour une étude comportementale réalisée par Pershia Samadi sous la direction de Thérèse Di Paolo [338]. L'autoradiographie et l'analyse des concentrations de la DA, ont été réalisées préalablement par Bazoumana Ouattara. Les autres co-auteurs, ont aidé soit à couper les cerveaux soit à faire les constructions de sondes. Les hybridations in situ, simples et doubles, ainsi que l'immunohistochimie ont été réalisées en totalité par la candidate. Les quantifications et les analyses statistiques ont été également menées par la candidate.

2. Article#3: *Nur77* mRNA levels and L-Dopa-induced dyskinesias in MPTP monkeys treated with docosahexaenoic acid

***Nur77* mRNA levels and L-Dopa-induced dyskinesias in MPTP monkeys treated
with docosahexaenoic acid**

Souha Mahmoudi, Pershia Samadi, François Gilbert, Bazoumana Ouattara, Marc Morissette, Laurent Grégoire, Claude Rouillard, Thérèse Di Paolo and Daniel Lévesque

Abbreviated title: *Nur77* in Dopa-treated MPTP monkeys

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR), the Parkinson Society of Canada (PSC) and the Parkinson's Disease Foundation (PDF) of United States. P.S. held a post-doctoral fellowship from CIHR-Rx&D.

Abstract

We have previously shown that docosahexaenoic acid (DHA) significantly reduced L-Dopa-induced dyskinesia (LID) in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) monkeys (Samadi et al., *Ann. Neurol.* **59**:282-288, 2006). In the present study, we measured for the first time mRNA levels of *Nur77*, an orphan nuclear receptor that participates to adaptive and/or aberrant dopamine-related behaviors, and retinoid X receptor g1 (RXRg1), a putative brain receptor for DHA and transcriptional partner of *Nur77*, in MPTP monkeys treated with L-Dopa and DHA. The RXRg1 mRNA is strongly expressed in monkey caudate nucleus and putamen, but no change in levels of RXRg1 was observed following MPTP and L-Dopa treatments. On the other hand, denervation reduced *Nur77* mRNA levels, whereas chronic L-Dopa treatment strongly induced *Nur77* transcripts. These modulations are taking place in substance P positive cells and are associated with both caudate-putamen matrix and striosome compartments. Interestingly, combination of L-Dopa with DHA further increases *Nur77* mRNA levels in the anterior caudate-putamen, and mainly in striosomes. This is accompanied by a significant inverse correlation between *Nur77* mRNA levels and dyskinetic scores. Taken together, our results show that *Nur77* expression is modulated following dopamine denervation and chronic L-Dopa therapy in a non-human primate model of Parkinson's disease, and suggest that strong modulation of *Nur77* expression might be linked to a reduced risk to develop LIDs.

Introduction

Levodopa (L-Dopa) therapy is the most common treatment for Parkinson's disease (PD). However, in a large proportion of individuals, therapy is hampered by the development

of motor complications such as fluctuations, shortening of the motor response (also called wearing off) and dyskinesias. L-Dopa-induced dyskinesia (LID) is an important motor complication of chronic L-Dopa administration, with a prevalence ranging from 45-85% (Brotchie et al; 2005). The development of LIDs over time is a complex process that remains only partially understood, for review see (Brotchie et al; 2005; Calabresi et al; 2008; Cenci, 2007). Importantly, once the brain is primed to elicit dyskinesias, it is difficult to treat parkinsonian symptoms without inducing dyskinesias. LIDs are also extremely difficult to reduce or reverse once they have appeared. In fact, LID can become so severely disabling as to negate any clinical benefit from dopaminergic therapy in advanced PD patients.

Non human primates intoxicated with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxin develop a Parkinsonian-like syndrome that is very similar to motor symptoms associated with PD in humans. This model also allows insights about molecular changes taking place subsequently to dopamine neurons loss and further treatment. In addition, this parkinsonian primate model has been proven to mimic particularly well both the initial characteristic of L-Dopa behavioral response and the development of long-term motor complications, such as LID (Calon et al; 2000).

LIDs can be assimilated to a form of pathological learning or plasticity (Bédard et al., 1999; Cenci, 2007). Their delayed appearance and persistence after treatment cessation strongly suggest that long term and possibly permanent basal ganglia circuitry alterations are involved. Therefore, transcription factors, which regulate gene expression, are likely to be involved in these molecular processes. Indeed, chronic Fos proteins of the Δ FosB family of transcription factors in the caudate-putamen, which, when coupled with Jun-D, form AP-1 complexes that can modulate the expression of several genes associated with the generation of LIDs in rodent and primate models of PD (Andersson et al., 1999; Doucet et al., 1996; Pavon et al., 2006). In recent years, we have shown that an orphan transcription factor of the nuclear receptor family, namely *Nur77* (also known as Nerve-Growth Factor Inducible gene B (NGFI-B) or NR4A1) might also be associated with movement disorders in rodent models of PD (Sgambato-Faure et al.,

2005; St-Hilaire et al., 2006; St-Hilaire et al., 2005; St-Hilaire et al., 2003; van den Munckhof et al., 2006).

Nur77 is a member of the *Nur* family, which also includes *Nurr1* and *Nor-1*. Basal levels of *Nur77* are found in most of dopaminergic structures such as the striatum, nucleus accumbens, olfactory tubercle and prefrontal cortex (Xiao et al., 1996; Zetterström et al., 1996b). Its expression is strongly modulated after manipulation of dopamine neurotransmission, for review see (Lévesque and Rouillard, 2007). Unilateral denervation induced by local injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in rats produces a complex regulation of *Nur77* in the striatum (St-Hilaire et al., 2005; St-Hilaire et al., 2003). The expression of *Nur77* transcripts is selectively up-regulated in enkephalin (ENK)-containing cells of the indirect striatal output pathway, whereas *Nur77* expression is reduced in dynorphin (DYN)-positive cells of the direct output pathway in the denervated striatum (St-Hilaire et al., 2005; St-Hilaire et al., 2003). Interestingly, subsequent chronic L-DOPA treatment further reduced *Nur77* expression in DYN-positive cells in specific striatal areas, whereas it strongly increased *Nur77* mRNA levels in this same cell subpopulation in the non-denervated striatum (St-Hilaire et al., 2005; St-Hilaire et al., 2003).

Nur77 can exert its transcriptional activity as a monomer, homodimer or heterodimer with retinoid X receptors (RXR) (Forman et al., 1995; Maira et al., 1999, Zetterström et al., 1996a). Double *in situ* hybridization labeling indicated that the typical antipsychotic haloperidol strongly increased the co-localization of *Nur77* and RXR α 1 isoform in striatal cells (Ethier et al., 2004a). Accordingly, RXR ligands can modulate biochemical and behavioral responses associated with antipsychotic drug administration (Ethier et al., 2004a; Ethier et al., 2004b). For example, haloperidol-induced vacuous chewing movements in mice, which resemble tardive dyskinesias in humans, were exacerbated in animals treated with a synthetic RXR antagonist (HX531), whereas administration of the polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid (DHA), an endogenous RXR agonist in brain (Mata de Urquiza et al., 2000), significantly reduced haloperidol-induced oro-facial dyskinesias (Ethier et al., 2004b). Interestingly, effects of

the RXR agonist and antagonist were abolished in *Nur77* knockout mice, indicating that *Nur77* is necessary for the activity of these RXR compounds (Ethier et al., 2004b).

Since tardive dyskinesias induced by chronic dopamine receptor blockade with conventional antipsychotic drugs and LIDs may share common biological substrates, we hypothesized that DHA may also reduce LIDs in MPTP monkeys. We previously reported the behavioral data of concomitant administration of DHA with L-Dopa (Samadi et al., 2006). This study showed that DHA significantly reduced LID scores in MPTP-treated monkeys without altering the anti-parkinsonian activity of L-Dopa (Samadi et al., 2006). In the present study, we report, for the first time, the expression of *Nur77* and RXRg1 in non-human primate brains. The data suggest that strong modulation of *Nur77* expression might be linked to a reduced risk to develop LIDs.

Material and methods

Animals and treatments

Handling of primates was performed in accordance to the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. All procedures, including means to minimize discomfort, were reviewed and approved by the Institutional Animal Care Committee of Laval University. Cynomolgus (*Macaca Fascicularis*) ovariectomized female monkeys weighing 3-5 kg were used in the present study. Animals were housed separately in individual observation cages in a temperature-controlled room and exposed to a 12-hour light/dark cycle. They were fed once daily in the afternoon, and water was provided *ad libitum*. The number of animals was kept to a minimum, and all efforts were made to avoid animal suffering. Five animals were used as healthy controls, while the other 15 received the neurotoxin MPTP (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, Ontario) dissolved in sterile water and injected continuously at 0.5 mg/24 h using Alzet

minipumps (Alzet Inc. Cupertino, CA, USA). In general, one month was needed to induce a stable parkinsonian syndrome. The cumulative dose to achieve this goal was in average 18.1 ± 3.8 and 13.9 ± 2.5 mg for L-Dopa and L-Dopa plus DHA groups, respectively (Samadi et al., 2006). The animals were scored several times a week with a disability scale, as previously described (Bélanger et al., 2003). This study was undertaken several months after a stable parkinsonian syndrome had developed (the time after MPTP was 149 ± 63 and 190 ± 42 days for L-Dopa and L-Dopa + DHA groups, respectively) (Samadi et al., 2006). Ten *de novo* MPTP intoxicated animals were treated with L-Dopa, five received L-Dopa alone, while the others received L-Dopa plus DHA. We used a fixed high daily oral dose of 100/25 mg of L-Dopa/benserazide (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, Ontario). For the L-Dopa plus DHA group, MPTP-treated monkeys were first exposed to DHA (100 mg/kg, p.o., in a volume of 20-25 ml according to the weight of the animal) for 3 days before L-Dopa therapy was introduced. Then, combined oral administration of L-Dopa and DHA was performed on a daily basis for 1 month. Locomotor activity, as well as parkinsonian and dyskinetic scores of these animals have been previously reported (Samadi et al., 2006). All animals were sacrificed by an overdose of pentobarbital 4 hours after their last L-Dopa dose.

Tissue preparation

Brains were rapidly removed and stored, as previously described (Morissette et al., 2006). Briefly, they were placed in isopentane cooled in dry ice (-40°C) and kept frozen at -80°C . Hemisected brains were cut into coronal sections of $12\mu\text{m}$ on a cryostat (-20°C). The slices were thaw-mounted onto SuperFrostPlus (Fisher Scientific Ltd, Nepean, ON, Canada) 75 x 50 mm slides and stored at -80°C until use.

Dopamine concentrations and [^{125}I]RTI-121 autoradiography

Pieces of coronal brain sections were homogenized in 250 μ l of 0.1 M HClO₄ at 4°C. The homogenate was centrifuged at 10,000 \times g for 20 min. the supernatants were kept at -80°C. The pellets were dissolved in 100 μ l of 0.1 M NaOH for assays of protein content. The concentration of dopamine was measured by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection (Morissette et al., 2006). Extent of denervation was also evaluated by measuring the dopamine transporter (DAT) with [¹²⁵I]RTI-121 (3 β -(4-I-iodophenyl)tropane-2 β -carboxylic acid isopropyl ester, 2200 Ci/mmol; Mandel, Boston, MA, USA) binding autoradiography. Specific binding was measured using 25 pM of [¹²⁵I]RTI-121. Non-specific binding was determined by adding 100 nM of Mazindol (Sandoz Pharmaceuticals, Dorval, Qc, Canada) to the incubation buffer (Morissette et al., 2006).

Complementary RNA probe preparation and synthesis

In order to label *Nur77* mRNA in monkey brain tissues, we have produced a complementary RNA (cRNA) probe from total RNA of human caudate-putamen tissues. The cRNA probe for *Nur77* stems from a 814 bp (nucleotides 19 to 832) fragment of the full-length human cDNA (GeneBank accession no: NM002135) subcloned into pCRII/TOPO and linearized with Bam HI. The RXR γ 1 cRNA probe was generated from a 320 bp fragment of the rat full-length RXR γ 1 cDNA contained in the pBS-SK⁺ vector and linearized with EcoRI. Both antisense probes were synthesized with a T₇ RNA polymerase. Preliminary experiments indicated that the rat cRNA probe recognized the human RXR γ 1 transcript and both sense probes gave no specific signal (data not shown). Synthesis of specific [³⁵S]UTP-labeled cRNA probes for *Nur77* and RXR γ 1 was performed as previously described (Beaudry et al., 2000; Langlois et al., 2001).

Single in situ hybridization procedure

In situ hybridization with tissue sections was done at 58°C overnight in a standard hybridization buffer containing 50% formamide (Beaudry et al., 2000). Tissue sections were then apposed against BiomaxMR (Kodak, New Haven, CT) radioactive sensitive films for 5 to 7 days for *Nur77* and 7 to 10 days for RXRg1 probe. Quantification of the autoradiograms was performed using computerized analysis (ImageJ 1.41o software, Wayne Rasband, NIH). Digital brain images were taken using a Grayscale Digital Camera (Model CFW-1612M, Scion Corporation, Maryland, USA). Optical gray densities were transformed into nCi/g of tissue equivalent using standard curves generated with ¹⁴C-microscales (ARC 146A-¹⁴C standards, American Radiolabelled Chemicals Inc., St-Louis). Brain areas investigated included anterior and posterior parts of the caudate nucleus and putamen corresponding to Bregma 2.70 to 0.45 (anterior caudate-putamen) and Bregma -6.30 to -8.10 (posterior caudate-putamen) in the atlas of Paxinos, respectively (Paxinos, 2009). Anterior and posterior caudate-putamens have been subdivided into medial and lateral caudate (CM, CL), and dorsolateral (PDL), dorsomedial (PDM), ventrolateral (PVL) and ventromedial putamen (PVM) (Fig. 1). Average levels of labeling for each area were calculated from three adjacent brain sections of the same animals. Background intensities were subtracted from every measurement.

Double in situ hybridization procedure

The double *in situ* hybridization procedure was performed as previously described (Beaudry et al., 2000; St-Hilaire et al., 2003). Briefly, double *in situ* hybridization with a [³⁵S]UTP-labeled *Nur77* and a non-radioactive dioxygenin (Dig)-labeled preprotachykinin, which produces substance P (SP), was performed (Krause et al., 1987). The SP neuropeptide is expressed in the same cell population as DYN and was chosen as a marker of the direct striatal pathway because it possesses a higher basal expression than DYN (Gerfen and Young, 1988). The SP probe was obtained from a 200 bp fragment (from nucleotides 78 to 277) of the rat preprotachykinin mRNA into pGEM-4Z vector. The antisense cRNA probe was obtained by plasmid linearization with EcoR I and polymerization with the T₇ RNA polymerase. Then, the neuropeptide cRNA probe was

labeled with Dig using the Promega Riboprobe System with the Dig-RNA labeling mix (Roche Diagnostics, Laval, Qc, Canada) as previously described (Beaudry et al., 2000; St-Hilaire et al., 2003). Radioactive and Dig-labeled riboprobes were separated from non-hybridized nucleotides on mini Quick spin RNA columns (Roche Diagnostics, Laval, Qc, Canada). Double *in situ* hybridization was performed under the same conditions as those described for the single hybridization with *Nur77*. The Dig cRNA probe (SP, 0.75ng/ μ l) was added in the hybridization mix with the radioactive-labeled probe (4 to 5×10^6 cpm/ μ l). After overnight incubation an additional wash step using 50% formamide solution in 2 SSC buffer was performed to reduce non-specific Dig labeling. For Dig revelation, brain sections were blocked with 2% BSA and 0.3% Triton X-100 in buffer A (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl), for 30 min at room temperature. Slides were then incubated overnight at 4°C with an anti-Dig antibody conjugated with alkaline phosphatase (Boehringer-Ingelheim Canada, Laval, Qc, Canada). The next day, slides were washed three times in buffer A for 10 min and then in buffer B (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl and 50mM MgCl₂) for 10 min, and finally incubated in a chromogen solution (buffer B containing 330 μ g/ml nitroblue tetrazolium chloride plus 180 μ g/ml 5-bromo-4chloro-3indolyl phosphate and 1mM levamisole). Intensity of staining was checked along the incubation. When an adequate staining was obtained, slides were incubated in buffer C (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1mM EDTA) for 30 min to stop the reaction. Slides were dried up and then dipped in LM-1 photographic emulsion previously melted at 42°C (for 3h). Two months later, emulsion was developed in D-19 developer (3.5 min) and fixed (5 min) in Rapid Fixer solution (Kodak). Slides were mounted using a water-soluble mounting medium. Single- and double-labeled cells were visualized and manually counted with an Axio Imager A.1 photo microscope (Carl Zeiss Canada Ltd, Montreal, Qc, Canada), at 400x magnification. Neuron counting was performed in 5-10 different fields within the anterior dorsal putamen. Double-labeled cells were identified by the apposition of more than 10 silver grains with the colored product of the Dig reaction. Neuron counting was performed on 4 different sections obtained from a total of 4 animals per group investigated.

Acetylcholinesterase histochemistry

For the demonstration of acetylcholinesterase (AChE) staining, we used the Karnovsky and Roots (1964) method with the modifications described below (Karnovsky and Roots, 1964). Brain sections were incubated in an incubation medium prepared by adding in order 5 mg of acetylthiocholine iodide, 0.1 mM acetate buffer at pH 6, 0.1 M sodium citrate, 30 mM copper sulfate, 1ml distilled water and 5 mM potassium ferricyanide. Slides were incubated for one hour in the incubation medium at 37°C. When the optimal contrast was obtained, slides were rinsed intensively in distilled water to stop the reaction. Slides were then dried up and visualized using an Axiovision Rel 4.6 software (Carl Zeiss Canada Ltd, Montreal, Qc, Canada).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with Prism version 5.0 program (Graph Pad Software Inc. San Diego, CA, USA). All Data were expressed as group mean \pm S.E.M. For mRNA levels, data were compared using a one-way analysis of variance (ANOVA). We first performed a test of homogeneity using Bartlett's test, followed by a logarithmic transformation (when Bartlett's test was significant) and finally applied a one-way ANOVA on transformed data. When the ANOVA revealed significant differences, a Tukey's test was performed as *post hoc* analysis. To investigate the interaction between *Nur77* mRNA levels and dyskinetic scores, correlation coefficients were determined by least-squares linear regression and significance was tested using the null hypothesis.

Results

Behavioral data associated with these animals have been presented elsewhere (Samadi et al., 2006). Briefly, all animals included in this study had similar baseline Parkinsonian scores before L-Dopa treatment and their syndrome was stable when dopamine replacement therapy was introduced (Samadi et al., 2006). Animals treated with L-Dopa alone developed intense LIDs (cumulative LID score of 65 ± 13), while MPTP monkeys receiving concomitant administration of DHA with L-Dopa displayed significantly reduced LIDs (cumulative LID scores of 26 ± 12) without significant effect on anti-parkinsonian activity of L-Dopa (Samadi et al., 2006). In addition, L-Dopa- and L-Dopa + DHA-treated MPTP monkeys displayed similar reversal of their parkinsonian symptoms (mean basal parkinsonian scores for L-Dopa- and L-Dopa + DHA-treated groups were 10.5 ± 0.8 and 11.6 ± 0.8 , respectively, after 4 weeks of treatment, parkinsonian scores were reduced to 4.2 ± 0.2 and 4.5 ± 0.5 for L-Dopa and L-Dopa + DHA group, respectively) (Samadi et al., 2006). In the present study, *de novo* MPTP monkeys, i.e. that they did not received other treatment prior this experiment, have been used. Levels of denervation, as measured with [125 I]RTI-121 DAT binding, were similar (over 95% reduction) in all MPTP-treated animal groups (Table 1). The data also indicates that chronic L-Dopa and L-Dopa + DHA did not significantly modulate DAT binding levels. Dopamine contents were also similar across all MPTP-treated groups and represent less than 10% of the total caudate-putamen dopamine contents measured in controls (caudate nucleus: Control, 138.1 ± 18.4 ; MPTP, $1.7 \pm 0.9^{**}$; MPTP + L-Dopa, $5.3 \pm 2.4^{**}$; MPTP + L-Dopa + DHA, $5.3 \pm 2.4^{**}$ and putamen: Control, 160.9 ± 10.9 ; MPTP, $8.9 \pm 4.3^{**}$; MPTP + L-Dopa, $17.9 \pm 4.2^{**}$; MPTP + L-Dopa + DHA, $14.6 \pm 4.9^{**}$; $^{**} p < 0.01$ vs respective control group). There is no significant residual caudate-putamen dopamine content from conversion of L-Dopa to dopamine at 4h (time of sacrifice) after the last L-Dopa injection since there is no significant difference in dopamine contents between MPTP, MPTP + L-Dopa and MPTP + L-Dopa + DHA groups.

Nur77 mRNA levels are distinctly modulated in L-Dopa- and L-Dopa + DHA-treated MPTP monkeys

Basal *Nur77* mRNA levels in the monkey brain were relatively low in anterior and posterior portions of the caudate nucleus and putamen (Fig. 1 and Table 2). Denervation significantly reduced *Nur77* mRNA levels in all subterritories of the anterior caudate-putamen (reaching 50 to 65% reduction according to caudate nucleus and putamen subterritories) (Fig. 2A). MPTP significantly reduced *Nur77* expression in posterior regions of the medial caudate nucleus (CM), and dorsomedial (PDM) and dorsolateral (PDL) putamen (Fig. 2B). In the anterior caudate-putamen, L-Dopa treatment essentially brought back *Nur77* mRNA levels to control values (Fig. 2A). On the other hand, combination of L-Dopa + DHA significantly further increased *Nur77* mRNA levels in the putamen, compared to L-Dopa alone (Fig. 2A). These increases correspond to 112, 144 and 102% of *Nur77* mRNA levels observed L-Dopa alone groups in PDL, PVL and PVM subterritories, respectively. In the posterior caudate-putamen, L-Dopa alone and L-Dopa + DHA similarly increased *Nur77* mRNA levels (Fig. 2B). A 2-fold increase of *Nur77* expression is observed in the caudate nucleus of L-Dopa and L-Dopa + DHA treated animals, whereas *Nur77* expression reached 3-fold the control values in the putamen (Fig. 2B).

Nur77 mRNA levels were undetectable in the ventral globus pallidus (GPv), external globus pallidus (GPe) and internal globus pallidus (GPi), as well as in the substantia nigra and ventral tegmental area in all the groups investigated. As opposed to rodent brain, basal *Nur77* mRNA levels were barely detectable in the nucleus accumbens. However, similar effects as in the anterior caudate-putamen were observed after the lesion, L-Dopa alone and L-Dopa + DHA treatments, but with lower magnitudes (data not shown).

Nur77 mRNA levels are selectively modulated in substance P-containing cells

We have previously shown that *Nur77* expression is distinctly modulated in the two striatal output pathways (ENK- and DYN-containing cells, respectively) of the striatum in rodent models of PD (St-Hilaire et al., 2003). In order to have a better understanding of the changes taking place in *Nur77* mRNA following dopamine depletion in the MPTP-

treated monkey, we performed double *in situ* hybridization labeling with the SP neuropeptide that is expressed in the direct striatal output pathway (Gerfen et al., 1991; Hurd and Herkenham, 1995). We chose this neuropeptide instead of DYN because basal caudate-putamen SP levels are higher than DYN and therefore more easily quantified after double-labeling procedure. Cellular counts were performed in the anterior dorsal putamen. MPTP reduced the number of *Nur77*-positive cells in this part of the putamen (70% reduction), while L-Dopa alone and L-Dopa + DHA strongly increased the number of *Nur77*-positive cells per surface unit (2-fold increase compared to control) (Fig. 3A,B). These *Nur77* mRNA level changes are consistent with the results observed in the autoradiography analysis (Fig. 2). The number of SP⁺-cells remained unchanged after MPTP, while it was reduced in L-Dopa alone and L-Dopa + DHA groups (data not shown). L-Dopa and L-Dopa + DHA treatment strongly increased the number of SP/*Nur77*-positive cells in this portion of the putamen (about 8 to 9-fold increases) (Fig. 3C). Under basal conditions, the percentage of co-localization of *Nur77* and SP transcripts mRNA is 41 ± 1 % (the remaining 59% being expressed in SP-negative cells). This observation is similar to what we previously reported in DYN-positive cells in rat striatum (St-Hilaire et al., 2003). The percentage of cells co-expressing SP and *Nur77* reached up to 76 ± 3 % and 77 ± 1 % in L-Dopa and L-Dopa + DHA groups, respectively.

Nur77 expression is strongly modulated in the caudate-putamen striosome compartment

As observed in Figure 1, the expression of *Nur77* in the caudate-putamen displays a mosaic-like distribution that resembling to striosomes. To determine striosome-matrix compartmentalization within the caudate-putamen, acetylcholinesterase (AChE) staining was performed on sections adjacent to those used for *in situ* hybridization. Superpositions of AChE staining and *Nur77* mRNA labeling indicate that *Nur77* is expressed in both striosome and matrix compartments. However, the expression of *Nur77* is about 2-fold higher in striosomes compared to the matrix compartment in the anterior putamen and about 20 to 30% higher in other caudate-putamen subterritories

(Fig. 4). MPTP selectively reduced *Nur77* mRNA levels in the striosomes in the anterior caudate-putamen (Fig. 4A), while no effect was observed in posterior areas (Fig. 4B). In the anterior caudate-putamen, L-Dopa alone brought back *Nur77* mRNA levels to control values in striosomes, while it remained without effect in the matrix (Fig. 4A). Concomitant administration of DHA with L-Dopa further increased *Nur77* mRNA levels only in striosomes in the anterior caudate (Fig. 4A), while this treatment further increased *Nur77* expression in both striosomes and matrix in the anterior putamen (Fig. 4A). In the posterior caudate-putamen, L-Dopa alone and L-Dopa + DHA similarly increased *Nur77* mRNA levels in both striosomes and matrix (Fig. 4B).

Nur77 mRNA levels correlate with LID scores

To investigate the relationship between *Nur77* mRNA levels and dyskinetic scores, correlation analysis between *Nur77* mRNA levels in various subterritories of the caudate nucleus and putamen against the total dyskinetic score for each animal in the L-Dopa- and L-Dopa + DHA-treated groups were computed. Interestingly, we found a significant inverse correlation between *Nur77* mRNA levels and individual dyskinetic scores in the anterior PVM and PVL areas (Fig. 5). A similar trend was also observed in the posterior PDM area ($r^2 = 0.532$, $p = 0.063$). Other caudate-putamen subterritories did not display significant correlations (data not shown).

RXRy1 mRNA levels are not modulated by L-dopa and DHA treatments

We measured, for the first time, levels of RXRg1 mRNA in the non-human primate brain. High levels of the RXRg1 mRNA isoform were detected in non-human primate caudate-putamen (Fig. 6A). As for *Nur77*, it displayed a striosome/matrix distribution, which was more clearly apparent in posterior caudate-putamen (Fig. 6A). However, RXRy1 mRNA levels in lateral caudate and putamen were not modulated by any of the treatments in

the present experimental paradigm (Fig. 6B,C) and no effect was detected in other caudate-putamen subterritories as well (data not shown).

Discussion

The main findings of the present study is that *Nur77* mRNA levels are modulated by denervation and L-Dopa treatment and that *Nur77* mRNA levels display an inverse correlation with LID scores. This suggests that *Nur77* participates to adaptive events following dopamine denervation and L-Dopa therapy in a non-human primate model of PD. The study also highlights some difference in the modulation of *Nur77* expression in the primate compared to rodent models of PD.

In rats bearing a unilateral 6-OHDA lesion, complex modulation of *Nur77* mRNA levels were observed in both the intact and lesioned striata (St-Hilaire et., 2005; St-Hilaire et al., 2003). For example, the expression of *Nur77* is selectively up-regulated in ENK-containing cells of the lesioned striatum, while it is down-regulated in DYN-positive cells (St-Hilaire et al., 2003). In DYN cells of the lesioned side of the striatum, L-Dopa treatment further reduced *Nur77* expression, while L-Dopa increased *Nur77* expression in DYN cells on the intact side of the striatum (St-Hilaire et al., 2003). In the MPTP-treated monkey, we observed only a down-regulation of *Nur77* in most of the caudate-putamen subterritories. This suggests that the modulation of *Nur77* in ENK cells observed after unilateral 6-OHDA lesion in rodents is absent in MPTP intoxicated primates. The reason for this apparent discrepancy is not known and needs further investigations. Possible explanations may come from differences in the denervation process that exist between the two models (local and unilateral for 6-OHDA vs systemic and bi-lateral for MPTP), as well as from distinctions between basal ganglia circuitry in rodents and primates. On the other hand, L-Dopa-induced *Nur77* expression is observed in SP cells of the caudate-putamen of MPTP monkeys. This observation is consistent with the modulation of *Nur77* in DYN-positive cells in the intact side of unilateral 6-OHDA-

lesioned rats (St-Hilaire et al., 2003), as well as with some restricted up-regulation of *Nur77* following L-Dopa treatment in the ipsilateral striatum observed in another study (Sgambato-Faure et al., 2005). The modulation of *Nur77* observed in the intact striatum following L-Dopa treatment in unilaterally 6-OHDA-lesioned rats, which is similar to the present study following systemic MPTP and L-Dopa treatment, possibly results from an effect on intratelencephalic corticostriatal neurons that send massive inputs to both ipsilateral and contralateral striatum (Ballion et al., 2008).

DHA, a polyunsaturated fatty acid of the omega-3 class and an endogenous activator of RXR (Mata de Urquiza et al., 2000), can reduce the severity or delay the appearance of LIDs in MPTP monkeys (Samadi et al., 2006). In mice chronically treated with haloperidol and displaying oro-facial dyskinesias, the anti-dyskinetic property of DHA depends on the presence of *Nur77*, since DHA remained inactive in *Nur77* knockout mice (Ethier et al., 2004b). In the present study, we observe high RXRg1 levels in the caudate-putamen and inductions of *Nur77* in L-Dopa-treated MPTP monkeys are inversely correlated with LID scores. Thus, it is tempting to speculate that a similar mechanism might be involved in the anti-dyskinetic effect of DHA in the present non-human primate model of PD. However, we do not know if the anti-dyskinetic property of DHA is directly link to *Nur77*-dependent transcriptional activity (through activation of the *Nur77*/RXR complex). Additional experiments will be required to fully understand the molecular mechanism involved in the anti-dyskinetic property of DHA.

MPTP monkeys rendered parkinsonian displayed elevated amounts of Δ FosB-like proteins and chronic administration of L-Dopa or a selective D₁ agonist, which produced dyskinesias, induced a further elevation of Δ FosB-like immunoreactivity (Doucet et al., 1996; Munoz et al., 2008). In addition, treatment with a dopamine D₂ agonist or combination of L-Dopa with 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists, which did not produce dyskinesias or reversed LIDs, also reversed the elevation of Δ FosB (Doucet et al., 1996; Munoz et al., 2008). These findings suggest that increased Δ FosB expression, in the striatonigral pathway (expressing SP/DYN neuropeptides), may be associated with the development of dyskinesia. This highlights a fundamental distinction between the

modulation of Δ FosB and *Nur77* in the MPTP model, since the present data indicate that induction of *Nur77* expression is, on the contrary, associated with a reduction of LIDs, suggesting that *Nur77* expression is opposed to LID development.

It is interesting to observe that *Nur77* expression and LIDs show correlations only in the anterior caudate-putamen. The anterior caudate and putamen receive inputs from the premotor cortex, dorsolateral prefrontal cortex, orbital cortex and dorsal anterior cingulate cortex (Haber et al., 2006). Therefore, the correlation of *Nur77* mRNA levels and LIDs in the anterior dorsal striatum suggests that *Nur77* might modulate cognitive and learning aspects of motor processes. This is in accordance with the hypothesis that dyskinesias should not be regarded simply as a movement disorder, but also as a limbic and cognitive disorder (Guigoni et al., 2005). In rodents, we did observe a spatial correlation between *Nur77* expression and L-DOPA-induced dyskinesia accompanied (whole striatum) or not (lateral part of the striatum) with locomotor sensitization in unilaterally lesioned 6-OHDA rats in a previous report (Sgambato-Faure et al., 2005). However, no attempt to correlate individual *Nur77* mRNA levels an intensity of LIDs or locomotor sensitization was made. In addition, the correlation was not performed in more anterior parts of the striatum.

In addition to the segregation into direct and indirect pathways, caudate-putamen projection neurons are segregated functionally and biochemically into two major compartments, termed striosome or patch and matrix (Gerfen, 1984; Graybiel and Ragsdale, 1978). Since we observed a strong co-localization between *Nur77* and SP after L-Dopa and L-Dopa + DHA treatments and that immunochemistry of DYN and SP are highly prevalent in striosomes, it is not surprising that these treatments predominantly modulated *Nur77* mRNA levels in striosomes. Interestingly, strong DYN-induced expression in anterior caudate-putamen striosomes has been associated with LIDs (Henry et al., 2003), and it has been proposed that a shift towards striosome-predominant activation of IEGs and DYN after chronic drug treatments could promote repetitive behaviors, such as LIDs (Graybiel et al., 2000). The present data suggests that *Nur77* might also be included in this LID-associated gene expression pattern. However,

as mentioned previously, *Nur77* seems to be involved in a pathway that tend to reduce abnormal dopamine-related behaviors as opposed to Fos-related IEGs.

Transcriptome analysis revealed alterations in the expression of more than 100 genes following dopamine denervation and LID installation (Bassilana et al., 2005; Konradi et al., 2004). So, why *Nur77* represents an interesting candidate in dyskinesias? There are three main reasons. First, modulations of *Nur77* expression were strongly and consistently observed in many different animal models of PD. Second, modulations of *Nur77* expression can be observed after chronic denervation and prolonged dopamine replacement therapy, indicating that these modulations do not desensitized over time. Third, by promoting the formation of the *Nur77*/RXR transcriptional complex (Lévesque and Rouillard, 2007), *Nur77* can be viewed as a molecular switch that renders the striatum responsive to RXR agonists, making *Nur77*-dependent transcriptional activity and RXR an attractive new pharmacological entity aims to control LIDs. We have shown that *Nur77* gene ablation alters the modulation of striatal neuropeptides, like neurotensin, normally observed following denervation and L-DOPA therapy (St-Hilaire et al., 2006). Since, neuropeptides have been associated with homeostatic control of dopamine neurotransmission, it is tempting to speculate that the *Nur77*-dependent (through the *Nur77*/RXR complex) anti-dyskinetic property might be related, at least in part, with its transcriptional activity on those genes. Interestingly, we recently identified a single nucleotide polymorphism (SNP) in the *Nur77* gene that is strongly associated with tardive dyskinesias in a cohort of schizophrenic patients (B. Le Foll, University of Toronto, unpublished data), further reinforcing the relationship between *Nur77* and the pathophysiology of dyskinesias.

References

- Andersson, M., Hilbertson, A., Cenci, M. A., 1999. Striatal FosB expression is causally linked with L-DOPA-induced abnormal involuntary movements and the associated upregulation of striatal prodynorphin mRNA in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 6, 461-474.
- Ballion, B., Mallet, N., Bezard, E., Lanciego, J. L., Gonon, F., 2008. Intratelencephalic corticostriatal neurons equally excite striatonigral and striatopallidal neurons and their discharge activity is selectively reduced in experimental parkinsonism. *Eur. J. Neurosci.* 27, 2313-2321.
- Bassilana, F., Mace, N., Li, Q., Stutzmann, J. M., Gross, C. E., Pradier, L., Benavides, J., Ménager, J., Bezard, E., 2005. Unraveling substantia nigra sequential gene expression in a progressive MPTP-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 20, 93-103.
- Beaudry, G., Langlois, M.-C., Weppe, I., Rouillard, C., Lévesque, D., 2000. Contrasting patterns and cellular specificity of transcriptional regulation of the nuclear receptor Nerve Growth Factor-Inducible B by haloperidol and clozapine in the rat forebrain. *J. Neurochem.* 75, 1694-1702.
- Bédard, P. J., Blanchet, P.-J., Lévesque, D., Soghomonian, J. J., Grondin, R., Morissette, M., Goulet, M., Calon, F., Falardeau, P., Gomez-Mancilla, B., Doucet, J. P., Robertson, G. S., Di Paolo, T., 1999. Pathophysiology of L-dopa-induced dyskinesias. *Mov. Disord.* 14, 4-8.
- Bélanger, N., Grégoire, L., Tahar, A. H., Bédard, P. J., 2003. Chronic treatment with small doses of cabergoline prevents dopa-induced dyskinesias in Parkinsonian monkeys. *Mov. Disord.* 18, 1436-1441.
- Brotchie, J. M., Lee, J., Venderova, K., 2005. Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* 112, 359-391.
- Calabresi, P., Di Filippo, M., Ghiglieri, V., Picconi, B., 2008. Molecular mechanisms underlying levodopa-induced dyskinesia. *Mov. Disord.* 23 Suppl 3, S570-S579.
- Calon, F., Tahar, A. H., Blanchet, P. J., Morissette, M., Grondin, R., Goulet, M., Doucet, J.-P., Robertson, G. S., Nestler, E., Di Paolo, T., Bédard, P. J., 2000. Dopamine-receptor stimulation: biobehavioral and biochemical consequences. *Trends Neurosci.* 23 (suppl.), S92-S100.
- Cenci, M. A., 2007. Dopamine dysregulation of movement control in L-DOPA-induced dyskinesia. *Trends Neurosci.* 30, 236-243.

- Doucet, J. P., Nakabeppu, Y., Bédard, P. J., Hope, B. T., Nestler, E. J., Jasmin, B. J., Chen, J. S., Iadarola, M. J., St-Jean, M., Wigle, N., Blanchet, P., Grondin, R., Robertson, G. S., 1996. Chronic alterations in dopaminergic neurotransmission produce a persistent elevation of Δ FosB-like protein(s) in both the rodent and primate striatum. *Eur. J. Neurosci.* 8, 365-381.
- Ethier, I., Beaudry, G., St-Hilaire, M., Milbrandt, J., Rouillard, C., Lévesque, D., 2004a. The transcription factor NGFI-B (*Nur77*) and retinoids play a critical role in acute neuroleptic-induced extrapyramidal effect and striatal neuropeptide gene expression. *Neuropsychopharmacology.* 29, 335-346.
- Ethier, I., Kagechika, H., Shudo, K., Rouillard, C., Lévesque, D., 2004b. Docosahexaenoic acid reduces haloperidol-induced dyskinesias in mice: Involvement of *Nur77* and retinoid receptors. *Biol. Psychiatry.* 56, 522-526.
- Forman, B. M., Umesono, K., Chen, J., Evans, R. M., 1995. Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell.* 81, 541-550.
- Gerfen, C. R., 1984. The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature.* 311, 461-464.
- Gerfen, C. R., McGinty, J. F., Young, W. S., 3rd, 1991. Dopamine differentially regulates dynorphin, substance P, and enkephalin expression in striatal neurons: *in situ* hybridization histochemical analysis. *J. Neurosci.* 11, 1016-1031.
- Gerfen, C. R., Young, W. S., 3rd, 1988. Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix compartments: an *in situ* hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study. *Brain Res.* 460, 161-167.
- Graybiel, A. M., Canales, J. J., Capper-Loup, C., 2000. Levodopa-induced dyskinesias and dopamine-dependent stereotypies: a new hypothesis. *Trends Neurosci.* 23 (suppl.), S71-S77.
- Graybiel, A. M., Ragsdale, C. W., Jr., 1978. Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkeys, and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase staining. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 5723-5726.
- Guigoni, C., Li, Q., Aubert, I., Dovero, S., Bioulac, B. H., Bloch, B., Crossman, A. R., Gross, C. E., Bezard, E., 2005. Involvement of sensorimotor, limbic, and associative basal ganglia domains in L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia. *J. Neurosci.* 25, 2102-2107.
- Haber, S. N., Kim, K. S., Maily, P., Calzavara, R., 2006. Reward-related cortical inputs define a large striatal region in primates that interface with associative cortical connections, providing a substrate for incentive-based learning. *J. Neurosci.* 26, 8368-8376.

- Henry, B., Duty, S., Fox, S. H., Crossman, A. R., Brotchie, J. M., 2003. Increased striatal preproenkephalin B expression is associated with dyskinesia in Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 183, 458-468.
- Hurd, Y. L., Herkenham, M., 1995. The human neostriatum shows compartmentalization of neuropeptide gene expression in dorsal and ventral regions: an *in situ* hybridization histochemical analysis. *Neuroscience.* 64, 571-586.
- Karnovsky, M. J., Roots, L., 1964. A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.* 12, 219-221.
- Konradi, C., Westin, J. E., Carta, M., Eaton, M. E., Kuter, K., Dekundy, A., Lundblad, M., Cenci, M. A., 2004. Transcriptome analysis in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia. *Neurobiol. Dis.* 17, 219-236.
- Krause, J. E., Chirgwin, J. M., Carter, M. S., Xu, Z. S., Hershey, A. D., 1987. Three rat preprotachykinin mRNAs encode the neuropeptides substance P and neurokinin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 881-885.
- Langlois, M.-C., Beaudry, G., Zekki, H., Rouillard, C., Lévesque, D., 2001. Impact of antipsychotic drug administration on the expression of nuclear receptors in the neocortex and striatum of the rat brain. *Neuroscience.* 106, 117-128.
- Lévesque, D., Rouillard, C., 2007. *Nur77* and retinoid X receptors: crucial factors in dopamine-related neuroadaptation. *Trends Neurosci.* 30, 22-30.
- Maira, M., Martens, C., Philips, A., Drouin, J., 1999. Heterodimerization between members of the *Nur* subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7549-7557.
- Mata de Urquiza, A., Liu, S., Sjöberg, M., Zetterström, R. H., Griffiths, W., Sjövall, J., Perlmann, T., 2000. Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science.* 290, 2140-2144.
- Morissette, M., Dridi, M., Calon, F., Tahar, A. H., Meltzer, L. T., Bédard, P. J., Di Paolo, T., 2006. Prevention of levodopa-induced dyskinesias by a selective NR1A/2B N-methyl-D-aspartate receptor antagonist in parkinsonian monkeys: Implication of preproenkephalin. *Mov. Disord.* 21, 9-17.
- Munoz, A., Li, Q., Gardoni, F., Marcello, E., Qin, C., Carlsson, T., Kirik, D., Di Luca, M., Bjorklund, A., Bezard, E., Carta, M., 2008. Combined 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor agonists for the treatment of L-DOPA-induced dyskinesia. *Brain.* 131, 3380-3394.
- Pavon, N., Martin, A. B., Mendialdua, A., Moratalla, R., 2006. ERK phosphorylation and FosB expression are associated with L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice. *Biol. Psychiatry.* 59, 64-74.

- Paxinos, G., 2009. The rhesus monkey brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, Boston.
- Samadi, P., Grégoire, L., Rouillard, C., Di Paolo, T., Lévesque, D., 2006. Docosahexaenoic acid reduces Levodopa-induced dyskinesias in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine monkeys. *Annals Neurol.* 59, 282-288.
- Sgambato-Faure, V., Buggia, V., Gilbert, F., Lévesque, D., Benabid, A. L., Berger, F., 2005. Coordinated and spatial upregulation of Arc in striatonigral neurons correlates with L-dopa-induced behavioral sensitization in dyskinetic rats. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64, 936-947.
- St-Hilaire, M., Bourhis, E., Lévesque, D., Rouillard, C., 2006. Impaired behavioural and molecular adaptations to dopamine denervation and repeated L-DOPA treatment in *Nur77* knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* 24, 795-805.
- St-Hilaire, M., Landry, E., Lévesque, D., Rouillard, C., 2005. Denervation and repeated L-DOPA induce complex regulatory changes in neurochemical phenotypes of striatal neurons: Implication of a dopamine D₁-dependent mechanism. *Neurobiol. Dis.* 20, 450-460.
- St-Hilaire, M., Landry, É., Lévesque, D., Rouillard, C., 2003. Denervation and repeated L-DOPA induce a coordinate expression of the transcription factor NGFI-B in striatal projection pathways in hemi-parkinsonian rats. *Neurobiol. Dis.* 14, 98-109.
- van den Munckhof, P., Gilbert, F., Chamberland, M., Lévesque, D., Drouin, J., 2006. Striatal neuroadaptation and rescue of locomotor deficit by L-dopa in *Aphakia* mice, a model of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 96, 160-170.
- Xiao, Q., Castillo, S. O., Nikodem, V. M., 1996. Distribution of messenger RNAs for the orphan nuclear receptors *Nurr1* and *Nur77* (NGFI-B) in adult rat brain using *in situ* hybridization. *Neuroscience.* 75, 221-230.
- Zetterström, R. H., Solomin, L., Mitsiadis, T., Olson, L., Perlmann, T., 1996a. Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, *Nurr1*, and *Nor1*. *Mol. Endocrinol.* 10, 1656-1666.
- Zetterström, R. H., Williams, R., Perlmann, T., Olson, L., 1996b. Cellular expression of the immediate-early transcription factors *Nurr1* and NGFI-B suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system. *Mol. Brain Res.* 41, 111-120.

Table 1. Effect of MPTP lesion and treatments on the dopamine transporter specific binding measured by autoradiography in the caudate nucleus and putamen of monkeys.

		[¹²⁵ I]RTI-121 specific binding (fmol/mg tissue)			
		Dorsomedial	Ventromedial	Ventrolateral	Dorsolateral
Caudate nucleus					
Control		1.081 ± 0.134	1.099 ± 0.208	0.957 ± 0.088	0.984 ± 0.063
MPTP		0.017 ± 0.007**	0.056 ± 0.024**	0.041 ± 0.017**	0.013 ± 0.004**
MPTP+L-Dopa		0.019 ± 0.005**	0.032 ± 0.010**	0.031 ± 0.010**	0.018 ± 0.005**
MPTP+L-Dopa+DHA		0.032 ± 0.010**	0.040 ± 0.010**	0.032 ± 0.010**	0.024 ± 0.010**
Putamen					
Control		0.827 ± 0.057	0.783 ± 0.043	1.025 ± 0.086	1.030 ± 0.076
MPTP		0.093 ± 0.033**	0.102 ± 0.033**	0.060 ± 0.020**	0.060 ± 0.026**
MPTP+L-Dopa		0.067 ± 0.018**	0.106 ± 0.019**	0.070 ± 0.020**	0.040 ± 0.010**
MPTP+L-Dopa+DHA		0.097 ± 0.009**	0.119 ± 0.018**	0.066 ± 0.010**	0.050 ± 0.010**

Data represent means ± SEM. ** p<0.01 vs respective control group.

Table 2. Basal *Nur77* mRNA levels in monkey caudate nucleus and putamen in control animals.

		<i>Nur77</i> mRNA levels (nCi/g tissue)	
		Anterior level	Posterior level
Caudate nucleus			
	CM	101 ± 25	78 ± 8
	CL	167 ± 54	113 ± 22
Putamen			
	PDM	114 ± 31	80 ± 20
	PDL	140 ± 64	96 ± 22
	PVM	56 ± 16	54 ± 22
	PVL	90 ± 22	62 ± 23

Data represent means ± SEM. Abbreviations: lateral (CL) and medial (CM) portions of the caudate nucleus as well as in dorsolateral (PDL), dorsomedial (PDM), ventrolateral (PVL) and ventromedial (PVM) portions of the putamen. These values were used to establish 100 % control values of *Nur77* mRNA levels presented in Figure 2.

Figure legends

Figure 1. Representative autoradiograms showing the *in situ* hybridization signals obtained with the monkey radiolabeled *Nur77* mRNA probe. **A)** Representative examples of monkey brain coronal sections taken at anterior and **B)** posterior levels of the caudate-putamen in control, MPTP, MPTP + L-Dopa and MPTP + L-Dopa + DHA-treated groups. The left panels illustrate schematic representations of caudate nucleus and putamen subdivision areas used for quantification. Abbreviations are: Acc, nucleus accumbens, lateral (CL) and medial (CM) portions of the caudate nucleus, dorsolateral (PDL), dorsomedial (PDM), ventrolateral (PVL) and ventromedial (PVM) portions of the putamen, GPe, external globus pallidus and GPi, internal globus pallidus.

Figure 2. Modulation of *Nur77* mRNA levels in L-Dopa-treated MPTP monkeys in the caudate-putamen. *Nur77* mRNA levels were measured in control, MPTP, MPTP + L-Dopa and MPTP + L-Dopa + DHA treated monkeys in the anterior (**A**) and posterior (**B**) caudate nucleus and putamen. *Nur77* mRNA levels were evaluated in lateral (CL) and medial (CM) portions of the caudate nucleus as well as in dorsolateral (PDL), dorsomedial (PDM), ventrolateral (PVL) and ventromedial (PVM) portions of the putamen. Values are expressed in percent (%) of control values. Absolute values in nCi/g tissue of controls are presented in Table 2. Histogram bars represent means \pm SEM (N=4-5 per group) (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs Control, # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ vs MPTP and & $p < 0.05$ and && $p < 0.01$ vs MPTP + L-Dopa).

Figure 3. Modulation of *Nur77* mRNA levels in L-Dopa-treated MPTP monkeys in substance P (SP) containing cells of the putamen. **A)** Representative images of the

radiolabeled *Nur77* mRNA probe (silver grains) and SP transcript labeled with digoxigenin (dark brown staining) in a MPTP and MPTP + L-Dopa-treated animals. Arrowheads indicate single *Nur77*-positive cells, thin arrows indicate single SP-positive cells and bold arrows indicate double SP/*Nur77*-positive cells. **B)** *Nur77*-positive cell counts in controls (CONT), MPTP, MPTP + L-Dopa and MPTP + L-Dopa + DHA-treated animals. **C)** SP/*Nur77*-double labeled cell counts in controls, MPTP, MPTP + L-Dopa and MPTP + L-Dopa + DHA-treated animals. Histogram bars represent mean cell numbers per surface unit (μm^2) \pm SEM (N=4-5 per group) (** $p < 0.01$ vs CONT and ## $p < 0.01$ vs MPTP group). All cell counts were performed in the anterior putamen.

Figure 4. Modulation of *Nur77* mRNA levels in striosome and matrix compartments of the anterior (A) and posterior (B) caudate nucleus and putamen in L-Dopa-treated MPTP monkeys. Histogram bars represent means \pm SEM in controls, MPTP, MPTP + L-Dopa and MPTP + Dopa + DHA-treated animals (N=4-5 per group, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs control, # $p < 0.05$ vs MPTP, & $p < 0.05$ vs MPTP + L-Dopa). For each animal, 3 to 5 striosome and matrix areas were used to average *Nur77* mRNA levels in these respective compartments.

Figure 5. Correlation between *Nur77* mRNA levels and L-Dopa-induced dyskinesia (LID) scores. We have plotted individual LID scores from MPTP monkeys treated with L-Dopa and L-Dopa + DHA animals with individual *Nur77* mRNA levels found in the anterior ventromedial (PVM) and ventrolateral (PVL) portions of the putamen. Linear regression analysis was performed with 95% confidence intervals. Goodness of fit is illustrated with the calculated r^2 , and the p value statistical analysis indicates whether the slope is significantly different from zero. P values < 0.05 were considered as significant.

Figure 6. Representative autoradiograms of RXR γ 1 mRNA levels in L-Dopa-treated MPTP monkeys in the posterior caudate-putamen (**A**). RXR γ 1 mRNA levels were measured in control, MPTP, MPTP + L-Dopa and MPTP + L-Dopa + DHA treated monkeys. **B**) Quantification of RXR γ 1 mRNA levels in lateral (CL) portion of the caudate nucleus and **C**) dorsolateral (PDL) portion of the putamen. Histogram bars represent means \pm SEM (N=4-5 per group).

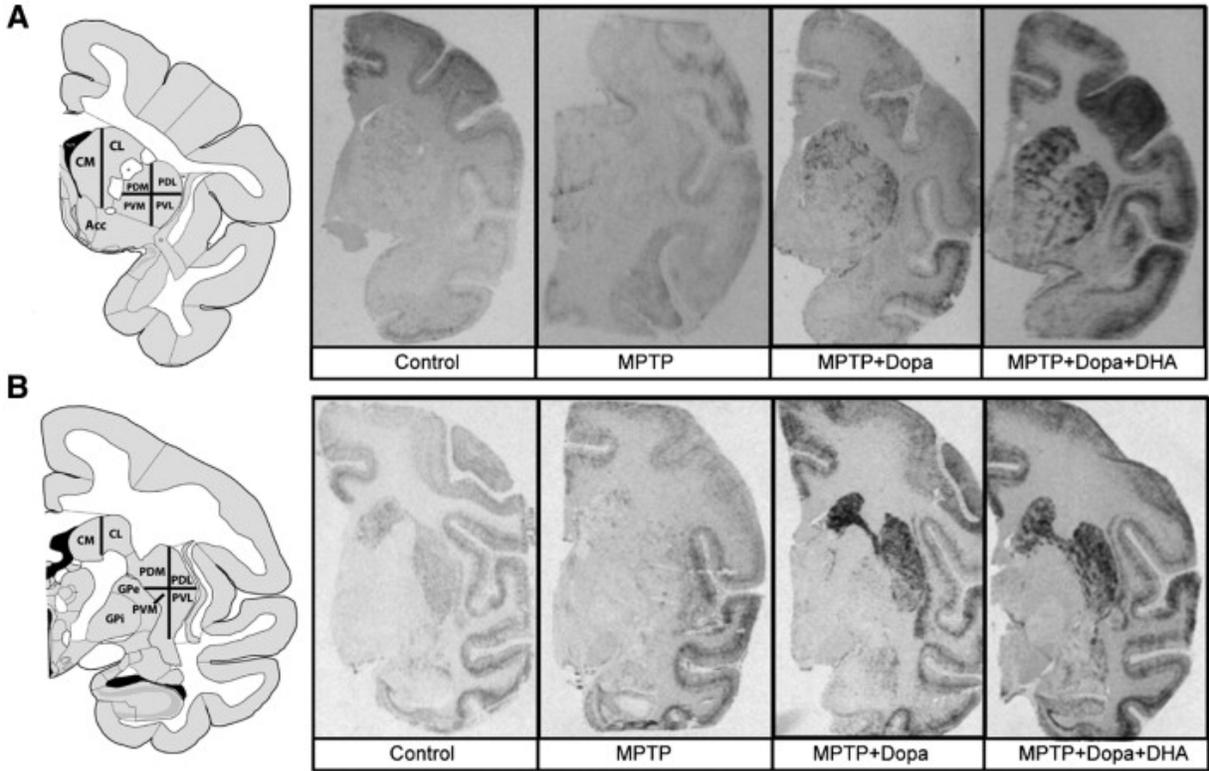


Figure 1

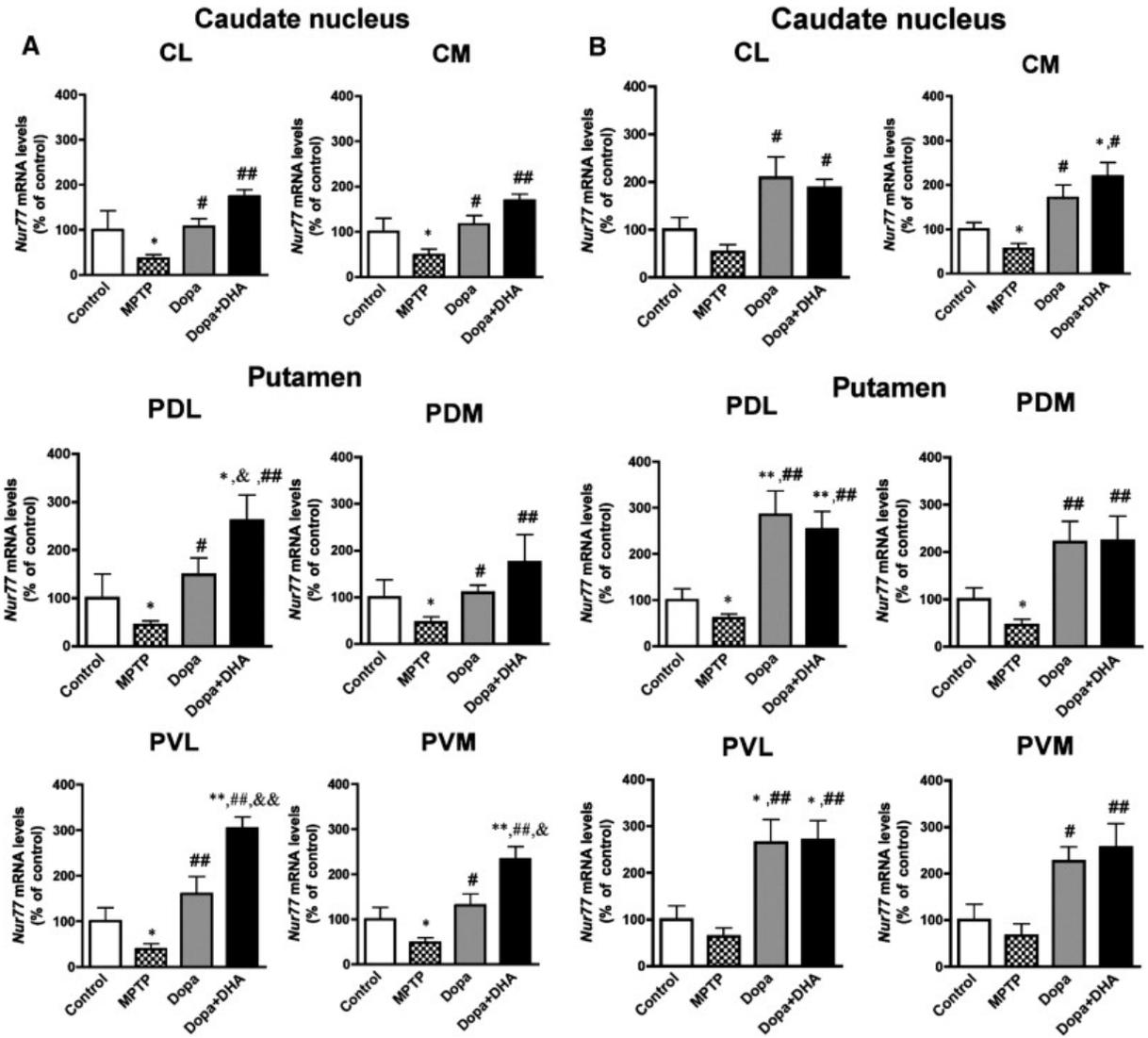


Figure 2

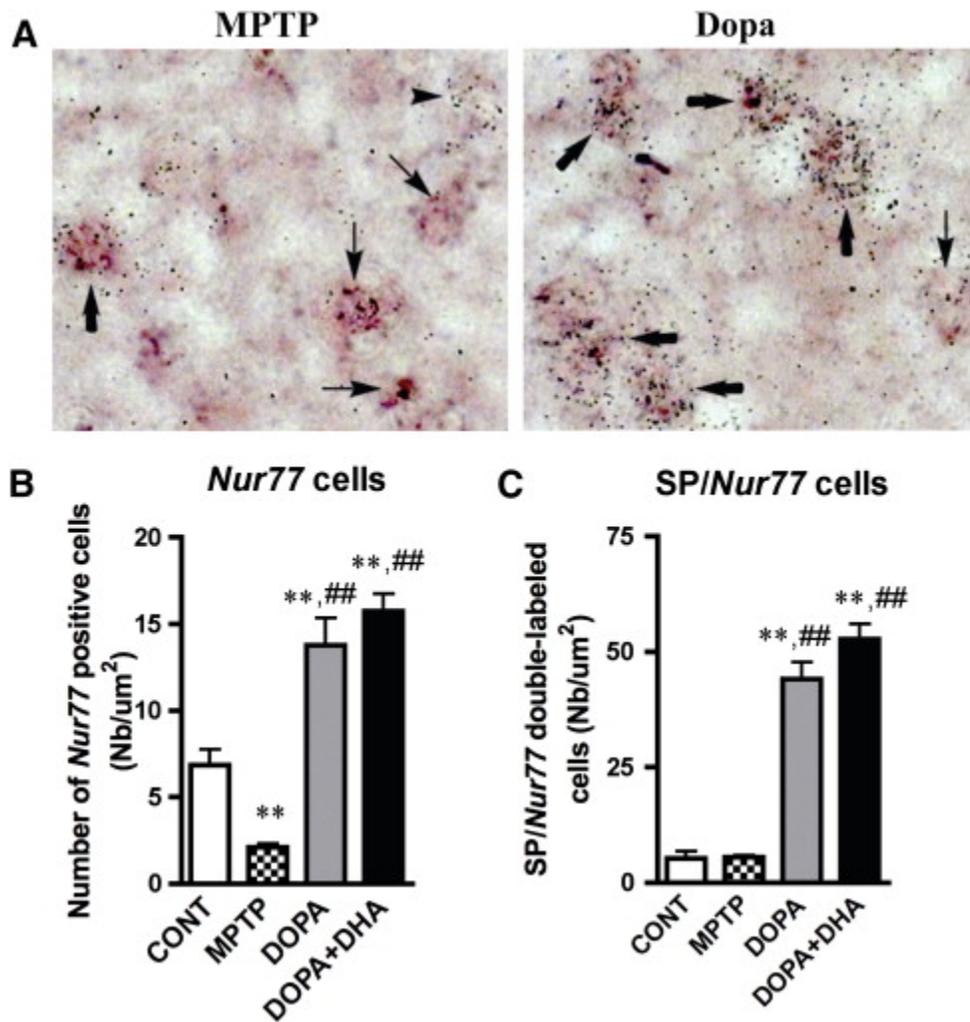


Figure 3

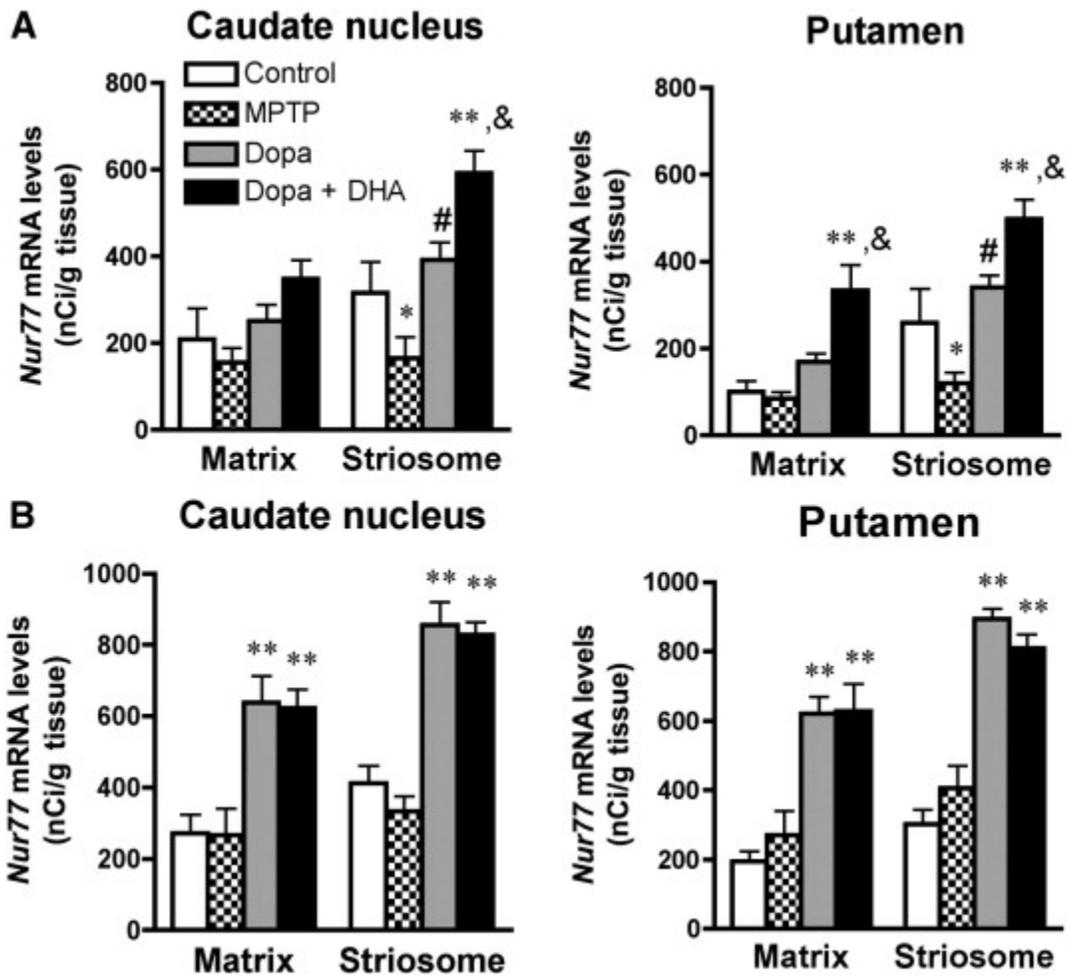


Figure 4

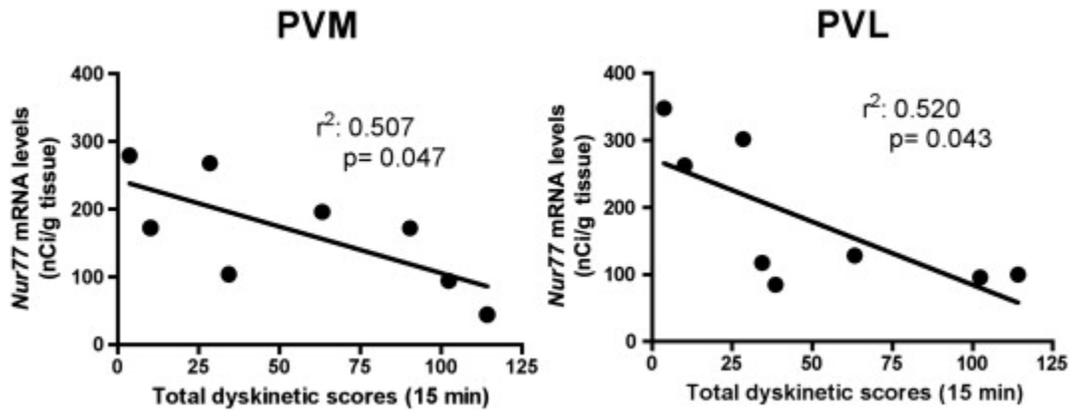


Figure 5

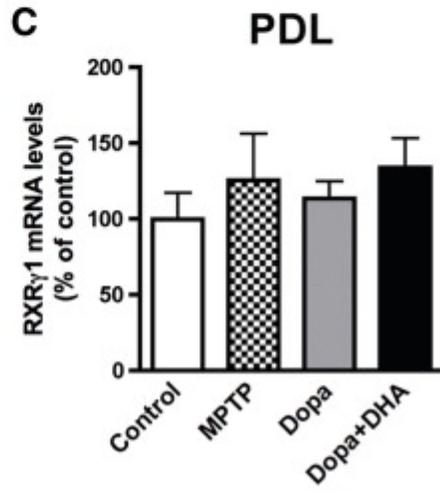
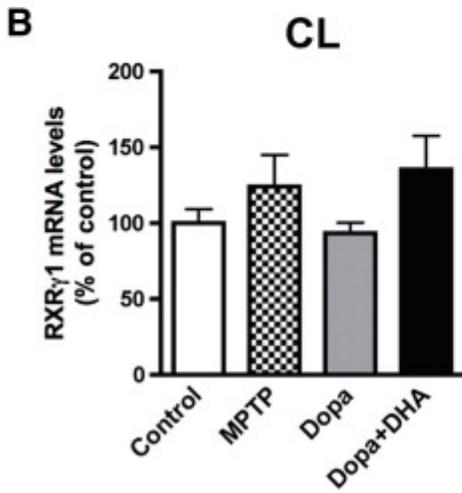
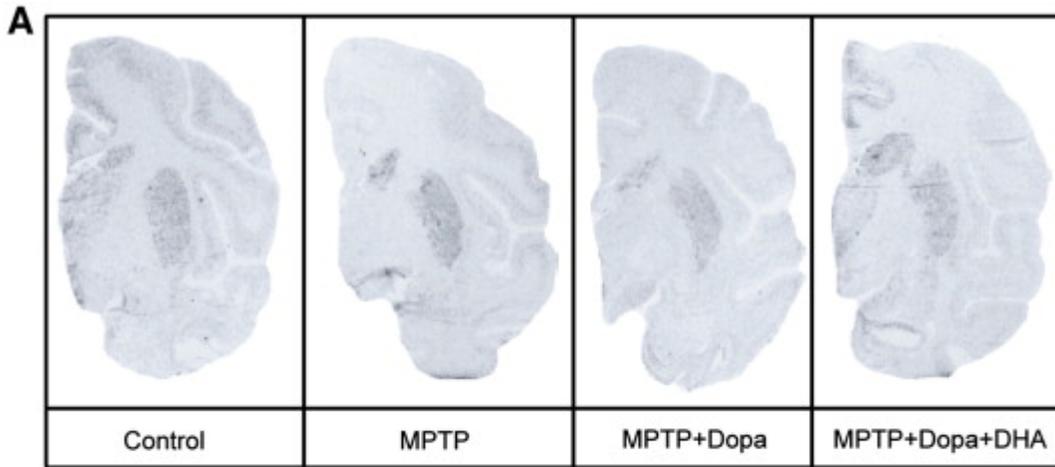


Figure 6

Chapitre XII: Autres études non publiées

Ces études ont été réalisées sur la cohorte de cerveaux de singes ayant reçu les deux types de molécules AP ; soit l'HAL et la CLZ.

1. Autoradiographie des récepteurs mGluR5

Pour évaluer la densité des récepteurs mGluR5 dans les cerveaux des singes étudiés, nous avons utilisé le ligand tritié [3H]ABP688 (81.6 Ci/ mmol, Novartis, Basel, Suisse), suivant les conditions fixées par le producteur . Après un bref lavage avec le tampon de pré-incubation (mélange de HEPES, NaCl, KCl, CaCl₂, MgSO₄ et BSA), le ligand radio-marqué a été ajouté au milieu à raison de 5nM. Les sections ont été incubées à température ambiante pendant une heure. Parallèlement, le ligand froid 2-méthyl-6-(phenylethynyl) pyridine (MPEP) a été utilisé dans les mêmes conditions sur une autre série de lames. La concentration utilisée pour le marquage non spécifique avec le MPEP est de 10 mM. Les deux séries de lames ont été par la suite lavées à froid puis séchées. Les lames ont été apposées à des films sensibles à l'émission radioactive (Films Kodak, Amersham, UK) pendant 6 semaines.

2. Étude de l'expression des protéines kinases ERK par Western Blot²

Afin d'évaluer l'expression de la protéine ERK et sa forme active pERK, nous avons fait appel à la technique de western blot. La méthode utilisée pour l'échantillonnage est décrite dans la figure 7. Nous avons commencé par extraire les protéines continues dans les tissus du Put et du NAc issus des différents animaux. La quantité de protéines dans les

² Cette partie du projet a été réalisée dans le laboratoire du Pr. Michel Cyr à Trois-Rivières avec la collaboration de l'étudiante Laure Chagniel.

échantillons a été normalisée grâce à une courbe standard faite avec de la BSA (albumine de sérum bovin). Les protéines ont été par la suite dénaturées (5 min à 60°C). La séparation des protéines a été réalisée suite à une migration de 30 min à 90v, puis 60 min à 180v. La migration a eu lieu sur un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) à 10%. Les protéines ont été par la suite transférées sur une membrane de nitrocellulose durant 1h:30 à 0.4 A. Après vérification du transfert au rouge ponceau, les membranes ont été incubées avec l'anticorps primaire anti-ERK1/2 ou anti-pERK1/2 pour une durée de 12 h à 4°C. Il faut noter que nous avons saturé au préalable les sites non spécifiques avec une solution de BSA à 5% dans le tampon phosphate PBS. Les anticorps secondaires ont été ajoutés le lendemain pendant une heure.

3. Étude de l'effet du polymorphisme 3'UTR sur la stabilité de l'ARNm de Nur77

Dans un autre volet du projet, je me suis intéressée aux conséquences que peut avoir le polymorphisme au niveau de la région 3'UTR de l'ARNm de Nur77 sur la stabilité de l'ARNm et ultérieurement sur l'expression de la protéine. Comme indiqué antérieurement, il a été démontré l'existence d'un SNP (Single Nucleotide Polymorphism) associé de façon spécifique au développement de dyskinésies tardives dans une cohorte de patients schizophrènes. Cependant, on ne sait pas par quel mécanisme une telle association peut être établie. Pour ce, un modèle cellulaire a été utilisé afin de reproduire les conditions sauvages et mutées et étudier les effets inhérents. Dans un premier temps, j'ai procédé à une mutagenèse dirigée afin de reproduire le polymorphisme retrouvé chez les sujets ayant développé les dyskinésies (créer la mutation retrouvée chez cette population). Après l'obtention du plasmide portant la mutation désirée, une Midi-Préparation a été réalisée afin d'avoir une quantité plus importante de cet ADN. Par la suite, des essais rapporteurs avec la luciférase ont été réalisés afin d'étudier l'impact de la mutation sur la transcription du gène Nur77. Par ailleurs, la région non traduite 3'UTR du génome humain est le site de prédilection de la liaison des micro-ARN (mi-ARN). Les mi-ARN étant des séquences de 21-40 nucléotides qui jouent un rôle important dans les régulations post-transcriptionnelles et qui sont de

plus en plus associés à des pathologies chez l'homme. Pour ce nous avons procédé à une analyse de la séquence 3'UTR de Nur77 afin de détecter les mi-ARN potentiels qui peuvent s'hybrider à cette région. Les détails et les résultats obtenus de ces analyses sont énoncés dans les paragraphes suivants.

3.1 Mutagenèse dirigée

Pour réaliser cette étape j'ai fait appel à un kit: QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Agilent genomics). Le protocole a été réalisé en respectant les instructions accompagnant le Kit. En partant du plasmide ancestral (plasmide sauvage) j'ai réalisé une réaction PCR en présence d'une polymérase de haute-fidélité PfuUltra HF DNA polymérase. Le plasmide pWhitescript (qui vient avec le kit) a été utilisé comme contrôle positif. Les amorces utilisées dans la réaction, ont été préalablement préparées en utilisant le logiciel de Qiagen (Qiagen, E.U).

3.2 Mini et Midi-préparation

L'ADN plasmidique ainsi obtenu a été digéré par la Dpn-I puis transformé dans des bactéries super-compétentes (XL-Blue). Les colonies obtenues ont subi plusieurs étapes de centrifugation afin de purifier l'ADN plasmidique. Une mini-préparation a été suivie par une midi-préparation afin d'avoir des quantités plus importantes de cet ADN. Les deux étapes ont été perfectionnées en moyennant les kits de Mini et Midi préparation de Qiagen (Qiagen Plasmid Mini et Midi-Kit, Qiagen, E.U).

3.3 Transfection cellulaire

Pour évaluer l'impact de ce polymorphisme nous avons fait appel à un gène rapporteur Firefly Luciferase. Sur la figure sont présentées les constructions plasmidiques que nous avons utilisées pour l'étape de la transfection cellulaire. Nous avons utilisé des cellules immortalisées HEK 293 que nous avons maintenues à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂ et dans un milieu de culture approprié. Après un premier passage de 24h, nous avons co-transfecté nos cellules avec le plasmide contenant la

séquence 3'UTR sauvage (condition 1), ou avec le plasmide contenant la séquence 3'UTR modifiée obtenue par mutagenèse dirigée (condition 2). Comme contrôle interne, nous avons utilisé un plasmide vide contenant seulement le gène rapporteur de la firefly. Après vingt-quatre heures, nous avons évalué l'activité firefly luciférase en utilisant le système Dual Luciferase Reporter Assay Aystem de Promega.

4. Résultats obtenus des études non publiées:

4.1. Autoradiographie des récepteurs mGluR5:

L'expression des récepteurs mGluR5 est sensiblement pareille dans les différents groupes (contrôle, HAL et CLZ). Aucun effet significatif n'a été détecté avec l'un ou l'autre des deux AP testés. Néanmoins, une tendance à la hausse peut être notée chez le groupe ayant reçu la CLZ (figure 6).

4.2. Western Blot des kinases ERK1/2 et p-ERK

L'analyse quantitative des bandes de western Blot démontre une augmentation de l'expression de la forme phosphorylée des kinases ERK1/2, à savoir p-ERK1/2 et ceci suite aux deux traitements. L'augmentation rencontrée dans le groupe traité par HAL est supérieure à celle observée pour le groupe traité par la CLZ. D'autre part, une augmentation de l'expression de la forme phosphorylée a été démontrée avec l'HAL démontrant que ce traitement est capable d'activer ERK1/2 (figure 8). Aucune corrélation spécifique n'a été trouvée entre le taux d'expression des ERK1/2 et l'intensité des DT.

4.3. Étude de l'impact du SNP localisé dans la région 3'-UTR Nur77

La première série d'études avec le gène rapporteur luciférase réalisée en présence des plasmides portant les régions 3'UTR parentale et mutée révèle que la transcription de Nur77 est profondément affectée par la présence du SNP (figure 9). L'effet est d'autant plus marqué quand les concentrations sont plus élevées (la différence s'élargit

en augmentant les concentrations respectives des deux plasmides). En présence de l'oligo inhibiteur du mi-RNA 221 (l'antigomir), le signal lumineux issu des plasmides parental et muté est augmenté. Cependant, l'augmentation est plus importante dans les cellules exprimant le plasmide muté (la différence entre les cellules exprimant le SNP et l'antigomir est de 53% par rapport aux cellules exprimant seulement le plasmide portant la mutation) (voir figure 9).

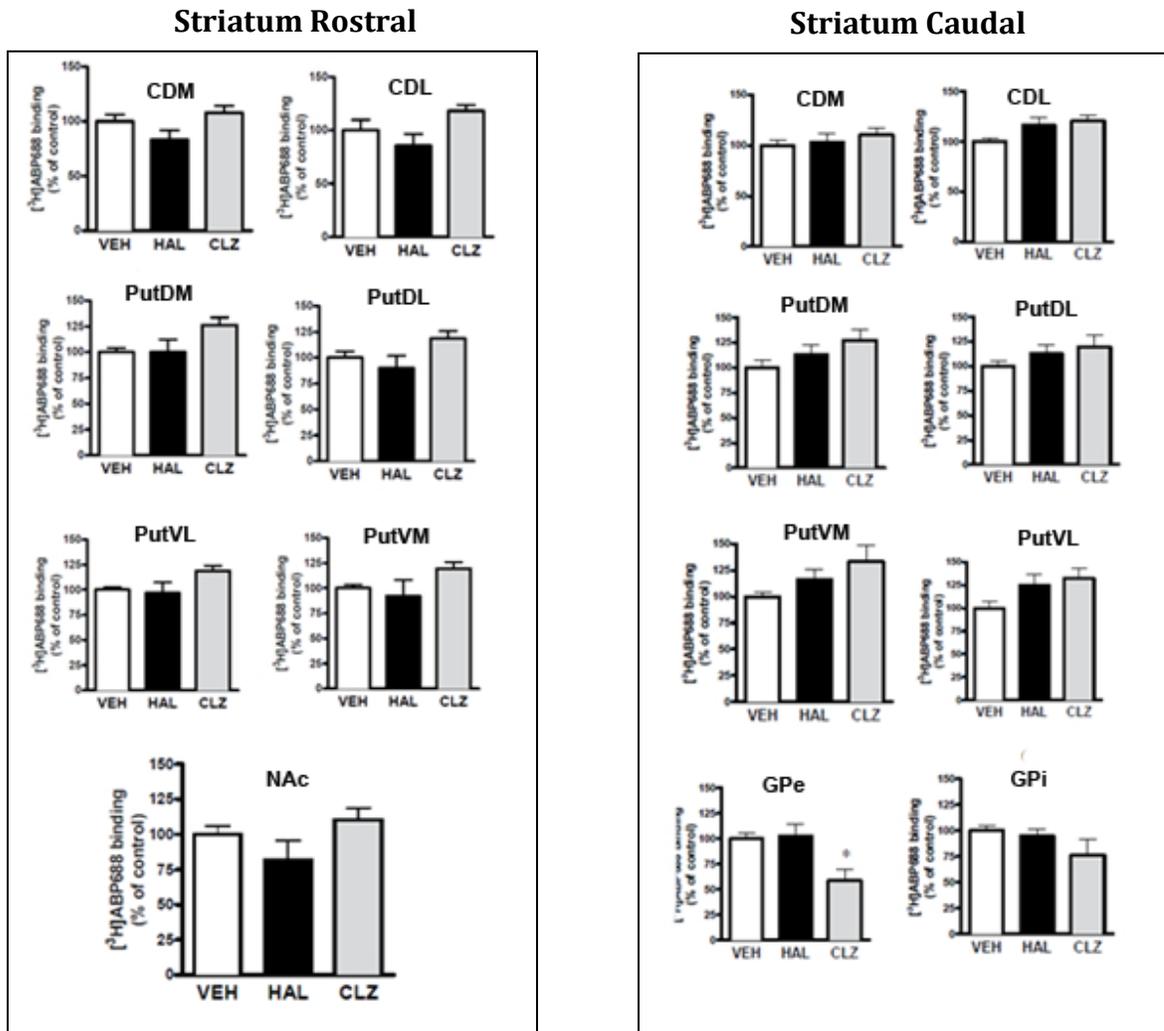
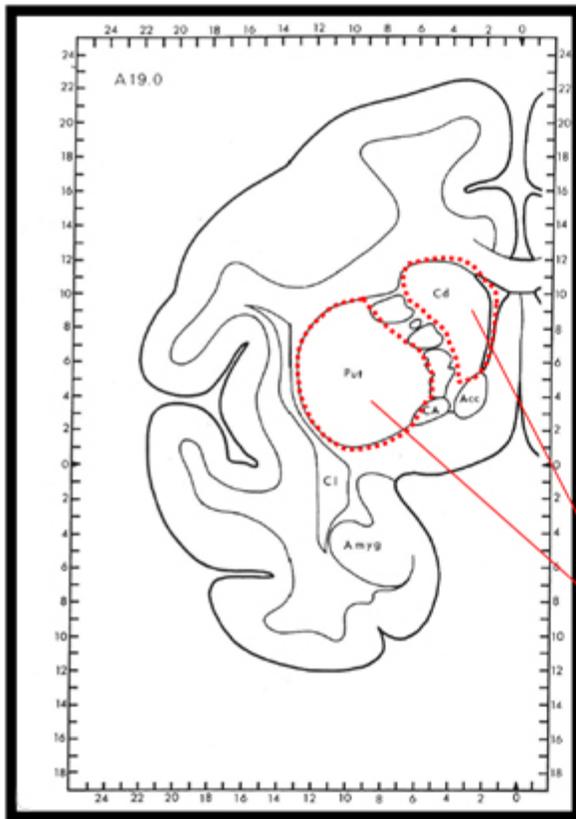


Figure 6: Autoradiographie mGluR5 utilisant le ligand [3H] ABP688

Les valeurs sont exprimées en pourcentage d'expression par rapport au groupe contrôle et représentent la moyenne \pm S.E.M de 5-9 animaux. *: $p < 0.05$ Versus groupe contrôle.

CTRL: groupe contrôle, HAL: groupe halopéridol, CLZ: groupe clozapine. CM: caudé médian, CL: caudé latéral. PutDM: putamen dorsomédian. PutDL: putamen dorsolatéral. PutVM: putamen ventromédian. PutVL: putamen ventrolatéral



PRÉPARATION DES TISSUS DE CERVEAUX DE SINGES POUR WESTERN BLOT

- ❖ Directement sur le cerveau monté sur le support du cryostat, on découpe à l'aide d'une fine pointe métallique froide (ex. aiguille) le noyau caudé et le putamen (pointillé en rouge)
- ❖ Faire ensuite une coupe d'au moins 20 μ m à l'aide du cryostat.
- ❖ À l'aide d'une fine pointe métallique préalablement refroidie sur la glace sèche, prélever les structures découpées directement sur la coupe et transférer très rapidement dans des tubes eppendorf de 1.5 ml également refroidis sur la glace sèche.
- ❖ Faire un minimum de 3 coupes de 20 μ m pour avoir une quantité de protéines acceptables.

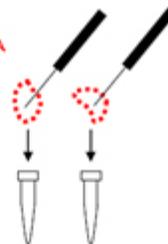
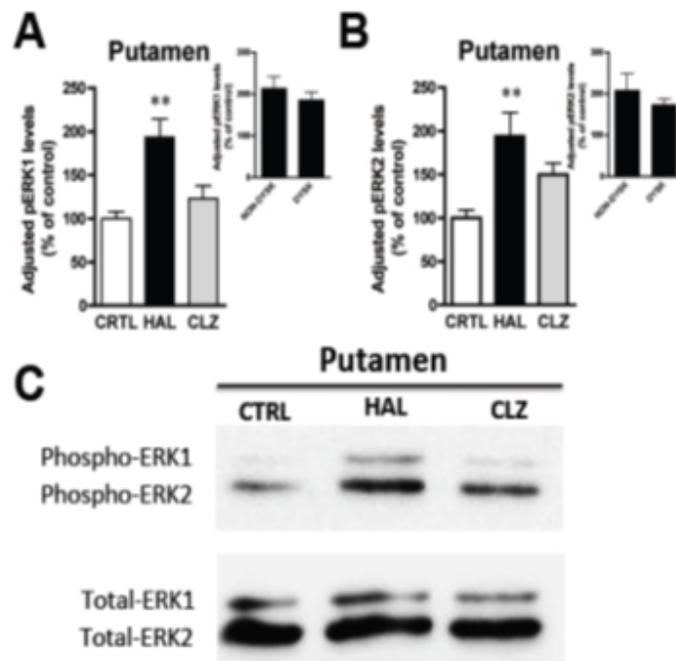


Figure 7: Échantillonnage de cerveaux pour la technique de western blot

Figure préparée par Marc Morissette, Université de Laval, Qc



Modulation de l'expression des phospho-ERK1/2 par les antipsychotiques dans le Putamen

A) Niveaux de phospho-ERK1 normalisée et B) de phospho-ERK2 normalisée chez les animaux CTRL(N=5), HAL(N=9), CLZ(N=6). Les niveaux d'expression d'ERK 1 et 2 sont évaluées après normalisation avec l'Expression de ERK 1 et 2 total

Les panneaux gauches des histogrammes A et B comparent l'expression de p-ERK 1 et 2 chez les animaux dyskinétiques(N=4) et les non dyskinétiques(N=5)

C) Exemples représentatifs des western Blots des phospho-ERK1 et 2 ainsi que de ERK total
Obtenus sur les homogénats de putamen pour les animaux CTRL, HAL et CLZ.

Figure 8: Modulation de l'expression de phospho-ERK 1/2 par les antipsychotiques dans le putamen

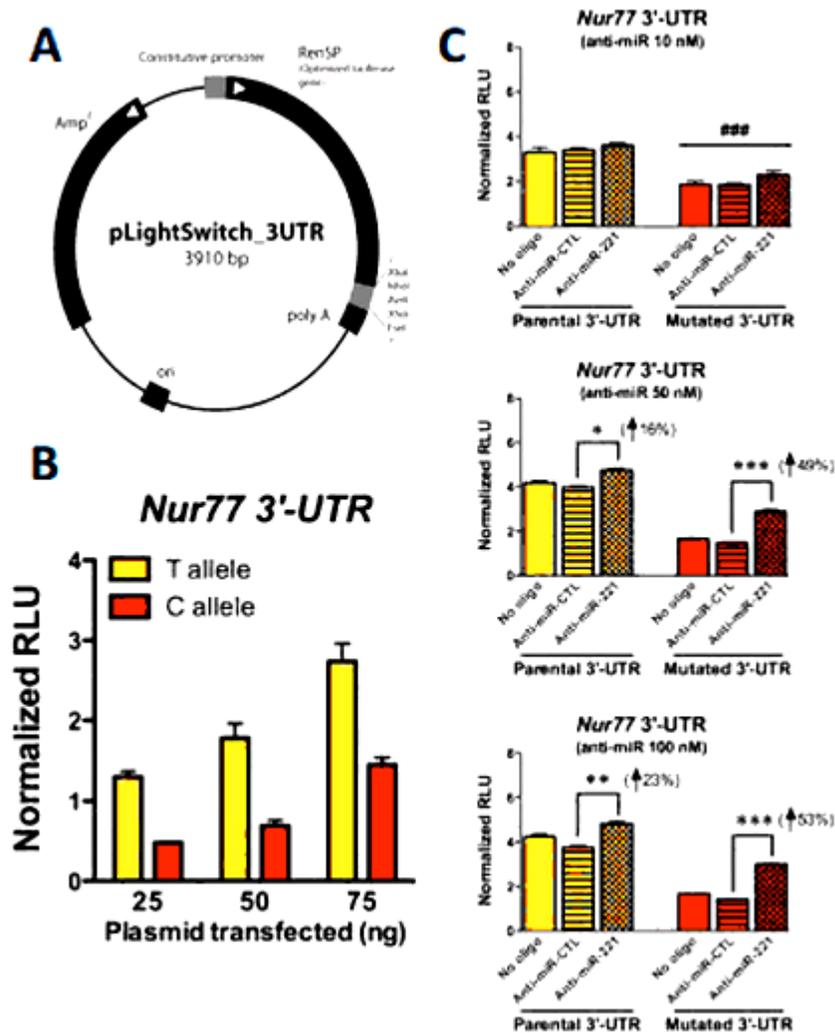


Figure 9: Etude de l'impact fonctionnel du SNP exprimé sur la région 3'UTR de Nur77

A) Construction plasmidique utilisée pour l'étude de l'effet du SNP sur l'expression de Nur77: Le vecteur pLightSwitch_3UTR comporte la séquence 3'UTR du gène Nur77 humain (pLS-RenSPNur77-3UTR), un promoteur à activité constitutive, et le gène rapporteur de la luciférase RenillaSP. La séquence 3'-UTR parentale (sauvage) a été introduite au niveau du site du clonage multiple (XbaI-XhoI). Cette séquence comporte l'allèle parental T. Pour obtenir l'allèle muté(C) et ainsi reproduire le SNP d'intérêt, nous avons effectué une mutagenèse dirigée en utilisant les amorces:

5'-gacagactgaatctcagttccagctacatgtctatTTTTTattcaa-3' et

5'-ttgaataaaaaatagacatgtagctggaactgagattcagctctgtc-3'

B) Essais rapporteurs avec les cellules immortalisées HEK293: Les cellules confluentes HEK293 ont été transfectées avec le plasmide parental pLS-RenSP-hNur77-3UTR ou avec le plasmide muté en utilisant différentes concentrations (25, 50 or 75 ng). L'intensité du signal émis a été détectée par le système Dual luciférase reporter assay system. Les valeurs indiquées sur les différents histogrammes représentent les valeurs moyennes des ratios des deux signaux lumineux (RenSP/RFLuc relative light units (RLU)) \pm SEM (Chaque test a été fait en 6 exemplaires). L'expression du gène rapporteur est réduite en présence du plasmide muté portant l'allèle C.

C) Essais rapporteurs en présence de l'inhibiteur du mi-RNA221³: Une transfection du plasmide muté (C-allele) Nur77-3'-UTR (50 ng) a été effectuée cette fois en présence de l'atigomir miR-221, en utilisant différentes concentrations (10, 50 or 100 nM). Un contrôle négatif anti-miR a été ajouté avec les mêmes concentrations. L'activité de la luciférase est nettement réduite en présence de l'allèle muté (### p<0.001). La co-transfection de l'antagomiR-221 induit l'activité de la luciférase de 49 % (pour la concentration de 50 nM) et 53% (100 nM). Dans les cellules où la co-transfection s'est produite avec le plasmide parental, l'augmentation de l'activité de la luciférase n'est que de 16 % (50 nM) et 23% (100 nM).

³ La partie C de cette expérience a été réalisée par Xavier Giner, membre du laboratoire du Dr. Daniel Lévesque

Chapitre XIII: Discussion générale et perspectives

Au cours de cette étude nous nous sommes employés à décortiquer les changements pharmacologiques et biochimiques qui prennent place suite à un traitement chronique avec des médicaments AP. Cette étude a profité d'une grande banque de cerveaux de singe sous antipsychotique (n=23) et d'une durée de traitement parmi les plus longues dans l'histoire des dyskinésies tardives (6-36 mois). À ma connaissance, notre banque de cerveaux de singe est la plus large dans la littérature sur la DT expérimentale chez le primate non humain. Nous nous sommes intéressée à identifier des paramètres faisant partie du profil dopaminergique des DT. Certains des paramètres étudiés, ont été déjà explorés dans la littérature (expression des récepteurs D2...), mais des résultats contradictoires en ressortent. Pour les autres paramètres, les études qui leur ont été consacrés ont été soit faites seulement chez les rongeurs (Nur77) soit complètement absentes de la littérature.

Résumons les principaux résultats de cette étude. Tout d'abord, l'expression (la densité) des R-D2 ne change pas en fonction du traitement antipsychotique administré. Aussi bien chez les singes traités par un antipsychotique typique (HAL) que chez les singes traités par un atypique (CLZ), l'expression des R-D2 reste comparable aux animaux contrôles. Les R-D1 montrent, quant à eux, une diminution de l'expression consécutive aux deux traitements. La baisse de la densité des R-D1 apparaît plus accentuée dans certaines régions (putamen médian). Les effets observés sur les R-D3 sont plutôt spectaculaires. En effet, le traitement antipsychotique typique (HAL cause une augmentation très importante de l'expression des R-D3. Cette augmentation se produit dans la voie striatale directe exprimant le neuropeptide: substance P (et exprimant également les R-D1). En prime, l'expression des R-D3 corrèle positivement avec la sévérité de la DT. Cette corrélation est particulièrement significative au niveau du putamen latéral antérieur. Les résultats de la double hybridation *in situ* concluent également à une induction des transcrits des R-D3 par l'HAL. D'autre part, j'ai étudié les

changements de l'expression de deux neuropeptides: la préproenképhaline (ENK) et la substance P. Ces deux marqueurs ne font pas partie de la transmission dopaminergique de façon directe; ils agissent cependant en étroite collaboration avec cette transmission dans les GB. La présente étude a démontré une induction des ARNm de l'ENK. Cette induction est commune aux deux types d'antipsychotique. L'expression de la substance P reste stable après un traitement avec l' HAL (nous n'avons pas exploré l'expression chez le groupe traité par la CLZ). Nur77 s'avère aussi un modulateur important dans le système dopaminergique [301]. Pour ce, nous avons voulu identifier les changements portant sur l'expression de ce récepteur nucléaire. Les résultats obtenus par hybridation *in situ* démontrent une forte induction de l'ARNm Nur77 suite au traitement par l' HAL. La CLZ par contre n'a aucun effet sur l'expression de l'ARNm Nur77.

1. Les dyskinésies tardives: profil dopaminergique revisité

Depuis qu'on a démontré que l'antagonisme des R-D2 est indispensable pour accomplir un effet antipsychotique, la voie striatopallidale (ou voie indirecte) exprimant ces récepteurs est devenue la ligne de mire pour les recherches sur les AP. Spécifiquement, l'hypersensibilité des R-D2, surtout évidente chez les rongeurs, est devenu la pierre angulaire des hypothèses avancées pour expliquer l'apparition des DT [280, 339, 340]. Cette hypersensibilité se traduit principalement par l'augmentation du nombre des R-D2. Dans la présente étude, nous démontrons clairement l'absence d'une telle augmentation du nombre des R-D2 chez les primates non humains traités par les AP. Notre étude rejoint, ainsi, les études post mortem qui démontrent l'absence de relation directe entre la DT et la sensibilisation des R-D2 [341, 342]. De surcroit, dans notre étude aucun changement n'est noté entre les deux types d' AP par rapport à l'expression des R-D2. L'absence d'hypersensibilisation (augmentation du nombre des R-D2) ne peut pas être due au temps écoulé entre le sacrifice des animaux et l'administration de la dernière dose de médicaments (3h). En effet, il a été démontré aussi bien chez l'humain que chez les rongeurs que le taux maximal d'occupation des R-D2 est atteint à partir de 3h après une dose d'HAL et que cette occupation reste aussi élevée jusqu'à une semaine après l'arrêt du traitement [343, 344] pour l' HAL et jusqu'à

24h pour la CLZ [345]. De même ce résultat ne peut pas être dû à la présence résiduelle de l'HAL dans les tissus. Car dans ce cas de figure, l'HAL entrerait en compétition avec le ligand radio-marqué et le déplacement résultant se traduirait par une baisse du binding (du signal radioactif) chez les animaux traités par rapport aux animaux contrôles.

On peut, toutefois, envisager la possibilité que le phénomène de sensibilisation s'est manifesté au cours des premiers jours suivant l'administration des AP et que après une certaine durée de traitement, l'effet s'est estompé laissant place à une adaptation (qui s'est traduit par une expression similaire par les deux types d'AP). Néanmoins, les résultats obtenus de protocoles de traitement en aigu avec les AP démontrent des résultats contradictoires par rapport à cette hypothèse. Signalons, une étude ancienne (1989) réalisée chez les rongeurs et qui démontre une baisse de l'expression des R-D2 consécutive au traitement aigu avec HAL et CLZ [346], Les études qui se sont intéressées à la quantification des ARNm se font rares et contradictoires. En effet, certaines études optent plus pour l'absence d'effet du traitement en aigu sur les transcrits des R-D2 [347]; alors que d'autres concluent à une baisse de ces transcrits [348]. Aucune étude n'a évalué la conséquence d'un traitement aigu sur les transcrits des R-D2 chez les primates (à ma connaissance). La littérature existante ne permet pas donc de statuer sur l'hypersensibilisation immédiate des R-D2. Cette hypothèse peut cependant rester valide puisque l'augmentation de la densité d'un récepteur particulier est une réponse pharmacologique normale pour contrer un blocage.

D'autre part, malgré que nous n'ayons pas une augmentation de la densité des R-D2 (et probablement d'une sensibilisation pharmacologique) nous ne pouvons pas exclure une sensibilisation de la signalisation des R-D2. Nous parlons d'une sensibilisation fonctionnelle dans laquelle les cascades signalétiques habituellement associées à l'activation des R-D2 soient « sur-stimulées » en réponse au blocage chronique. On pourrait par exemple s'attendre à une modulation à la hausse de la protéine $G_{\alpha i}$ ou de l'AC. Cependant, un tel résultat ne peut être obtenu à partir de l'autoradiographie avec un antagoniste des R-D2. Par ailleurs nous revenons plus loin sur le phénomène de sensibilisation fonctionnelle.

Donc ce qu'on peut certifier à partir de nos résultats est que l'effet des AP sur les R-D2 ne peut pas expliquer l'apparition des DT à lui seul. Il serait plutôt réservé à l'activité antipsychotique des différentes molécules (indicateur de cette activité).

Les AP, typiques ou atypiques soient-ils, agissent tous sur les R-D2. Si la différence (par rapport à l'apparition des DT) entre ces deux classes ne se traduit pas par un effet différentiel sur l'expression des R-D2 est ce qu'elle peut résider ailleurs? Nous savons que le blocage des R-D2 serait l'équivalent, en terme de signalisation, à l'activation des R-D1 (voire chapitre2). Donc dans ce contexte artificiel d'hyperactivité des R-D1, est ce qu'on peut assister à une baisse compensatoire des R-D1?

Ce que la présente étude révèle ne contredit pas ce raisonnement et les AP que nous avons testés réduisent l'expression des récepteurs D1. Mais qu'est-ce que la littérature avance?

Si nous retraçons l'historique de la relation liant les R-D1 aux DT nous découvrons une relation bi-axiale. Le premier axe plaide pour une implication des R-D1 dans la physiopathologie des DT. Cet axe a été construit autour des études qui démontrent que l'expression des R-D1 est affectée par l'administration des médicaments AP. Plusieurs études s'accordent sur la diminution de l'expression des R-D1 inhérente au traitement par l'HAL [288, 349, 350]. De plus, une série d'études a démontré que les agonistes des R-D1 (SKF 81297...) exacerbent les VCM et peuvent même causer leur apparition chez les animaux qui n'ont pas été exposés aux médicaments AP [351-354]. Et finalement pour renforcer l'idée de l'implication des R-D1 dans le mécanisme qui soutient les DT, il a été proposé que l'absence de DT suite à l'administration de CLZ soit liée à une affinité aux R-D1 qui équivaut son affinité pour les R-D2 et que cette affinité aux R-D1 dépasse celle des autres AP [223, 355]. Le deuxième axe exclut les R-D1 de la physiopathologie des DT. Cet axe prend origine des études qui démontrent l'absence de changements touchant les R-D1 suite aux traitements AP [356], et que l'effet dyskinésigène des agonistes D1 n'est pas constant [357]. De même, les études divergent sur l'existence de différence de l'expression des R-D1 qui soit reliée ou non à la présence de dyskinésies [357].

L'ensemble de ces études a le mérite de donner naissance à l'idée que les DT peuvent être dues au déséquilibre entre les voies striatales directes et indirectes. Cependant, les résultats contradictoires aussi bien des études pharmacologiques que moléculaires n'ont pas aidé à pousser plus loin cette idée. Le résultat de la présente étude nous permet de reconsidérer cette hypothèse, puisque contrairement aux niveaux stables des R-D2, les R-D1 diminuent d'expression suite au traitement. Il est donc envisageable que des changements portant sur la voie directe se produisent suite au traitement antipsychotique. Par ailleurs, on perçoit dans notre étude que la CLZ induit une baisse plus accentuée des R-D1 au niveau du striatum postérieur et particulièrement au niveau du caudé et du putamen latéral. Cette région anatomique reçoit des projections corticales des aires motrices [10] et pourrait être impliquée dans la genèse des mouvements anormaux. L'absence de DT associée au traitement par la CLZ pourrait donc dépendre d'un mécanisme incluant la liaison de la molécule antipsychotique aux R-D1 dans cette région spécialement. Nous ne pouvons pas toutefois extrapoler ce résultat au groupe traité par l'HAL puisque nous n'avons pas trouvé de différence entre les animaux avec ou sans DT. Donc en résumé des résultats sur les R-D1, nous nous retrouvons avec un marqueur de la voie directe (R-D1) qui est affecté par les AP dont l'action porte avant tout sur les marqueurs de la voie indirecte (R-D2).

Par ailleurs, un autre récepteur dopaminergique est exprimé dans cette voie, à savoir les R-D3. En effet, quoique leur expression de base soit globalement faible, les R-D3 sont principalement exprimés dans la voie directe [358, 359]. Curieusement, dans notre étude l'expression de ces récepteurs s'avère fortement modulée par l'HAL. Cette modulation soulève deux points hautement importants. Premièrement le patron d'expression des R-D3 dans les primates s'avère relativement différent du celui retrouvé chez les rongeurs [360, 361]. Deuxièmement, l'expression des R-D3 corrèle positivement avec la sévérité des DT. Plus l'animal est dyskinétique plus l'expression des R-D3 est élevée (Il faut toutefois mentionner qu'une corrélation n'implique pas obligatoirement une relation cause à effet). À notre connaissance cette quantification est la première de son genre chez les primates. De plus, et vue la nature du protocole d'autoradiographie que nous avons utilisé, nous pouvons être confiants que le patron reflète essentiellement

la liaison du ligand utilisé (le [¹²⁵I]-7-OH-PIPAT) aux R-D3 plutôt qu'aux R-D2 [361]. Avant d'interpréter ces résultats, revenons tout d'abord sur l'histoire des R-D3 en ce qui concerne les AP.

La relation entre les AP et les récepteurs D3 a connu plusieurs évolutions. En effet, depuis l'identification et le clonage des R-D3, les R-D3 ont été suggérés comme cible potentielle de l'action des AP. Cet intérêt naquit principalement des études démontrant que les AP, surtout les typiques présentaient une affinité similaire entre les R-D2 et les R-D3 [160]. Dans cet objectif, plusieurs études ont quantifié l'expression des ARNm de ces récepteurs. Ces études (faites chez les rongeurs et chez l'humain) ont conclu à l'absence de l'induction des ARNm des R-D3 suite au traitement chronique par l'HAL [362-366]. Peu d'études ont démontré le contraire [367, 368].

Par ailleurs, pour étudier la densité (nombre) des R-D3 (chez les modèles animaux) des radio-traceurs liant ces récepteurs dans le cerveau ont été développés ([³H]-7-OH-DPAT ou le [¹²⁵I]-7-OH-PIPAT...). Tout comme pour les ARNm, la quantification de la densité des R-D3 a donné des résultats mitigés. Malgré ces divergences ces études ont permis de déterminer le patron global de l'expression des R-D3 (principalement chez les rongeurs) en situation normale et suite aux traitements AP. La distribution des R-D3 chez les rongeurs paraît confinée aux aires limbiques des GB, à savoir le striatum ventral (NAC, et GP ventral), la SN, les îlots de Calleja, et les tubercules olfactifs [347, 360]. Chez les primates, la distribution est sensiblement plus étendue. Elle culmine au niveau du NAC. Mais elle porte également sur le caudé, le putamen, les noyaux thalamiques, l'amygdale, sur certaines régions de l'hippocampe et du cortex, le GPi, la SN et la VTA [369, 370]. En raison de leur distribution, les R-D3 furent avancés comme médiateurs d'aspects limbiques, voire associatifs du fonctionnement striatal [347, 360] et leur implication dans le mécanisme des DT est devenue moins probable voire moins intéressante.

Peu d'années après, et examinés sous un autre angle, les R-D3 ont connu un regain d'intérêt suite aux études génétiques montrant que certaines variations génétiques (des polymorphismes) des R-D3 prédisposent à l'apparition des DT [371]. Depuis, peu d'études ont été consacrés aux R-D3 au profit d'autres paramètres.

Néanmoins, il faut mentionner que de façon générale peu d'études s'attardent désormais sur les DT, puisque elles ont été considérées comme abolies par l'utilisation des APA. Cependant, voir les récentes revues sur le sujet [Blanchet, 2012 et autres] qui ne vont pas dans ce sens. L'état de connaissance actuel ne permet donc pas de se prononcer quant à l'association des R-D3 aux DT.

De notre côté, nous avons fait appel, à une technique de marquage radioactif pour évaluer l'expression des transcrits D3 dans notre cohorte. Les résultats de l'hybridation *in situ* double démontrent une forte induction des ARNm D3 par l'HAL. L'hybridation *in situ* double permet également de combiner un marquage radioactif et un marquage histochimique (Dig) afin de localiser un ARNm en particulier dans une population cellulaire donnée. Nous démontrons que l'induction des ARNm des R-D3 se produit essentiellement dans les cellules de la voie directe exprimant la Sub P, et aussi les R-D1.

Nous avons effectué également une autoradiographie quantitative pour évaluer les changements de l'expression des R-D3 suite aux traitements AP. Notre analyse de la liaison des R-D3 démontre une augmentation de la densité des R-D3 consécutive au traitement par l'HAL, et que cette induction corrèle positivement (au niveau du putamen latéral) avec la sévérité des DT; un phénomène essentiellement moteur. Les résultats issus de notre étude sont, ainsi, congruents avec la distribution classique connue pour les R-D3 chez les primates mais aussi surprenants vue la connotation limbique des R-D3.

Tout d'abord, comment expliquer que nous démontrons une induction des R-D3 alors que beaucoup d'études suggèrent le contraire? Nous estimons que l'absence d'effet des AP sur les R-D3 qui a été montrée dans certaines études s'explique, en grande partie, par des raisons techniques concernant l'absence d'homogénéité des protocoles médicamenteux utilisés (doses, molécules...), de la durée des traitements, de l'espèce étudiée (pour une étude sur les variations inter-espèces voir [372]), de la technique d'autoradiographie (les sels utilisés lors des lavages, pour le rôle joué des sels ioniques voir [373], la sélectivité du ligand radio-marqué) ou de la quantification des ARNm (hybridation *in situ* ou RT-PCR). Pour appuyer ce raisonnement, nous nous focaliserons sur les aspects techniques de ces études.

Pour évaluer l'expression des R-D3 nous avons fait appel à un protocole d'autoradiographie utilisant un radio-traceur le [¹²⁵I]-7-OH-PIPAT (pour [¹²⁵I]-(R-(1) *Trans*-7-hydroxy-2-(*N-n*-propyl-*N*-39-iodo-29-propaminotetralin)). Contrairement à notre étude, un grand nombre d'auteurs qui ont déjà évalué l'expression des R-D3 aussi bien chez les rongeurs que chez les primates ont fait appel au [³H]-7-OH-DPAT (pour [³H]-7-hydroxy-*n, n*-dipropylaminotetralin). Parmi ces études figure la principale étude faite chez les primates [360]. Le [³H]-7-OH-DPAT est un radio-traceur marqué avec le tritium. Son activité spécifique est par conséquent nettement plus faible que le [¹²⁵I]-7-OH-PIPAT, qui lui est marqué par l'isotope iodé [¹²⁵I]. En effet, l'activité spécifique du [³H]-7-OH-DPAT est de l'ordre de 150 Ci/mmol [360] alors que celle du [¹²⁵I]-7-OH-PIPAT chiffre à 2200 Ci/mmol (voir matériel et méthodes de l'article #2, chapitre X). Ainsi, la distribution obtenue avec les études utilisant le [³H]-7-OH-DPAT pourrait refléter une distribution artificiellement plus restreinte (si les temps d'exposition des films sensibles à l'émission radioactive sont insuffisants). Une comparaison directe entre les études utilisant l'un ou l'autre des ligands doit donc prendre en considération les temps d'exposition requis pour chacun des traceurs (6 semaines pour le [³H]-7-OH-DPAT versus 24-48h pour le [¹²⁵I]-7-OH-PIPAT). Pour les autres études qui ont utilisé, tout comme la nôtre, le 7-OH-PIPAT; mais qui ne démontrent pas d'effet des AP sur les R-D3, nous estimons également que la nature des protocoles utilisés a affecté en grande partie leur résultats. En effet, malgré que le [¹²⁵I]-7-OH-PIPAT présente une affinité de base plus élevée aux R-D3, les résultats obtenus des techniques d'autoradiographie ou d'études de liaison dépendent largement de l'état fonctionnel des R-D2 [373].

L'affinité du [¹²⁵I]-7-OH-PIPAT aux R-D3 est théoriquement plus de 100 fois supérieure à celle aux R-D2 [373]. Néanmoins cette affinité dépend hautement de l'état fonctionnel des R-D2. Elle atteint son maximum (≥ 130 fois celles aux R-D2) si les R-D3 sont inactifs (découplés des protéines G). Elle chute profondément jusqu'à atteindre la même valeur que par rapport aux R-D2 si ces derniers sont en interaction avec les protéines G [373]. Pour contourner cette chute d'affinité pour les R-D3 en faveur des R-D2, un protocole utilisant la GTP (guanosine triphosphate) a été conçu [374]. De même, la présence de certains sels pourrait affecter cette affinité. C'est le cas du Mg²⁺ qui favorise le

découplage du R-D2 de la protéine G [375]. Ainsi, des résultats différents peuvent être obtenus selon le ligand utilisé, la présence ou non de certains réactifs et la durée du traitement antipsychotique. L'aspect technique des protocoles adoptés affecte donc, considérablement, les résultats obtenus.

Le protocole d'autoradiographie que nous avons utilisé s'est inspiré des connaissances acquises sur le ^{125}I -7-OH-PIPAT [361]. En effet, nous avons ajouté au milieu la GTP afin de convertir les R-D2 de leur état de haute affinité en un état de faible affinité et donc rendre leur interaction avec le ligand marqué moins probable. Nous avons également utilisé la DTG (1,3-di-(2-tolyl)-guanidine) pour empêcher la liaison du ligand marqué aux sites sigma [376] (sites sensibles à l'HAL et qui peuvent lier le ligand radioactif [377]).

Pour conclure, dans notre étude nous considérons que nous avons fait appel à un radio-traceur hautement sélectif des R-D3, et que nous avons adopté un protocole qui respecte les propriétés physicochimiques du ligand en question tout en minimisant les chances qu'il agisse sur d'autres classes de récepteur. Nous estimons donc que le patron d'expression (la distribution) que nous avons trouvé (putamen dorsal, putamen ventral, noyau caudé, GP) définit à un grand degré l'expression des R-D3 principalement dans les aires riches en R-D3 (striatum ventral et GP par exemple). L'absence de signal du 7-OH-PIPAT au niveau du putamen dorsolatéral en conditions de base (voir figure 3, article#2) appuie également la sélectivité de ^{125}I -7-OH-PIPAT, puisque cette région est fortement marquée par l'iodo-sulpiride).

Maintenant comment expliquer l'augmentation de l'expression des R-D3 par l'HAL et principalement chez les animaux dyskinétiques que nous avons trouvé dans la présente étude?

Tout d'abord, la lecture de la littérature récente sur les R-D3 révèle qu'une telle induction a été documentée dans une étude chez des babouins ayant reçu l'HAL par rapport à ceux sous clozapine [378]. Notons toutefois, que cette étude est faite en aigu après une seule dose des deux médicaments AP et avec un ligand différent du nôtre, à

savoir, le-propyl-9-hydroxynaphthoxazine ([11C]-(-)-PHNO). La sélectivité du ligand utilisé est également sujet de débat [379].

Nos résultats font état d'une induction de l'ARNm des R-D3 d'une part et de l'augmentation de la densité (sites de liaison) des R-D3 d'autre part. L'induction des R-D3 se produit spécifiquement dans une sous-population de cellules du striatum. Nous assistons donc à une sensibilisation qui conduit à une nouvelle synthèse des R-D3. Cette sensibilisation s'opère très probablement au niveau de la voie directe, puisque l'induction des transcrits R-D3 se produit spécifiquement dans les cellules de cette voie striatale (substanceP positive). L'expression basale des R-D3 reste, toutefois, plus associative et limbique que motrice. Cette expression s'affiche sous forme de gradients antéro-postérieur et médio-latéral dans le caudé-putamen (pour la nature limbique de ces régions voir [2]). Cependant, le traitement chronique avec l'HAL induit les R-D3 surtout dans les régions motrices (putamen latéral).

Dans la neuropharmacologie classique, suite au traitement chronique par les APT un blocage chronique des R-D2 a lieu. Ce blocage s'opère sélectivement par rapport aux R-D2. Cependant, si nous extrapolons les nouvelles données obtenues en aigu et qui montrent que, contrairement à ce qu'on pense déjà, les AP seraient nettement plus sélectifs des R-D2 par rapport aux R-D3 [379]. Nous pouvons proposer donc qu'un « switch » ou débalancement se produit dans la signalisation dopaminergique et qu'il implique la voie directe. Ce débalancement conduit à l'induction des R-D3, habituellement exprimé dans les régions limbiques, dans des régions motrices. Pourquoi les D3 seraient spécialement concernés par ce débalancement ? Il a été démontré que les R-D3 se caractérisent par une configuration « rigide » qui se traduit par un état fonctionnel de haute affinité constitutif [380]. Ceci implique qu'ils sont occupés par la DA pour des périodes plus longues par rapport aux autres récepteurs [381]. Donc et toujours dans notre hypothèse, en situation de blocage chronique des R-D2, la signalisation via les R-D3 serait sollicitée.

Pour appuyer d'avantage l'implication des R-D3 dans les mouvements anormaux, nous allons faire le parallèle avec un autre modèle de mouvements anormaux inhérents à la manipulation des récepteurs dopaminergiques, à savoir les dyskinésies induites par la

L-Dopa (LID). Dans les LID, les R-D3 sont également modulés à la hausse chez les animaux dyskinétiques. Cette modulation se produit comme dans le cas des DT (notre étude) dans les régions motrices du caudé-putamen. Ceci est commun aux rongeurs [382], et aux primates [383]). Signalons qu'il a été avancé que les niveaux d'expression des R-D3 corrèlent avec la sévérité des LID [383]. Il a même été proposé qu'un antagoniste D3 pourrait réduire les dyskinésies chez les animaux traités à la L-Dopa [383]. De surcroit, pour soutenir notre hypothèse de déséquilibre entre les voies striatales nous signalons que dans le phénomène des LID, la communication croisée entre les deux voies striatales, directe et indirecte, a été rapportée. Nous abordons ce point plus loin.

Donc en ce qui concerne les R-D3, nous pouvons suggérer que ces récepteurs sont associés aux mécanismes qui sous-tendent l'apparition des DT. Cette association s'inscrit dans un phénomène global qui se traduit par un déséquilibre des voies striatales et donc des informations qui peuvent en provenir.

Nous proposons également une autre explication (complémentaire) à l'induction des R-D3 par l'HAL dans le striatum. L'autoradiographie des R-D3 décrit principalement ce qui se passe au niveau du striatum puisque c'est la région qui exprime le plus les récepteurs D2/D3 (voir introduction). Mais, comme nous l'avons avancé dans l'introduction de cette thèse les récepteurs dopaminergiques extrastriataux jouent également un rôle important dans la transmission dopaminergique et dans l'action des AP. Dans les années 90, un concept de «sélectivité limbique» a été introduit pour décrire une occupation plus importante par la CLZ des récepteurs D2/D3 extrastriataux (corticaux, thalamiques,...) comparés aux récepteurs D2/D3 du striatum [384]. Ce concept naquit des études d'autoradiographie et de binding démontrant des taux d'occupation des récepteurs D2/D3 par la CLZ supérieurs au niveau du cortex et du thalamus, par rapport à ceux retrouvés dans le striatum [384-386]. Ce concept a été étendu à un autre APA: la quétiapine [386]. Rappelons que la quétiapine et la CLZ sont les deux APA présentant un potentiel dyskinésigène quasi-nul.

Ce concept postule également que cette préférence pour les récepteurs extrastriataux

peut compter pour la différence d'action entre les deux classes d'AP [385-387]. La CLZ dans son action sélective des récepteurs extrastriataux inhiberait indirectement les R-D2 du striatum ce qui cause blocage moins drastique. Nous retenons ce concept pour expliquer davantage l'induction des R-D3 au niveau striatal. Comme nous l'avons suggéré le blocage chronique des R-D2 par l'HAL pourrait résulter en un «switch de signalisation» qui porte sur les R-D3 et cause leur induction. La CLZ qui est selon le concept de «sélectivité limbique» moins sélective des récepteurs striataux ne peut pas évoquer une telle induction des R-D3 dans le striatum, et pour cela nous observons une différence significative entre les deux AP spécifiquement dans le caudé-putamen. Comme ces deux régions sont fonctionnellement considérées motrices, cette induction serait spécifiquement associée aux DT. Cependant, nous ne pouvons pas adhérer totalement à cette explication, tant que nous n'avons pas quantifié les autres régions cérébrales.

2. Les dyskinésies tardives et les neuropeptides

Les changements, qui prennent place suite aux traitements AP chroniques (déséquilibre, hypersensibilisation fonctionnelle...) nous semblent surtout des changements à long terme qui nécessitent une durée minimale du traitement. Pour cette raison, les DT apparaissent de façon tardive (après 1-3 mois de traitement continu, voir chapitre V). Le neuropeptide ENK a été toujours présenté comme indicateur des changements à long terme dans la voie striatale indirecte. Ce que nous observons dans la présente étude montre qu'aussi bien les AP typiques qu'atypiques induisent l'expression de l'ENK. Néanmoins, l'effet de l'HAL est plus important principalement au niveau du putamen. Dans cette région, le groupe des animaux traités avec HAL et ne montrant pas de DT montre des niveaux plus élevés de l'ARNm de l'ENK. Ces résultats concordent donc avec la littérature chez les rongeurs en ce qui concerne l'association entre l'ENK et l'effet des AP [388, 389]. Quoique l'induction de l'ENK par l'HAL soit constante, la relation entre cette induction et les DT est controversée. En effet, chez les rongeurs présentant des VCM, l'induction de l'ARNm de l'ENK est plus importante et se produit de façon accrue dans l'accumbens [390]. Dans la présente étude, l'induction des transcrits de ce

neuropeptide chez les animaux non dyskinétiques est, contrairement au modèles des rongeurs, plus importante et se produit au niveau d'un territoire moteur: le putamen dorsolatéral. Cette divergence peut être due à la différence d'espèces mais peut être plus à la fidélité de reproduction des DT par les VCM. Comme nous l'avons avancé dans le chapitre V, les primates non humains seraient le modèle le plus proche de l'humain. Maintenant, comment expliquer que les animaux non dyskinétiques traités par l'HAL expriment plus d'ENK? Nous suggérons que l'induction d'ENK est le produit d'un circuit « protecteur » qui tend à tamponner les effets du blocage des R-D2. Ce circuit serait dépassé dans le cas des animaux dyskinétiques. En effet, il est désormais connu que l'ENK peut être co-libérée avec le GABA à partir des projections striatopallidales et diminue ainsi la libération du GABA consécutive à la dépolarisation dans le GP. L'induction et l'augmentation de l'expression de l'ENK peut donc s'inscrire dans le cadre d'un système tampon qui vise la baisse d'une hyperactivité GABAergique inhibitrice dans les voies de sortie des GB [391, 392].

Nous avons également étudié l'expression d'un autre neuropeptide: la substance P avec la technique d'hybridation *in situ* double. Aucun changement n'a été détecté entre les animaux traités avec l'HAL et les animaux contrôles. Ce résultat concorde avec les résultats obtenus chez les rongeurs traités par l'HAL et démontrant l'absence de changement de l'expression de la substance P [393, 394]. Cependant l'absence de la modulation de la substance P semble s'installer après le traitement chronique puisque au début du traitement par l'HAL des changements peuvent être perçus [394]. Nous ne pouvons pas exclure qu'une telle adaptation s'est produite après la longue durée du traitement dans notre protocole.

3. Nur77: paramètre important dans l'apparition des dyskinésies tardives?

Les changements (adaptations) à long terme exigent la synthèse d'une batterie de protéines pour les soutenir et cette synthèse est dépendante de facteurs de transcriptions. Il est connu que les deux classes d'AP modulent l'expression de plusieurs

gènes (voir chapitre V). Parmi ces gènes nous avons privilégié l'étude du récepteur nucléaire Nur77 pour différentes raisons (voir chapitre VII). La quantification des ARNm Nur77 effectuée dans la présente étude (voir article #1, chapitre IX) révèle des résultats concordants avec les études faites chez les rongeurs et qui indiquent un effet différentiel net entre les deux classes d'AP [278, 330].

Spécifiquement, nous démontrons que Nur77 induit par l'Hal présente une relation inverse avec l'intensité des DT. Nur77 est un facteur de transcription qui agit en modulant des gènes cibles [300, 301]. Parmi ces gènes, figure fort probablement l'ENK (pré-pro-enképhaline) (Voyer et Levesque, résultats non publiés et [334]). Par ailleurs, il a été démontré que chez les rongeurs l'ENK est fortement affecté par la déletion génique de Nur77 [334]. D'autre part, dans notre étude l'induction de l'ENK suit le même patron que celle de Nur77. En effet les deux gènes sont, davantage, présents chez les animaux non dyskinétiques. Compte tenu de la relation liant Nur77 au système dopaminergique (pour une explication détaillée voir chapitre VI), nous pouvons suggérer que Nur77 serait induit dans le cadre d'une cascade de signalisation « protectrice » pour protéger les circuits neuronaux de la sensibilisation (fonctionnelle ou autre) secondaire au blocage chronique des R-D2. Dans ce circuit, Nur77 agirait sur les gènes cibles (l'ENK ici) et modulerait leur expression à la hausse. L'apparition de DT serait le résultat du « dépassement » de ce circuit.

D'autre part, nous avons entrepris une étude génétique pour voir l'impact fonctionnel du polymorphisme (SNP) présent dans la région régulatrice 3'-UTR de Nur77, retrouvé chez l'humain et associé à l'apparition des DT dans une cohorte de patients schizophrènes [336]. Nous avons tenté de voir dans un modèle cellulaire si la présence du SNP change l'expression d'un gène rapporteur (Figure 9 et annexe I).

Cette étude a démontré que la transcription du gène rapporteur (firefly luciférase) baisse considérablement en présence du SNP en question. De plus, une analyse *in silico* suggère que le SNP serait localisé dans une séquence de reconnaissance pour le microARN 221 (annexe 1). L'ajout d'un oligonucléotide dont la séquence est complémentaire au site de reconnaissance est en mesure de renverser, de façon dose dépendante, l'effet du

polymorphisme sur l'expression du gène rapporteur (Figure 9). Si l'effet du polymorphisme se confirme au niveau de son gène natif (Nur77), il sera alors possible d'associer le niveau d'expression de Nur77 à l'apparition de DT chez l'humain. Ces observations pourraient confirmer l'importance de Nur77 comme facteur « protecteur » contre l'apparition des DT. Cependant, pour arriver à une telle conclusion notre étude doit être complétée dans les modèles animaux.

4. Les cascades signalétiques associées aux dyskinésies tardives

Nous avons démontré encore une fois que l'expression des R-D2 n'est pas spécialement augmentée suite aux traitements par l'HAL. Nous pensons que l'hypersensibilisation, surtout à long terme, serait plutôt d'ordre fonctionnel et qu'elle se traduit par un « emballement des cascades signalétiques ». Comme cascades signalétiques, nous avons exploré seulement les kinases ERK 1/2, Plusieurs études s'accordent sur l'activation des ERK1/2 par l'HAL [241, 251, 395]. D'autre part, il a été démontré que l'activation des ERK1/2 évolue dans le temps et qu'elle dépend du temps écoulé après le traitement avec l'antipsychotique étudié [246]. Pour ce, l'absence de différences entre les animaux dyskinétiques et non dyskinétiques en terme de l'activation de ces kinases peut être due au temps de sacrifice de nos animaux (3h après la dernière dose de médicament). Par ailleurs, une étude réalisée en 2008 montre clairement que l'HAL (traitement aigu) active la phosphorylation de ERK, de MSK1 de l'histone H3 au niveau des MSN de la voie indirecte [37]. En s'inspirant de ces données, nous pensons que l'activation des ERK1/2 que nous avons observée s'inscrit plutôt dans ce qu'on a appelé l'hypersensibilisation fonctionnelle inhérente à l'action des AP et non pas à l'expression des DT.

Nous suggérons deux phases d'action pour les AP: une première phase qui se produit aux premiers jours du traitement qui va impliquer des changements probablement transitoires. Dans cette phase, des cascades signalétiques peuvent être activées voir tableau 3 et [233]. La phase secondaire est associée au traitement chronique. Dans cette phase une certaine homéostasie s'installe, et les circuits neuronaux

« s'adaptent » au blocage chronique des récepteurs dopaminergiques. Chez certains sujets et pour des raisons particulières (prédispositions génétiques, environnement...), cette adaptation « pathologique » serait propice à l'apparition des DT.

Notre étude s'est limitée aux kinases ERK1/2 et nous ne pouvons donc pas statuer sur les autres cascades potentiellement impliquées. De nombreuses voies de signalisation intracellulaire ont été associées à l'action des AP (voir figure 3, et [63]). L'analyse de ces voies reste à être effectuée (voir section perspective).

Nous venons de voir que le traitement par les AP affecte l'expression de certains récepteurs dopaminergiques (R-D1 et R-D3), de certains neuropeptides (ENK), de certains facteurs de transcription (Nur77) et de certaines kinases (ERK 1/2). Prises ensemble, ces modifications nous rappellent les modifications requises pour évoquer un phénomène de plasticité, qui se définit comme un remodelage des synapses permettant leur renforcement ou leur affaiblissement.

Nous ne révélons pas un secret, le phénomène de plasticité synaptique est étroitement lié aux mécanismes d'action des AP, et de l'HAL spécialement (vue que le plus grand nombre d'études a été consacré à cette molécule) [396]. Des changements d'ordre plastiques sont constamment observés suite à un traitement à base d'HAL [396, 397]. La relation entre le traitement AP et le phénomène de plasticité émerge d'un fait simple : les effets des AP nécessitent un laps de temps avant de s'exprimer [234]. Par la suite, des études de morphologie cérébrale, de microscopie électronique et des d'études d'électrophysiologie ont pu mettre debout ce concept [396, 397]. Il a été apporté que L'HAL exerce un effet trophique chez les schizophrènes en augmentant le volume de striatum chez cette population ainsi que d'autres régions cérébrales [398-400]. L'ampleur des changements causés par l'HAL reste toujours à démontrer en présence d'études qui les contestent. Ceci dit, les effets neuroplastiques de l'HAL sont indéniables [396]. L'HAL affecte également la morphologie synaptique. Il a été documenté que le traitement avec l'HAL engendre une augmentation du nombre des terminaisons axonales [401-403], et une augmentation de la densité post-synaptique [403]. Ces effets semblent porter spécifiquement le nombre des synapses glutamatergiques. Par ailleurs, HAL

affecte la phosphorylation et la synthèse de protéines impliquées dans la signalisation synaptique, cette étape est nécessaire dans la formation des mémoires à long terme. En effet, et comme nous l'avons expliqué dans l'introduction, la signalisation des récepteurs de type D2 est associée à la baisse de la PKA. L'HAL en bloquant ces récepteurs devrait lever l'inhibition de la PKA [404]. Cette kinase phosphoryle plusieurs protéines ainsi que des facteurs de transcription qui régulent l'expression génique et qui ont démontré un rôle important dans la modulation de la plasticité synaptique, il s'agit principalement de l'activation de CREB qui affecte à son tour l'expression génique et dicte une nouvelle synthèse protéique. L'HAL en stimulation la cascade signalétique PKA/CREB est en mesure d'engendrer une modification de l'expression génique [405, 406]. Ces études vont donc dans leur ensemble dans le même sens que les effets que nous avons trouvés chez les animaux traités par l'HAL (modifications portant sur des récepteurs, sur des messagers, sur des facteurs de transcription et sur des kinases). Donc nous voyons dans nos résultats la continuité des effets neuroplastiques de l'HAL.

Penchons nous un peu plus sur la portée de ces effets. Tout d'abord, parmi les changements les plus marqués que l'HAL semble être capable d'augmenter nous retenons la taille des boutons terminaux, le nombre de synapses glutamatergiques ainsi que le nombre de vésicules par synapse [401-403]. Ces changements devraient conditionner donc une hyperactivité dans la transmission glutamatergique provenant du cortex. D'autre part, l'HAL induit aussi une réduction dans la quantité d'épines dendritiques au niveau du striatum [407] et favorise la formation de la LTP au détriment de la LTD probablement sur les neurones de la voie indirecte uniquement [397]. Une étude réalisée en 2013 chez les rats en mouvements a trouvé que l'HAL (en aigu) engendre une baisse du taux de décharge des MSN dans le striatum [408]. Donc à la potentialisation de la transmission glutamatergique en issu du cortex s'oppose une atténuation de l'impact de cette transmission au niveau striatal.

Pour rassembler ces concepts, on peut suggérer que le blocage des R-D2 et la levée de l'inhibition de la voie indirecte inhérente à un traitement par l'HAL mène à l'élimination des synapses glutamatergiques (perte des épines dendritiques) pour limiter

une surstimulation excessive de cette voie et protéger contre un dysfonctionnement striatal. L'apparition de mouvements anormaux serait un échec de ce mécanisme compensatoire.

Par ailleurs, il a été démontré que Nur77 pourrait participer à cette élimination de synapses glutamatergiques dans un contexte d'hyperexcitabilité soutenue [409]. Rappelons que Nur77 est induit spécifiquement dans les neurones de la voie indirecte lors d'un traitement chronique à l'HAL aussi bien chez les rongeurs [410] que chez les primates (notre étude). Nur77 pourrait donc s'identifier comme un facteur facilitant d'une voie protectrice qu'on voit échouer en présence de DT. Le signal erroné provenant premièrement des neurones de la voie indirecte et le déséquilibre entre la voie directe et indirecte devrait affecter tout le striatum et le signal vers les voies de sortie ainsi que vers le cortex. Dans le striatum, d'autres populations seraient donc affectées par toutes ces perturbations. Nous évoquons ici les interneurons cholinergiques. Ces interneurons expriment les R-D2 et les R-D5 [73] et reçoivent des projections principalement de la part des SNc [73] et seront donc logiquement sensibles au blocage des R-D2 par l'HAL et aux modifications que l'environnement striatal dues à la perturbation du signal dopaminergique. Par ailleurs, la libération phasique de la DA inhibe les interneurons cholinergiques dans les modèles animaux [411-413]. La dénervation dopaminergique dans les modèles animaux rongeurs et primates de la MP cause une augmentation des taux de décharge de ces neurones cholinergiques [411-413]

Un blocage chronique des récepteurs dopaminergiques et donc l'inhibition de la signalisation dopaminergique reproduit artificiellement la dénervation dopaminergique et devrait causer une augmentation pareille dans les taux de décharge de ces interneurons. Ceci a été démontré dans l'étude de et qui a démontré que l'HAL cause un effet différent sur les différentes populations neuronales du striatum qui consiste en une baisse des taux de décharge des MSN et des interneurons GABAergiques et en une augmentation des taux de décharge des interneurons cholinergiques [408]. Ces interneurons sont associés à certaines formes de plasticité striatale [142] et la

modification de décharge qu'ils peuvent subir suite à un traitement par l'HAL est un paramètre intéressant à considérer dans le mécanisme d'action des AP.

5. Les dyskinésies tardives et les dyskinésies induites à la L-dopa: des facettes différentes à un même phénomène?

Les LID sont des mouvements involontaires anormaux qui se développent après une durée d'exposition à la L-dopa, traitement cardinal de la MP [414]. Cliniquement les LID constituent un ensemble hétérogène de mouvements anormaux [414]. On en distingue les mouvements choréiques (hyperkinésie et mouvements involontaires) et les dystonies (contractions musculaires douloureuses) [415]. Ces mouvements portent généralement sur les membres inférieurs et supérieurs et peuvent s'étendre à tout le corps [416]. Les LID surviennent chez 30-80% des parkinsoniens traités par la L-dopa. La prévalence va en augmentant avec les années d'exposition au traitement [417].

À *priori*, aussi bien les TD que les LID sont des mouvements hyperkinétiques involontaires qui apparaissent suite à la manipulation de la transmission dopaminergique et des récepteurs dopaminergiques spécialement. Donc pouvons-nous suggérer qu'ils partagent des points communs surtout en ce qui a trait aux résultats trouvés dans le présent ouvrage?

Il n'est pas dans l'objectif de cette thèse d'entrer dans les détails de la physiopathologie des LID. Mais, profitant d'une analyse que j'ai effectuée dans le cadre de ma formation graduée sur des animaux rendus parkinsoniens, j'ai voulu chercher des similitudes entre les DT et les LID. Pour ce, nous avons élaboré des tableaux comparant les principaux résultats obtenus avec les DT (incluant notre étude) avec les résultats obtenus dans le cas des LID (voir tableau 6 et 7).

Deux prérequis sont indispensables pour l'apparition des LID. Premièrement, les LID ne se développent pas chez un sujet sain qui reçoit la L-dopa [418, 419]. La dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc caractéristiques de la MP est le contexte physiopathologique déterminant l'apparition des LID [420]. Deuxièmement, le

traitement à base de la L-dopa est associé à la survenue la plus rapide et la plus certaine des LID. Les autres traitements proposés pour la MP sont eux associés à une apparition plus retardée ou une incidence plus faible de ces dyskinésies [421-423].

Pour expliquer les LID, et en se référant au modèle classique du fonctionnement des ganglions de la base (Modèle de Albin, Young et Penny), il est proposé que la perte des neurones dopaminergiques projetant au striatum soit responsable de l'hyperactivité de la voie indirecte suite à la baisse de l'input cortical [424], (voir figure 9). À cette hyperactivité s'ajoute une baisse de l'activité de la voie directe considérée comme facilitatrice des mouvements [424]. Ceci se traduit par la bradykinésie chez les parkinsoniens (voir figure 9). L'introduction de la L-dopa bouleverse ce schéma sans pouvoir restaurer sa fonction normale [284]. En effet, dans le cas des LID, il est suggéré que c'est plutôt une baisse accrue de l'activité de la voie indirecte corrélée à une sursimulation de la voie directe qui prend lieu [424]. Malgré que les données anatomiques ne montrent pas d'hyperactivité de la voie indirecte en cas de la MP, ce schéma reste très utile pour modéliser le phénomène des LID.

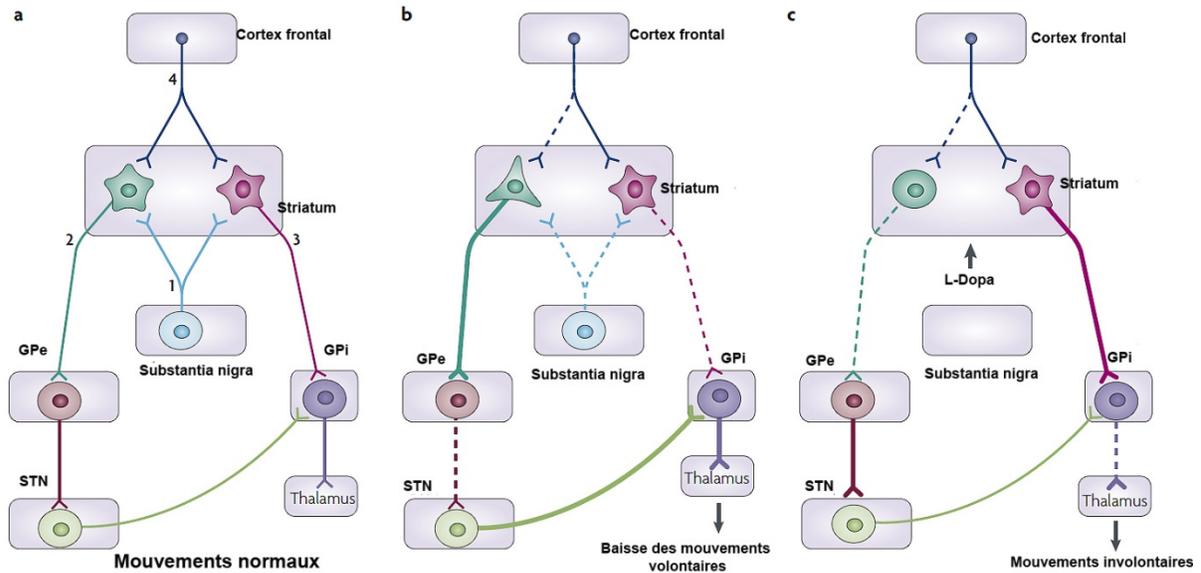


Figure 10: Modifications fonctionnelles des ganglions de la base dans le cas de la maladie de Parkinson et les dyskinésies induites par la L-Dopa

(a): Circuits des ganglions de la base en situation physiologique normale. (b) Changements des interconnexions des ganglions de la base dans le cas de la maladie de Parkinson. (c) Changements des interconnexions des ganglions de la base dans le cas des dyskinésies induites par la L-Dopa (1) voie dopaminergique nigrostriée, (2) voie striatale indirecte, (3) voie striatale directe et (4) projection glutamatergique corticostriatale. Figure tirée et adaptée de Jenner, P et al; 2008 [424]

La L-dopa est un précurseur qui se transforme en dopamine dans le cerveau et ciblerait donc les mêmes récepteurs de la DA. Sur le plan moléculaire, les recherches sur les LID étaient naturellement dirigées vers les récepteurs dopaminergiques. Plusieurs changements portent sur ces récepteurs dopaminergiques à une phase ou l'autre du processus menant aux dyskinésies (voir tableau 6). Tout particulièrement, la dénervation augmente les niveaux d'expression des R-D2 aussi bien chez les rats lésés avec la 6-OH-DA [425], que les singes traités avec MPTP [426] et les patients parkinsoniens [427]. Cette augmentation ne se maintient pas après l'administration de la L-Dopa et des niveaux similaires voir plus bas que les sujets contrôles ont été observés [426, 427]. Cependant, les changements qui affectent les récepteurs de la voie directe revêtent une plus grande importance dans les LID (plus que la dénervation). En effet, malgré que l'expression des R-D1 ne change pas en tant que telle entre parkinsoniens traités ou non ou sujets contrôles [382, 427, 428], il est documenté que la distribution cellulaire de ces récepteurs est affectée dans le cas des LID [429, 430]. En prime, il devient évident que la signalisation émanant de l'activation des R-D1 est sur-stimulée dans les LID [431].

Outre les récepteurs, les changements inhérents à la perte des neurones dopaminergiques et à la dopathérapie s'étendent à plusieurs autres aspects du fonctionnement neuronal. Deux études réalisées en 2005 et 2006 viennent révéler que suite à la lésion et à la perte des neurones dopaminergiques, une perte d'épines dendritiques est exclusivement observée au niveau de la voie indirecte [432, 433]. Cette perte conduit à une baisse de la connectivité cortico-striatale des neurones de la voie indirecte [432, 433].

Nous sommes donc face à une situation où la dénervation dopaminergique affecte les voies striatales. À l'occurrence, la voie indirecte serait affectée de façon plus importante (seule cette voie est concernée par la perte d'épines dendritiques et la baisse de l'input corticostriatal subséquent). Cette dénervation conditionne un réarrangement des circuits neuronaux pour compenser la perte dopaminergique. Au début du traitement, l'introduction de la L-Dopa ne fait que camoufler ce réarrangement sans pour autant

restituer l'état normal (on assiste à une amélioration motrice au début du traitement) [284, 424]. Après l'exposition prolongée à la L-dopa, le contexte physiologique et anatomique devient permissif à l'apparition des dyskinésies (peut-être parce que un autre réarrangement anormal prend place?). Ce contexte se traduit principalement par une surstimulation de la voie directe [424].

Ce schéma nous rappelle dans ces grands traits celui des DT. Au début du traitement avec les AP, nous nous plaçons dans un contexte similaire à celui de la dénervation dopaminergique. En effet, ces médicaments en bloquant les récepteurs D2 lèvent le tonus inhibiteur de ces récepteurs et peuvent conduire à une hyperactivité de la voie indirecte. De même, dans le cas des DT, l'exposition chronique aux AP pourrait se traduire par une hyperactivation de la voie directe (comme indice de cette hyperactivité nous assistons à une augmentation de l'expression des R-D3).

Nous pouvons ainsi brosser un portrait global des deux phénomènes. Dans ce portrait, la manipulation de la transmission dopaminergique occasionne des changements de la voie indirecte (hyperactivation dans notre situation). Ces changements suscitent à leur tour des changements de la voie directe dans une tentative compensatoire pour préserver l'homéostasie striatale. Dans ce portrait, la manipulation de la transmission dopaminergique centrale évoque le même canevas de réponse striatale (déséquilibre entre les deux voies directe et indirecte) et se traduit ultérieurement par la même réponse physiologique (hyperkinésie ici).

Curieusement, un concept très similaire a été proposé à l'aube de l'utilisation des AP et de la L-dopa et l'apparition des dyskinésies correspondantes. En effet, en 1973, Klawans a proposé une hypothèse qu'il a dénommée "*denervation-induced supersensitivity*" pour super-sensibilisation induite par la dénervation [434]. Selon cette hypothèse la dénervation dopaminergique consécutive à la dégénérescence de la voie nigrostriée chez les parkinsoniens ou au blocage chronique par les AP conduit à la sensibilisation des récepteurs de la DA au niveau striatal. Suite à l'exposition chronique, ces récepteurs répondent de façon exagérée à la DA (endogène dans le cas de DT ou exogène sous forme de L-dopa dans le cas de la MP). Postulée de la manière, l'hypothèse de Klawans ne

s'avère pas suffisante à expliquer les deux phénomènes. La sensibilisation des récepteurs dopaminergique, est un phénomène pharmacologique universel qui se développe rapidement après l'administration d'un médicament (ligand dopaminergique) et est de surcroît réversible. Pour ce, nous pensons que quelques ajustements peuvent rendre cette hypothèse valide. Nous retenons de cette hypothèse que la dénervation peut impliquer une sensibilisation striatale qui elle implique une réponse exagérée. L'hypersensibilisation pharmacologique, changement transitoire et intermittent, devrait mener ou laisser place à une hypersensibilisation fonctionnelle de longue durée qui serait permissive de changements de longue durée.

Pour défendre cette hypothèse, signalons que la voie indirecte paraît affectée de la même façon par le traitement antipsychotique (antagoniste dopaminergique) que par la L-dopa (agoniste dopaminergique). En effet, et pour commencer, l'expression (les sites de liaison) des R-D2 ne montre pas de changements significatifs suite aux traitements AP ou à la L-dopa (voir les résultats de la présente étude et [428]). Deuxièmement, aussi bien le traitement antipsychotique chronique que la L-Dopa induit l'ARNm du neuropeptide preproenkephaline (ENK) (voir tableau 7), marqueur de la voie indirecte. Et comme nous avons avancé, il a été démontré qu'à la dénervation s'en suit une perte d'épines dendritiques au niveau des synapses de la voie indirecte [432, 433] . Parallèlement, l'HAL affecte aussi bien l'arborisation que la densité et la surface totale des épines dendritiques [401, 407, 435, 436]. Cependant, il faut reconnaître que les études réalisées ne permettent pas de localiser exactement la voie striatale concernée.

D'autre part, et malgré qu'elle semble s'exprimer différemment, la surstimulation de la voie directe pourrait être décrite pour les deux phénomènes. En effet, la sur sensibilisation des cascades signalétiques de la voie D1 est la mieux corrélée avec les LID [431]. Dans les DT, nous avons observé une baisse de l'expression des R-D1 mais surtout une augmentation de l'expression des R-D3 (et aussi une induction de leur ARNm), laissant suggérer que la voie directe est bel et bien impliquée dans les DT.

D'autre part, l'induction des R-D3 montre une propriété très importante, en effet ce récepteur associé aux fonctions limbiques et associatives du striatum de par sa

distribution est induit dans les territoires moteurs du striatum dans les deux dyskinésies (présente étude et [383, 437]). Ce récepteur serait donc très intéressant à explorer en vue d'une meilleure compréhension des deux phénomènes.

Par ailleurs, nous avons avancés dans les premiers paragraphes de ce chapitre que l'induction de l'ENK et du Nur77 s'inscrit dans le cadre d'un circuit neuroadaptateur protecteur qui sera « outré » chez les animaux dyskinétiques. Nous avons démontré que chez les singes MPTP traités à la L-dopa et avec l'acide gras le DHA et qui montrent moins de dyskinésies, Nur77 est induit davantage par rapport aux autres animaux exprimant plus de dyskinésies [438]. Comme le DHA est un ligand des récepteurs RXR [312], partenaire d'hétérodimérisation avec Nur77, nous avons proposé que l'effet du DHA (la baisse des LID) puisse passer par l'induction de Nur77.

Dans le cadre d'une étude chez les rongeurs, il a également été démontré que le DHA réduit l'intensité des VCM chez les souris traitées par l'HAL [333]. Cet effet bénéfique est dépendant de l'expression du gène Nur77 et fait défaut chez la souris mutante Nur77 KO [333]. De plus, un traitement avec le HX531, un antagoniste synthétique du récepteur RXR accentue de façon significative l'intensité des VCM induites par l'HAL chez les souris sauvages, mais demeure sans effet chez les souris déficiente en Nur77 [333]. Parallèlement, une étude préliminaire entreprise chez le singe a révélé que l'antagoniste des RXR ; le HX531, semble exacerber les DT alors qu'une tendance à l'amélioration par les agonistes des RXR (DHA) a été notée (Blanchet, P.J; données non publiées). Nous pouvons donc conclure que le système Nur77-RXR acquiert une importance pour les deux phénomènes. Le circuit « neuroprotecteur » impliquant l'induction de Nur77 et son interaction avec RXR serait sollicité en cas de modification (baisse ici) du signal dopaminergique.

u-delà de l'étude, sujet de cette thèse, plusieurs points en communs peuvent être soulevés pour les LID et les DT. Des changements de la transmission glutamatergique (surtout en ce qui concerne les récepteurs glutamatergiques et les connexions corticostriatales) sont de plus en plus incriminés dans les LID (pour une revue voir [439]). Il a même été proposé que l'augmentation de la signalisation glutamatergique est un

pilier central dans la physiopathologie des LID [440]. Citons en guise d'exemple que la baisse de la densité des récepteurs NMDA contenant les sous unités NR2B spécialement au niveau de la zone synaptique, semble affaiblir davantage la capacité des projections corticostriatales à stimuler la voie indirecte [441].

L'HAL à son tour inhibe les cascades secondaires à l'activation des récepteurs NMDA en interagissant avec la sous unité NR1/NR2B et en modulant leur phosphorylation [442-444]. L'HAL occasionne une modification du taux des synapses glutamatergiques symétriques et asymétriques, ainsi qu'une modification de la densité synaptique et des niveaux du glutamate extracellulaire (pour une revue voir [154]).

Par ailleurs nous assistons dans les deux phénomènes à un changement de la transmission de la DA. Comme démontré dans le chapitre III, la DA est un modulateur important dans les phénomènes de plasticité synaptique prenant lieu dans le striatum. D'autre part, les épines dendritiques aussi bien affectées par l'HAL que par la dénervation dopaminergique sont le siège des synapses excitateurs et la manipulation de leur densité ou de leur arborisation affecte directement le signal glutamatergique [407, 445, 446]. Ce qui conditionne des changements de la plasticité synaptique au niveau du striatum.

L'installation d'une plasticité synaptique aberrante ou erronée est désormais avancée comme explication à l'apparition des LID [447]. La « dépotentialisation » semble être la forme la plus impliquée [447, 448]. Néanmoins, des évidences provenant de modèles cellulaires plaident pour des changements affectant la LTD également [439]. Cette nouvelle plasticité dictée par les réarrangements consécutifs à la dénervation et exacerbée en présence de la L-dopa code pour une réponse motrice inadéquate sous forme de LID. De même, nous retrouvons le parallèle de cette hypothèse pour les DT et une plasticité synaptique « mal-adaptative » fut proposée pour expliquer les DT (voir chapitre VI et [286]).

Ainsi, plusieurs similitudes existent entre les deux phénomènes et le canevas commun que nous avons proposé peut être considéré.

Néanmoins, plusieurs données s'opposent à la consolidation de notre hypothèse unificatrice. Tout d'abord l'hyperactivité de la voie indirecte dans les deux phénomènes semble controversée. En effet, dans les cas des DT nous n'avons trouvé aucune augmentation de l'expression des R-D2. Nous avons trouvé cependant une augmentation de la phosphorylation des ERK1/2. Si nous extrapolons les résultats obtenus en aigu [37], cette activation prendrait place au niveau de la voie indirecte. Dans le cas des LID, l'hyperactivité présumée de la voie indirecte n'est pas corroborée par les données anatomiques et biochimiques [424]. Néanmoins la perte d'épines dendritiques dans cette voie pourrait engendrer un réarrangement synaptique de nouvelles formes de connexions dendritiques multiples apparaissent chez les animaux dyskinétiques et donc une rehausse de l'output striatal en faveur d'une hyperactivité de cette voie. En sus, l'hyperactivité de la voie indirecte dans les LID semble plutôt se traduire par des troubles de la décharge neuronale à ce niveau [424].

D'autre part, sur le plan pharmacodynamique, les LID semblent impliquer la stimulation pulsatile des récepteurs dopaminergiques par la L-dopa [449]. Il a été proposé que les perfusions de L-dopa diminuent les LID [450]. Dans le cas des DT, le contraire est vrai. En effet, il semble que les formes à libération prolongée exacerbent les dyskinésies tardives [451]. Ces divergences peuvent être expliquées en partie par les propriétés pharmacocinétiques des deux ligands.

Sur le plan génétique, et dans une étude réalisée sur les facteurs les plus connus disposant à l'un ou l'autre trouble, il a été démontré qu'aucun background génétique n'est partagé entre les deux types de dyskinésies [452]. Toutefois, cette étude n'est pas exhaustive et n'inclut pas les gènes nouvellement décrits comme associés aux deux phénomènes (Nur77 par exemple).

Nous ne pouvons pas expliquer toutefois plusieurs divergences entre les deux types. En guise d'exemple, la représentation clinique est relativement différente entre les deux dyskinésies. Les LID portent sur les membres et peuvent s'étendre à tout le corps, alors que les DT sont surtout orofaciales malgré qu'elles puissent s'étendre à tout le corps après. Nous ne pouvons pas expliquer également pourquoi une proportion

seulement de patients traités développe des dyskinésies, ni pourquoi les DT seront plus prévalentes chez les personnes âgées [453] alors que les LID le sont chez les sujets jeunes [454].

Nous ajoutons à ça, qu'il est important de considérer trois temps ou phases qui mènent à l'apparition des LID. Premièrement, nous avons la perte des neurones dopaminergiques, et deuxièmement le phénomène de « priming ». Ce mot réfère à l'ensemble des changements qui mènent à l'apparition des LID. Une fois le priming est fait, les LID commencent à apparaître après chaque administration de médicaments. Il est difficile d'identifier le moment exact de la survenue des changements biochimiques rapportés dans la littérature et donc d'établir une comparaison irréfutable avec les DT. Nous observons également, que le nombre d'études consacrées aux LID dépasse de loin celui relatif aux DT. Ce qui affecte également notre comparaison.

En conclusion, nous estimons que le modèle de débalancement des voies striatales qui se produit suite à une modification de la transmission dopaminergique afférente au striatum est un modèle très important à considérer. Ce modèle peut servir comme outil facilitant la compréhension des deux phénomènes et ce en dépit des divergences qui restent à expliquer.

Nous décrivons les DT comme la conséquence de la perturbation de la transmission dopaminergique et des mécanismes compensatoires sollicités pour contrer cette perturbation. Nous postulons que le mécanisme des DT sous-tend une modification de la connectivité corticostriatale qui perturbe directement la voie striatale indirecte dans le sens d'une levée de l'inhibition. Ce qui se traduit à son tour par une augmentation de l'output provenant de la voie des sorties des GB. Le réarrangement des circuits neuronaux est accompagné voir causés par un réarrangement morphologique des structures synaptiques. Ces changements favorisent l'apparition de « mauvaises adaptations » qui se manifestent par une plasticité synaptique anormale. Ces changements aboutissent finalement à des codages erronés de l'information issue des GB et donc du contrôle moteur conséquent. Ce qui permet la survenue de mouvements anormaux involontaires. Les AP pouvant causer des DT seraient donc capables

d'engendrer ces changements (déséquilibre des voies striatales principalement). La différence par rapport aux AP non associés aux DT serait par rapport à la capacité de la molécule à interagir avec l'un ou l'autre des paramètres impliqués de ces changements.

Tableau 6: Tableau comparatif des modifications biochimiques observées dans le striatum dans le cas des dyskinésies tardives ou des dyskinésies induites par la L-dopa chez les primates.

Paramètre étudié		Dyskinésies tardives	Dyskinésies induites par la L-Dopa
R-D1	ARNm	HAL et CLZ n'affectent pas l'ARNm [455]	induction suite au traitement à la L-dopa, pas de différence entre dyskinétique et non dyskinétique [456]. Pas de changement (voire même une baisse dans certaines régions) par rapport aux contrôles dans d'autres études [72]
	Site de liaison	Baisse globale au niveau du Putamen -Caudé par CLZ et HAL; Pas de différence entre dyskinétique et non dyskinétique [présente étude]	Augmentation de l'expression aussi bien chez les animaux dyskinétiques que non dyskinétiques, pas d'effets dans d'autres études [457]
R-D2	ARNm	induction par HAL, CLZ n'a pas d'effet [458]	la dénervation induit l'expression de l'ARNm, L-dopa normalise les valeurs chez les dyskinétiques, l'expression reste élevée chez les non dyskinétiques [72].
	Site de liaison	Niveaux similaires aux animaux contrôles [présente étude]	La dénervation augmente la densité des sites de liaison, pas de changements ou tendance à la baisse chez les animaux dyskinétiques, pas de différence entre dyskinétiques et non dyskinétiques [426]
R-D3	ARNm	Pas d'études chez les primates, induction par HAL [présente étude]	pas de changements [95]
	Site de liaison	augmentation de l'expression avec HAL, augmentation plus marquée chez les animaux dyskinétiques [présente étude]	Baisse suite à la dénervation, Augmentation de l'expression plus accentuée chez les animaux dyskinétiques le traitement la normalise [383], pas de différence entre dyskinétiques et non dyskinétiques dans d'autres études [459]
R-D4	ARNm	induction par HAL et CLZ [458]	
	Site de liaison	augmentation de l'expression dans une étude en post-mortem chez les schizophrènes	

Tableau 7: Tableau comparatif des changements de l'expression des neuropeptides et Nur77 observées dans le striatum dans le cas des dyskinésies tardives ou des dyskinésies induites par la L-dopa chez les primates

Paramètre étudié		Dyskinésies tardives	Dyskinésies induites par la L-dopa
Enképhaline	ARNm	Induction par HAL et CLZ, augmentation plus importante dans le striatum latéral par HAL chez les animaux non dyskinétiques (présente étude)	une augmentation chez les animaux dyskinétiques et les patients dyskinétiques [460], mais d'autres études montrent une augmentation par la dénervation et une normalisation par La L-dopa [461].
Substance P	ARNm	Pas de changements spécifiques entre les animaux contrôles et ceux traités avec HAL (présente étude)	Baisse chez les parkinsoniens [462], Chez le singes on a une baisse par la dénervation normalisée par la L-dopa[463]
Nur77	ARNm	Induction par HAL, les animaux non dyskinétiques traités par HAL montrent une induction plus accrue, pas d'effet de la clozapine [présente étude]	induction par la L-dopa, induction plus importante chez les animaux non dyskinétiques dans certaines régions, corrélation négative avec les scores dyskinétiques dans certaines régions [438]

6. Perspectives

Au cours de cette étude nous avons établi un profil dopaminergique des DT. Pour compléter ce profil il serait important d'étudier l'expression des R-D4 (La CLZ montre une affinité supérieure à ce récepteur [92]). Nous planifions de réaliser une autoradiographie (et éventuellement une hybridation in situ) de ces récepteurs comme nous l'avons fait pour les autres récepteurs dopaminergiques. L'expression des récepteurs sérotoninergiques serait également fort pertinente vue la relation liant les APA à cette classe de récepteurs et aussi à cause du rôle des récepteurs 5-HT2 notamment dans la génération des LID [464]. Nous estimons qu'une autoradiographie de ces récepteurs ainsi qu'une hybridation in situ des ARNm pourraient apporter une réponse à nos questions quant aux changements de l'expression de ces récepteurs.

Nous pourrions explorer également l'expression des récepteurs de l'adénosine A2A, vue leur potentielle importance pour le mécanisme d'action des AP [465].

Nous devrions poursuivre notre étude aux cascades signalétiques qui peuvent être impliquées dans le mécanisme des AP telles que: les voies Arrestine-AKT-GSK3 ou CDK5 (pour cyclin-dependent kinase 5) et la voie DARPP-32 pour chercher une éventuelle hypersensibilisation fonctionnelle qui s'exprime par la sursimulation de ces cascades. La technique la mieux appropriée pour faire cette étude serait la technique de Western Blot.

Nous pourrions rechercher également les mécanismes qui peuvent conduire à l'induction de Nur77, en commençant premièrement par l'étude de la localisation cellulaire de ces récepteurs chez les primates qui ont servi à la présente étude (par hybridation in situ double). Plus loin, nous pouvons également exploiter un modèle de souris transgénique sur-exprimant le récepteur Nur77 via un vecteur viral contenant la protéine GFP (*Recombinant Adeno-Associated Virus type 5 containing Green Fluorescent Protein (rAAV5-GFP)*) pour élucider si la surexpression de Nur77 affecte le développement des mouvements anormaux.

Nous pensons également à étudier la relation qui peut lier Nur77 aux R-D3. Pour faire, une hybridation in situ double s'impose pour vérifier premièrement si l'expression de ces deux récepteurs se produit dans la même population neuronale.

Par ailleurs, notre étude peut ouvrir également le chemin aux études pharmacologiques pour tester l'effet d'antagonistes des R-D3 sur l'expression de DT chez notre modèle de primate. Nous pouvons également tester l'effet de telles molécules sur les souris Nur77 KO. On peut même envisager d'étudier de façon approfondie le phénomène de DT chez des souris R-D3 KO.

Les idées qui émanent de notre étude sont multiples et plusieurs voies techniques peuvent être sollicitées pour les explorer. Mais pour le moment, ce manuscrit met fin à ma contribution dans la recherche sur la DT. Mais, peut être, j' y reviendrais un jour...

Conclusion

Au gré des différents développements de ce travail et exploitant une grande banque de cerveaux de singes traités par des AP, nous avons tenté de réaliser une caractérisation pharmacologique et biochimique des plus complètes du profil dopaminergique des dyskinésies tardives.

Nous avons quantifié l'expression de trois des plus importants récepteurs dopaminergiques exprimés dans le caudé-putamen (les récepteurs D1, D2, et D3). Nous avons également évalué l'expression des transcrits de plusieurs marqueurs de la transmission dopaminergique (Nur77, enképhaline, substance P). De même, nous avons ciblé une cascade signalétique (ERK) pour sonder son activation en fonction de l'antipsychotique reçu. Finalement, nous avons abordé un volet génétique pour évaluer les répercussions de la variation génétique (polymorphisme) observée pour le gène de Nur77.

Les dyskinésies tardives induites par les traitements prolongés avec des antagonistes des récepteurs D2 comme nous l'avons décrit apparaissent comme le résultat d'une mauvaise adaptation des circuits neuronaux qui englobent les deux voies striatales et non pas la seule voie indirecte. Un trait caractéristique de cette mauvaise adaptation est l'augmentation de l'expression des récepteurs D3 dans la voie striatonigrale (directe) et de l'induction du récepteur nucléaire Nur77 pour lequel une variation génétique semble liée aux DT. Nous démontrons que l'hypersensibilisation des récepteurs D2 longuement revendiquée comme explication pour les DT, fait défaut dans notre cohorte et que l'expression des R-D1 est elle aussi affectée par le traitement antipsychotique. Il paraît alors au terme de cette étude que les dyskinésies tardives partagent un grand nombre de points communs avec un autre phénomène iatrogène causé par la manipulation des récepteurs dopaminergiques, à savoir les dyskinésies induites à la L-dopa.

Nous souhaitons apporter avec ces résultats une nouvelle explication de la physiopathologie des DT et supporter la pertinence de l'étude de ce phénomène dans un modèle primate non humain.

Annexe I

1. Localisation du SNP rs2603751 dans la région 3'-UTR du gène Nur77 humain

TTGACAAGATCTTCATGGACACGCTGCCCTTCTGACCCCTGCCTGGGAACACGTGTGCACATGC
GCACTCTCATATGCCACCCCATGTGCCTTTAGTCCACGGACCCCCAGAGCACCCCAAGCCTGG
GCTTGAGCTGCAGAATGACTCCACCTTCTCACCTGCTCCAGGAGGTTTGCAGGGAGCTCAAGC
CCTTGGGGAGGGGGATGCCTTCATGGGGGTGACCCACGATTTGTCTTATCCCCCAGCCTGG
CCCCGGCCTTATGTTTTTTGTAAGATAAACCGTTTTTAACACATAGCGCCGTGCTGTAAATA
AGCCCAGTGCTGCTGTAAATACAGGAAGAAAGAGCTTGAGGTGGGAGCGGGGCTGGGAGGAA
GGGATGGGCCCCGCCTTCCTGGGCAGCCTTCCAGCCTCCTGCTGGCTCTCTCTCCTACCCTC
CTTCCACATGTACATAAACTGTCACTCTAGGAAGAAGACAAATGACAGATTCTGACATTTATA
TTTGTGTATTTTTTATAGTATGTGACTTTTCTGATTAATATATTTAATATATTGAATAAAAA
ATAGACATGTAGT/CTGGAAGTCTGAGATTGAGTCTGTCTCTGATGCCCCCTCCCCACTCCCCAC
CAGACACACCCCATCATTACATAAGAGATGGGCTGCTCAAG

En rouge: l'allèle parental sauvage T

En vert: l'allèle muté C (SNP rs2603751)

2. Analyse des sites de liaison des mi-RNA (Microsom Targetv5, EMBL-EBI, Institut européen de Bioinformatique)

Nur77 (NR4A1)

```
3' CUUUGGGUCGUCUGUUACAUCGA 5' hsa-miR-221
   | |   | :||| | ||||| :|
5' AATAAAAAATAGAC-ATGTAGTT 3' NR4A1 human
5' AATAAAAAATAGAC-ATGTAGTT 3' NR4A1 mouse
5' AATAAAAAATAGAC-ATGTAGCT 3' NR4A1 mutant
```

Le polymorphisme étudié est localisée dans une séquence seed (en jaune) du miR-221 humain. La séquence ou région seed est une région de 6-8 nucléotides complémentaire à un microARN particulier et existant sur l'ARNm du gène cible à cet mi-ARN. La région seed détermine la spécificité et la nature de la liaison entre le mi-ARN et le gène cible. Rappelons que l'allèle muté C (ci indiqué en rouge) est associé à un risque plus élevé de dyskinésies tardives. En présence de cet allèle la région seed naturelle du mi-ARN 221

est parfaitement reconstruite ce qui devrait permettre une interaction optimale entre le mi-ARN en question et le gène Nur77.

Bibliographie

1. Albin, R.L., A.B. Young, and J.B. Penney, *The functional anatomy of basal ganglia disorders*. Trends Neurosci, 1989. **12**(10): p. 366-75.
2. Parent, A. and L.N. Hazrati, *Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry*. Brain Res Brain Res Rev, 1995. **20**(1): p. 128-54.
3. Obeso, J.A., et al., *Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease*. Mov Disord, 2008. **23 Suppl 3**: p. S548-59.
4. Graybiel, A.M., *The basal ganglia*. Curr Biol, 2000. **10**(14): p. R509-11.
5. Herrero, M.T., C. Barcia, and J.M. Navarro, *Functional anatomy of thalamus and basal ganglia*. Childs Nerv Syst, 2002. **18**(8): p. 386-404.
6. Steiner, H. and K.-Y. Tseng, *Handbook of basal ganglia structure and function*. 2010, Amsterdam: Elsevier/Academic Press. 1 texte électronique.
7. DeLong, M.R., *Primate models of movement disorders of basal ganglia origin*. Trends Neurosci, 1990. **13**(7): p. 281-5.
8. Graybiel, A.M., *Habits, rituals, and the evaluative brain*. Annu Rev Neurosci, 2008. **31**: p. 359-87.
9. Graybiel, A.M., *Building action repertoires: memory and learning functions of the basal ganglia*. Curr Opin Neurobiol, 1995. **5**(6): p. 733-41.
10. Parent, A. and L.N. Hazrati, *Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop*. Brain Res Brain Res Rev, 1995. **20**(1): p. 91-127.
11. Haber, S.N. and R. Calzavara, *The cortico-basal ganglia integrative network: the role of the thalamus*. Brain Res Bull, 2009. **78**(2-3): p. 69-74.
12. Borsook, D., et al., *A key role of the basal ganglia in pain and analgesia--insights gained through human functional imaging*. Mol Pain, 2010. **6**: p. 27.
13. Schultz, W., L. Tremblay, and J.R. Hollerman, *Reward processing in primate orbitofrontal cortex and basal ganglia*. Cereb Cortex, 2000. **10**(3): p. 272-84.
14. Haber, S.N., *The primate basal ganglia: parallel and integrative networks*. J Chem Neuroanat, 2003. **26**(4): p. 317-30.
15. Kreitzer, A.C., *Physiology and pharmacology of striatal neurons*. Annu Rev Neurosci, 2009. **32**: p. 127-47.
16. Paxinos, G., *The rhesus monkey brain in stereotaxic coordinates*. 2nd ed. 2009, Amsterdam ; Boston ; London: Academic. 410 p., chiefly plates.
17. Kawaguchi, Y., *Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum*. J Neurosci, 1993. **13**(11): p. 4908-23.
18. Kubota, Y. and Y. Kawaguchi, *Three classes of GABAergic interneurons in neocortex and neostriatum*. Jpn J Physiol, 1994. **44 Suppl 2**: p. S145-8.
19. Bennett, B.D. and J.P. Bolam, *Synaptic input and output of parvalbumin-immunoreactive neurons in the neostriatum of the rat*. Neuroscience, 1994. **62**(3): p. 707-19.
20. Chesselet, M.F. and A.M. Graybiel, *Striatal neurons expressing somatostatin-like immunoreactivity: evidence for a peptidergic interneuronal system in the cat*. Neuroscience, 1986. **17**(3): p. 547-71.

21. Kubota, Y., S. Mikawa, and Y. Kawaguchi, *Neostriatal GABAergic interneurons contain NOS, calretinin or parvalbumin*. Neuroreport, 1993. **5**(3): p. 205-8.
22. Bolam, J.P., B.H. Wainer, and A.D. Smith, *Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum. A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi-impregnation and electron microscopy*. Neuroscience, 1984. **12**(3): p. 711-8.
23. Tepper, J.M. and J.P. Bolam, *Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons*. Curr Opin Neurobiol, 2004. **14**(6): p. 685-92.
24. Wilson, C.J. and Y. Kawaguchi, *The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons*. J Neurosci, 1996. **16**(7): p. 2397-410.
25. Day, M., et al., *Differential excitability and modulation of striatal medium spiny neuron dendrites*. J Neurosci, 2008. **28**(45): p. 11603-14.
26. Surmeier, D.J., et al., *D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons*. Trends Neurosci, 2007. **30**(5): p. 228-35.
27. Jerome, M., *Mécanismes cellulaires de l'induction du facteur de transcription Nur77 après un traitement aux antipsychotiques*, in Faculte de Pharmacie. 2012, Universite de Montreal.
28. Kreitzer, A.C. and R.C. Malenka, *Striatal plasticity and basal ganglia circuit function*. Neuron, 2008. **60**(4): p. 543-54.
29. Hersch, S.M., et al., *Electron microscopic analysis of D1 and D2 dopamine receptor proteins in the dorsal striatum and their synaptic relationships with motor corticostriatal afferents*. J Neurosci, 1995. **15**(7 Pt 2): p. 5222-37.
30. Surmeier, D.J., W.J. Song, and Z. Yan, *Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons*. J Neurosci, 1996. **16**(20): p. 6579-91.
31. Wilson, C.J. and P.M. Groves, *Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular inject of horseradish peroxidase*. J Comp Neurol, 1980. **194**(3): p. 599-615.
32. Levy, R., et al., *Re-evaluation of the functional anatomy of the basal ganglia in normal and Parkinsonian states*. Neuroscience, 1997. **76**(2): p. 335-43.
33. Obeso, J.A., M.C. Rodriguez, and M.R. DeLong, *Basal ganglia pathophysiology. A critical review*. Adv Neurol, 1997. **74**: p. 3-18.
34. Wichmann, T. and M.R. DeLong, *Functional and pathophysiological models of the basal ganglia*. Curr Opin Neurobiol, 1996. **6**(6): p. 751-8.
35. Parent, A., M. Levesque, and M. Parent, *A re-evaluation of the current model of the basal ganglia*. Parkinsonism Relat Disord, 2001. **7**(3): p. 193-198.
36. Prensa, L. and A. Parent, *The nigrostriatal pathway in the rat: A single-axon study of the relationship between dorsal and ventral tier nigral neurons and the striosome/matrix striatal compartments*. J Neurosci, 2001. **21**(18): p. 7247-60.
37. Bertran-Gonzalez, J., et al., *Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol*. J Neurosci, 2008. **28**(22): p. 5671-85.
38. DeLong, M. and T. Wichmann, *Update on models of basal ganglia function and dysfunction*. Parkinsonism Relat Disord, 2009. **15 Suppl 3**: p. S237-40.
39. Cui, G., et al., *Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation*. Nature, 2013. **494**(7436): p. 238-42.
40. Moore, R.Y. and F.E. Bloom, *Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the dopamine systems*. Annu Rev Neurosci, 1978. **1**: p. 129-69.
41. Fahn, S., *The history of dopamine and levodopa in the treatment of Parkinson's disease*. Mov Disord, 2008. **23 Suppl 3**: p. S497-508.

42. Carlsson, A., *Detection and assay of dopamine*. Pharmacol Rev, 1959. **11**(2, Part 2): p. 300-4.
43. Carlsson, A., *Evidence for a Role of Dopamine in Extrapyramidal Functions*. Acta Neuroveg (Wien), 1964. **26**: p. 484-93.
44. Carlsson, A., *Some aspects of dopamine in the central nervous system*. Adv Neurol, 1974. **5**: p. 59-68.
45. Hornykiewicz, O., *Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function*. Pharmacol Rev, 1966. **18**(2): p. 925-64.
46. Nagatsu, T., M. Levitt, and S. Udenfriend, *Tyrosine Hydroxylase. The Initial Step in Norepinephrine Biosynthesis*. J Biol Chem, 1964. **239**: p. 2910-7.
47. Weihe, E., et al., *Localization of vesicular monoamine transporter isoforms (VMAT1 and VMAT2) to endocrine cells and neurons in rat*. J Mol Neurosci, 1994. **5**(3): p. 149-64.
48. Grace, A.A., *Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia*. Neuroscience, 1991. **41**(1): p. 1-24.
49. Schultz, W., *Predictive reward signal of dopamine neurons*. J Neurophysiol, 1998. **80**(1): p. 1-27.
50. Grace, A.A., *The tonic/phasic model of dopamine system regulation: its relevance for understanding how stimulant abuse can alter basal ganglia function*. Drug Alcohol Depend, 1995. **37**(2): p. 111-29.
51. Leviel, V., *Dopamine release mediated by the dopamine transporter, facts and consequences*. J Neurochem, 2011. **118**(4): p. 475-89.
52. Jaber, M., et al., *The dopamine transporter: a crucial component regulating dopamine transmission*. Mov Disord, 1997. **12**(5): p. 629-33.
53. Chinta, S.J. and J.K. Andersen, *Dopaminergic neurons*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(5): p. 942-6.
54. Ko, J.H. and A.P. Strafella, *Dopaminergic neurotransmission in the human brain: new lessons from perturbation and imaging*. Neuroscientist, 2012. **18**(2): p. 149-68.
55. Wickens, J., *Striatal dopamine in motor activation and reward-mediated learning: steps towards a unifying model*. J Neural Transm Gen Sect, 1990. **80**(1): p. 9-31.
56. Schultz, W., *Multiple dopamine functions at different time courses*. Annu Rev Neurosci, 2007. **30**: p. 259-88.
57. Schultz, W., *Behavioral dopamine signals*. Trends Neurosci, 2007. **30**(5): p. 203-10.
58. Rice, M.E., J.C. Patel, and S.J. Cragg, *Dopamine release in the basal ganglia*. Neuroscience, 2011. **198**: p. 112-37.
59. Kaiya, H. and M. Namba, *Two types of dopaminergic nerve terminals in the rat neostriatum. An ultrastructural study*. Neurosci Lett, 1981. **25**(3): p. 251-6.
60. Peters, A. and S.L. Palay, *The morphology of synapses*. J Neurocytol, 1996. **25**(12): p. 687-700.
61. Fuxe, K., et al., *Computer-assisted image analysis techniques allow a characterization of the compartments within the basal ganglia. Focus on functional compartments produced by d-amphetamine activation of the c-fos gene and its relationship to the glucocorticoid receptor*. J Chem Neuroanat, 1991. **4**(5): p. 355-72.
62. Greengard, P., *The neurobiology of slow synaptic transmission*. Science, 2001. **294**(5544): p. 1024-30.
63. Beaulieu, J.M. and R.R. Gainetdinov, *The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors*. Pharmacol Rev, 2011. **63**(1): p. 182-217.
64. Missale, C., et al., *Dopamine receptors: from structure to function*. Physiol Rev, 1998. **78**(1): p. 189-225.

65. Vallone, D., R. Picetti, and E. Borrelli, *Structure and function of dopamine receptors*. *Neurosci Biobehav Rev*, 2000. **24**(1): p. 125-32.
66. Spano, P.F., S. Govoni, and M. Trabucchi, *Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system*. *Adv Biochem Psychopharmacol*, 1978. **19**: p. 155-65.
67. Niznik, H.B. and H.H.M. Vantol, *Dopamine Receptor Genes - New Tools for Molecular Psychiatry*. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 1992. **17**(4): p. 158-180.
68. Gingrich, J.A. and M.G. Caron, *Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors*. *Annu Rev Neurosci*, 1993. **16**: p. 299-321.
69. Rankin, M.L. and D.R. Sibley, *Constitutive phosphorylation by protein kinase C regulates D1 dopamine receptor signaling*. *J Neurochem*, 2010. **115**(6): p. 1655-67.
70. Gerfen, C.R., *Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways*. *Trends Neurosci*, 2000. **23**(10 Suppl): p. S64-70.
71. Choi, W.S., C.A. Machida, and O.K. Ronnekleiv, *Distribution of dopamine D1, D2, and D5 receptor mRNAs in the monkey brain: ribonuclease protection assay analysis*. *Brain Res Mol Brain Res*, 1995. **31**(1-2): p. 86-94.
72. Morissette, M., et al., *Changes of D1 and D2 dopamine receptor mRNA in the brains of monkeys lesioned with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: correction with chronic administration of L-3,4-dihydroxyphenylalanine*. *Mol Pharmacol*, 1996. **50**(5): p. 1073-9.
73. Levey, A.I., et al., *Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(19): p. 8861-5.
74. Bergson, C., et al., *Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain*. *J Neurosci*, 1995. **15**(12): p. 7821-36.
75. Neve, K.A., J.K. Seamans, and H. Trantham-Davidson, *Dopamine receptor signaling*. *J Recept Signal Transduct Res*, 2004. **24**(3): p. 165-205.
76. Fienberg, A.A., et al., *DARPP-32: Regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission*. *Science*, 1998. **281**(5378): p. 838-+.
77. Svenningsson, P., et al., *DARPP-32: an integrator of neurotransmission*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2004. **44**: p. 269-96.
78. Nestler, E.J., *Cellular-Responses to Chronic Treatment with Drugs of Abuse*. *Critical Reviews in Neurobiology*, 1993. **7**(1): p. 23-39.
79. Nestler, E.J. and G.K. Aghajanian, *Molecular and cellular basis of addiction*. *Science*, 1997. **278**(5335): p. 58-63.
80. Friedman, E., et al., *D1-like dopaminergic activation of phosphoinositide hydrolysis is independent of D1A dopamine receptors: evidence from D1A knockout mice*. *Mol Pharmacol*, 1997. **51**(1): p. 6-11.
81. Sahu, A., et al., *D5 dopamine receptors are required for dopaminergic activation of phospholipase C*. *Mol Pharmacol*, 2009. **75**(3): p. 447-53.
82. Holmes, A., J.E. Lachowicz, and D.R. Sibley, *Phenotypic analysis of dopamine receptor knockout mice; recent insights into the functional specificity of dopamine receptor subtypes*. *Neuropharmacology*, 2004. **47**(8): p. 1117-34.
83. Drago, J., et al., *Altered striatal function in a mutant mouse lacking D1A dopamine receptors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(26): p. 12564-8.
84. Girault, J.A., *Signaling in striatal neurons: the phosphoproteins of reward, addiction, and dyskinesia*. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2012. **106**: p. 33-62.
85. Karlsson, R.M., et al., *Comparison of dopamine D1 and D5 receptor knockout mice for cocaine locomotor sensitization*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2008. **200**(1): p. 117-27.

86. Centonze, D., et al., *Distinct roles of D1 and D5 dopamine receptors in motor activity and striatal synaptic plasticity*. J Neurosci, 2003. **23**(24): p. 8506-12.
87. Elliot, E.E., D.R. Sibley, and J.L. Katz, *Locomotor and discriminative-stimulus effects of cocaine in dopamine D5 receptor knockout mice*. Psychopharmacology (Berl), 2003. **169**(2): p. 161-8.
88. Picetti, R., et al., *Dopamine D2 receptors in signal transduction and behavior*. Crit Rev Neurobiol, 1997. **11**(2-3): p. 121-42.
89. Giros, B., et al., *Shorter variants of the D3 dopamine receptor produced through various patterns of alternative splicing*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. **176**(3): p. 1584-92.
90. Van Tol, H.H., et al., *Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine*. Nature, 1991. **350**(6319): p. 610-4.
91. Van Tol, H.H., et al., *Multiple dopamine D4 receptor variants in the human population*. Nature, 1992. **358**(6382): p. 149-52.
92. Wong, A.H. and H.H. Van Tol, *The dopamine D4 receptors and mechanisms of antipsychotic atypicality*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2003. **27**(7): p. 1091-9.
93. Sibley, D.R., et al., *Molecular neurobiology of dopamine receptor subtypes*. Neurochem Int, 1992. **20 Suppl**: p. 17S-22S.
94. Usiello, A., et al., *Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors*. Nature, 2000. **408**(6809): p. 199-203.
95. Quik, M., et al., *Expression of D(3) receptor messenger RNA and binding sites in monkey striatum and substantia nigra after nigrostriatal degeneration: effect of levodopa treatment*. Neuroscience, 2000. **98**(2): p. 263-73.
96. Hurley, M.J., et al., *D3 receptor expression within the basal ganglia is not affected by Parkinson's disease*. Neurosci Lett, 1996. **214**(2-3): p. 75-8.
97. Rondou, P., G. Haegeman, and K. Van Craenenbroeck, *The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(12): p. 1971-86.
98. Gazi, L., S.A. Nickolls, and P.G. Strange, *Functional coupling of the human dopamine D2 receptor with G alpha i1, G alpha i2, G alpha i3 and G alpha o G proteins: evidence for agonist regulation of G protein selectivity*. Br J Pharmacol, 2003. **138**(5): p. 775-86.
99. Nickolls, S.A. and P.G. Strange, *Interaction of the D2short dopamine receptor with G proteins: analysis of receptor/G protein selectivity*. Biochem Pharmacol, 2003. **65**(7): p. 1139-50.
100. Obadiah, J., et al., *Adenylyl cyclase interaction with the D2 dopamine receptor family; differential coupling to Gi, Gz, and Gs*. Cell Mol Neurobiol, 1999. **19**(5): p. 653-64.
101. Yamaguchi, I., et al., *The rat D4 dopamine receptor couples to cone transducin (Galphat2) to inhibit forskolin-stimulated cAMP accumulation*. J Biol Chem, 1997. **272**(26): p. 16599-602.
102. Robinson, S.W. and M.G. Caron, *Selective inhibition of adenylyl cyclase type V by the dopamine D3 receptor*. Mol Pharmacol, 1997. **52**(3): p. 508-14.
103. Nishi, A., G.L. Snyder, and P. Greengard, *Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine*. J Neurosci, 1997. **17**(21): p. 8147-55.
104. Lindgren, N., et al., *Dopamine D(2) receptors regulate tyrosine hydroxylase activity and phosphorylation at Ser40 in rat striatum*. Eur J Neurosci, 2001. **13**(4): p. 773-80.
105. Kuzhikandathil, E.V., W. Yu, and G.S. Oxford, *Human dopamine D3 and D2L receptors couple to inward rectifier potassium channels in mammalian cell lines*. Mol Cell Neurosci, 1998. **12**(6): p. 390-402.
106. Sibley, D.R., *New insights into dopaminergic receptor function using antisense and genetically altered animals*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1999. **39**: p. 313-41.
107. Anden, N.E., et al., *Functional role of the nigro-neostriatal dopamine neurons*. Acta Pharmacol Toxicol (Copenh), 1966. **24**(2): p. 263-74.

108. Matsuda, W., et al., *Single nigrostriatal dopaminergic neurons form widely spread and highly dense axonal arborizations in the neostriatum*. J Neurosci, 2009. **29**(2): p. 444-53.
109. Prensa, L., M. Cossette, and A. Parent, *Dopaminergic innervation of human basal ganglia*. J Chem Neuroanat, 2000. **20**(3-4): p. 207-13.
110. Yung, K.K., et al., *Immunocytochemical localization of D1 and D2 dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: light and electron microscopy*. Neuroscience, 1995. **65**(3): p. 709-30.
111. Cragg, S.J. and M.E. Rice, *Dancing past the DAT at a DA synapse*. Trends Neurosci, 2004. **27**(5): p. 270-7.
112. Yan, Z. and D.J. Surmeier, *D5 dopamine receptors enhance Zn²⁺-sensitive GABA(A) currents in striatal cholinergic interneurons through a PKA/PP1 cascade*. Neuron, 1997. **19**(5): p. 1115-26.
113. Yan, Z., W.J. Song, and J. Surmeier, *D2 dopamine receptors reduce N-type Ca²⁺ currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a membrane-delimited, protein-kinase-C-insensitive pathway*. J Neurophysiol, 1997. **77**(2): p. 1003-15.
114. Richfield, E.K., A.B. Young, and J.B. Penney, *Comparative distributions of dopamine D-1 and D-2 receptors in the cerebral cortex of rats, cats, and monkeys*. J Comp Neurol, 1989. **286**(4): p. 409-26.
115. Wickens, J.R. and C.J. Wilson, *Regulation of action-potential firing in spiny neurons of the rat neostriatum in vivo*. J Neurophysiol, 1998. **79**(5): p. 2358-64.
116. Cepeda, C., N.A. Buchwald, and M.S. Levine, *Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(20): p. 9576-80.
117. Hernandez-Lopez, S., et al., *D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLC[β]₁-IP₃-calcineurin-signaling cascade*. J Neurosci, 2000. **20**(24): p. 8987-95.
118. Bamford, N.S., et al., *Dopamine modulates release from corticostriatal terminals*. J Neurosci, 2004. **24**(43): p. 9541-52.
119. Greif, G.J., et al., *Dopamine-modulated potassium channels on rat striatal neurons: specific activation and cellular expression*. J Neurosci, 1995. **15**(6): p. 4533-44.
120. Hakansson, K., et al., *Regulation of phosphorylation of the GluR1 AMPA receptor by dopamine D2 receptors*. J Neurochem, 2006. **96**(2): p. 482-8.
121. Malenka, R.C., *Intercellular Communication in the Nervous System*. Intercellular Communication in the Nervous System, ed. R.C. Malenka. 2009: Elsevier Publications.
122. Smith, Y., et al., *The thalamostriatal system: a highly specific network of the basal ganglia circuitry*. Trends Neurosci, 2004. **27**(9): p. 520-7.
123. Riedel, G., B. Platt, and J. Micheau, *Glutamate receptor function in learning and memory*. Behav Brain Res, 2003. **140**(1-2): p. 1-47.
124. Dingledine, R., et al., *The glutamate receptor ion channels*. Pharmacol Rev, 1999. **51**(1): p. 7-61.
125. Nowak, L., et al., *Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones*. Nature, 1984. **307**(5950): p. 462-5.
126. Niswender, C.M. and P.J. Conn, *Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2010. **50**: p. 295-322.
127. Michaelis, E.K., *Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging*. Prog Neurobiol, 1998. **54**(4): p. 369-415.
128. Standaert, D.G., et al., *Organization of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor gene expression in the basal ganglia of the rat*. J Comp Neurol, 1994. **343**(1): p. 1-16.

129. Paquet, M. and Y. Smith, *Group I metabotropic glutamate receptors in the monkey striatum: subsynaptic association with glutamatergic and dopaminergic afferents*. J Neurosci, 2003. **23**(20): p. 7659-69.
130. Rothstein, J.D., et al., *Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate*. Neuron, 1996. **16**(3): p. 675-86.
131. Ribeiro, F.M., R.G. Pires, and S.S. Ferguson, *Huntington's disease and Group I metabotropic glutamate receptors*. Mol Neurobiol, 2011. **43**(1): p. 1-11.
132. Zahr, N.M., et al., *Low striatal glutamate levels underlie cognitive decline in the elderly: evidence from in vivo molecular spectroscopy*. Cereb Cortex, 2008. **18**(10): p. 2241-50.
133. White, S.L., et al., *Acute cocaine increases phosphorylation of CaMKII and GluA1 in the dorsolateral striatum of drug naive rats, but not cocaine-experienced rats*. Neurosci Lett, 2013. **537**: p. 71-6.
134. Gregory, K.J., M.J. Noetzel, and C.M. Niswender, *Pharmacology of metabotropic glutamate receptor allosteric modulators: structural basis and therapeutic potential for CNS disorders*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2013. **115**: p. 61-121.
135. Calabresi, P., et al., *Long-term Potentiation in the Striatum is Unmasked by Removing the Voltage-dependent Magnesium Block of NMDA Receptor Channels*. Eur J Neurosci, 1992. **4**(10): p. 929-935.
136. Calabresi, P., et al., *Long-term synaptic depression in the striatum: physiological and pharmacological characterization*. J Neurosci, 1992. **12**(11): p. 4224-33.
137. Partridge, J.G., K.C. Tang, and D.M. Lovinger, *Regional and postnatal heterogeneity of activity-dependent long-term changes in synaptic efficacy in the dorsal striatum*. J Neurophysiol, 2000. **84**(3): p. 1422-9.
138. Wickens, J.R., *Synaptic plasticity in the basal ganglia*. Behav Brain Res, 2009. **199**(1): p. 119-28.
139. Bear, M.F. and R.C. Malenka, *Synaptic plasticity: LTP and LTD*. Curr Opin Neurobiol, 1994. **4**(3): p. 389-99.
140. Citri, A. and R.C. Malenka, *Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms*. Neuropsychopharmacology, 2008. **33**(1): p. 18-41.
141. Di Filippo, M., et al., *Short-term and long-term plasticity at corticostriatal synapses: implications for learning and memory*. Behav Brain Res, 2009. **199**(1): p. 108-18.
142. Suzuki, T., et al., *Dopamine-dependent synaptic plasticity in the striatal cholinergic interneurons*. J Neurosci, 2001. **21**(17): p. 6492-501.
143. Lovinger, D.M., *Neurotransmitter roles in synaptic modulation, plasticity and learning in the dorsal striatum*. Neuropharmacology, 2010. **58**(7): p. 951-61.
144. Gejman, P.V., A.R. Sanders, and K.S. Kendler, *Genetics of schizophrenia: new findings and challenges*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2011. **12**: p. 121-44.
145. McGlashan, T.H. and R.E. Hoffman, *Schizophrenia as a disorder of developmentally reduced synaptic connectivity*. Arch Gen Psychiatry, 2000. **57**(7): p. 637-48.
146. Mueser, K.T. and S.R. McGurk, *Schizophrenia*. Lancet, 2004. **363**(9426): p. 2063-72.
147. Ochoa, S., et al., *Gender differences in schizophrenia and first-episode psychosis: a comprehensive literature review*. Schizophr Res Treatment, 2012. **2012**: p. 916198.
148. McGrath, J.J., *Variations in the incidence of schizophrenia: data versus dogma*. Schizophr Bull, 2006. **32**(1): p. 195-7.
149. Goldstein, J.M., M.T. Tsuang, and S.V. Faraone, *Gender and schizophrenia: implications for understanding the heterogeneity of the illness*. Psychiatry Res, 1989. **28**(3): p. 243-53.

150. Crow, T.J. and E.C. Johnstone, *Dementia praecox and schizophrenia: was Bleuler wrong?* J R Coll Physicians Lond, 1980. **14**(4): p. 238, 240.
151. van Os, J. and S. Kapur, *Schizophrenia*. Lancet, 2009. **374**(9690): p. 635-45.
152. Ross, C.A., et al., *Neurobiology of schizophrenia*. Neuron, 2006. **52**(1): p. 139-53.
153. DiPiro, J.T., *Pharmacotherapy : a pathophysiologic approach*. 8th ed. 2011, New York ; Toronto: McGraw-Hill Medical. xxxii, 2668.
154. Harrison, P.J., *The neuropathological effects of antipsychotic drugs*. Schizophr Res, 1999. **40**(2): p. 87-99.
155. Howes, O.D. and S. Kapur, *The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III--the final common pathway*. Schizophr Bull, 2009. **35**(3): p. 549-62.
156. Ehringer, H. and O. Hornykiewicz, *[Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]*. Klin Wochenschr, 1960. **38**: p. 1236-9.
157. Carlsson, A. and M. Lindqvist, *Effect of Chlorpromazine or Haloperidol on Formation of 3methoxytyramine and Normetanephrine in Mouse Brain*. Acta Pharmacol Toxicol (Copenh), 1963. **20**: p. 140-4.
158. van Rossum, J.M., *[Drug receptor theory as a basis of the action of drugs. Possibilities and limitations]*. Arzneimittelforschung, 1966. **16**(11): p. 1412-26.
159. Seeman, P., *Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia*. Synapse, 1987. **1**(2): p. 133-52.
160. Seeman, P., *Antipsychotic drugs, dopamine receptors, and schizophrenia*. Clinical Neuroscience Research, 2001. **1**(1-2): p. 53-60.
161. Seeman, P., et al., *Brain receptors for antipsychotic drugs and dopamine: direct binding assays*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(11): p. 4376-80.
162. Davis, K.L., et al., *Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization*. Am J Psychiatry, 1991. **148**(11): p. 1474-86.
163. Murray, R.M. and S.W. Lewis, *Is schizophrenia a neurodevelopmental disorder?* Br Med J (Clin Res Ed), 1987. **295**(6600): p. 681-2.
164. Weinberger, D.R., *Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia*. Arch Gen Psychiatry, 1987. **44**(7): p. 660-9.
165. Granger, B., *[Synaptogenesis and synaptic pruning: role in triggering schizophrenia]*. Presse Med, 1996. **25**(33): p. 1595-8.
166. Narr, K., et al., *Three-dimensional mapping of gyral shape and cortical surface asymmetries in schizophrenia: gender effects*. Am J Psychiatry, 2001. **158**(2): p. 244-55.
167. Pantelis, C., et al., *Early and late neurodevelopmental disturbances in schizophrenia and their functional consequences*. Aust N Z J Psychiatry, 2003. **37**(4): p. 399-406.
168. Vogeley, K., et al., *Disturbed gyrification of the prefrontal region in male schizophrenic patients: A morphometric postmortem study*. Am J Psychiatry, 2000. **157**(1): p. 34-9.
169. Murray, R.M., J. Lappin, and M. Di Forti, *Schizophrenia: from developmental deviance to dopamine dysregulation*. Eur Neuropsychopharmacol, 2008. **18 Suppl 3**: p. S129-34.
170. Benes, F.M., *Myelination of cortical-hippocampal relays during late adolescence*. Schizophr Bull, 1989. **15**(4): p. 585-93.
171. Guillin, O., A. Abi-Dargham, and M. Laruelle, *Neurobiology of dopamine in schizophrenia*. Int Rev Neurobiol, 2007. **78**: p. 1-39.
172. Moghaddam, B. and D. Javitt, *From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment*. Neuropsychopharmacology, 2012. **37**(1): p. 4-15.

173. Luby, E.D., et al., *Model psychoses and schizophrenia*. Am J Psychiatry, 1962. **119**: p. 61-7.
174. Itil, T., et al., *Effect of phencyclidine in chronic schizophrenics*. Can Psychiatr Assoc J, 1967. **12**(2): p. 209-12.
175. Zukin, S.R. and R.S. Zukin, *Specific [3H]phencyclidine binding in rat central nervous system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(10): p. 5372-6.
176. Anis, N.A., et al., *The dissociative anaesthetics, ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurones by N-methyl-aspartate*. Br J Pharmacol, 1983. **79**(2): p. 565-75.
177. Javitt, D.C. and S.R. Zukin, *Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia*. Am J Psychiatry, 1991. **148**(10): p. 1301-8.
178. Carlsson, M. and A. Carlsson, *The NMDA antagonist MK-801 causes marked locomotor stimulation in monoamine-depleted mice*. J Neural Transm, 1989. **75**(3): p. 221-6.
179. Coyle, J.T., et al., *Glutamatergic synaptic dysregulation in schizophrenia: therapeutic implications*. Handb Exp Pharmacol, 2012(213): p. 267-95.
180. Chumakov, I., et al., *Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(21): p. 13675-80.
181. Numakawa, T., et al., *Evidence of novel neuronal functions of dysbindin, a susceptibility gene for schizophrenia*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(21): p. 2699-708.
182. Mei, L. and W.C. Xiong, *Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia*. Nat Rev Neurosci, 2008. **9**(6): p. 437-52.
183. Li, D. and L. He, *Association study between the NMDA receptor 2B subunit gene (GRIN2B) and schizophrenia: a HuGE review and meta-analysis*. Genet Med, 2007. **9**(1): p. 4-8.
184. Labrie, V. and J.C. Roder, *The involvement of the NMDA receptor D-serine/glycine site in the pathophysiology and treatment of schizophrenia*. Neurosci Biobehav Rev, 2010. **34**(3): p. 351-72.
185. Nestler, E.J. and S.E. Hyman, *Animal models of neuropsychiatric disorders*. Nat Neurosci, 2010. **13**(10): p. 1161-9.
186. Lazar, N.L., R.W. Neufeld, and D.P. Cain, *Contribution of nonprimate animal models in understanding the etiology of schizophrenia*. J Psychiatry Neurosci, 2011. **36**(4): p. E5-29.
187. Jones, C.A., D.J. Watson, and K.C. Fone, *Animal models of schizophrenia*. Br J Pharmacol, 2011. **164**(4): p. 1162-94.
188. Mouri, A., et al., *Animal models of schizophrenia for molecular and pharmacological intervention and potential candidate molecules*. Neurobiol Dis, 2013. **53**: p. 61-74.
189. Lipska, B.K., *Using animal models to test a neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia*. J Psychiatry Neurosci, 2004. **29**(4): p. 282-6.
190. Grunder, G., H. Hippus, and A. Carlsson, *The 'atypicality' of antipsychotics: a concept re-examined and re-defined*. Nat Rev Drug Discov, 2009. **8**(3): p. 197-202.
191. Laborit, H., *[Some precautions in neuroleptic therapy with chlorpromazine (R.P. 4560 or largactil)]*. Therapie, 1954. **9**(3): p. 302-11.
192. Laborit, H. and F. Brue, *[Attempted metabolic interpretation of the action of hexamethonium, hydergine, yohimbine, F-933, chlorpromazine and caffeine on the isolated artery segment and intestine of the rabbit]*. Agressologie, 1962. **3**: p. 344-51.
193. Delay, J. and P. Deniker, *Neuroleptic effects of chlorpromazine in therapeutics of neuropsychiatry*. Int Rec Med Gen Pract Clin, 1955. **168**(5): p. 318-26.
194. Shen, W.W., *A history of antipsychotic drug development*. Compr Psychiatry, 1999. **40**(6): p. 407-14.

195. Sigwald, J., D. Bouttier, and P. Nicolas-Charles, *Ambulatory treatment with chlorpromazine*. J Clin Exp Psychopathol, 1956. **17**(1): p. 57-69.
196. Kirkiacharian, S., *Guide de chimie médicinale et médicaments : conception, structure, synthèse, pharmacochimie, mode d'action et activité des médicaments*. 2010, Paris

Cachan: Éd. Tec & doc ;

Éd. médicales internationales. xxi, 869.

197. Repchinsky, C. and Association des pharmaciens du Canada., *Therapeutic choices*. 6th ed. 2011, Ottawa: Canadian Pharmacists Association. xxvii, 1872.
198. Buschmann, H., *Antidepressants, antipsychotics, anxiolytics : from chemistry and pharmacology to clinical application*. 2007, Weinheim: Wiley-VCH. 2 v. (xlv,1214.
199. Kapsambelis, V., C. Gekiere, and D. Ginestet, [*Clinical classification of neuroleptics. Critical study and current prospects*]. Encephale, 1990. **16**(2): p. 63-70.
200. Olié, J.-P., T. Gallarda, and E. Duaux, *Psychiatrie. Le Livre de l'interne*,. 2000, Paris: Flammarion/Médecine-Sciences. xiii, 442.
201. Davis, J.M., *Dose equivalence of the antipsychotic drugs*. J Psychiatr Res, 1974. **11**: p. 65-9.
202. Allison, D.B., et al., *Obesity among those with mental disorders: a National Institute of Mental Health meeting report*. Am J Prev Med, 2009. **36**(4): p. 341-50.
203. Roerig, J.L., K.J. Steffen, and J.E. Mitchell, *Atypical antipsychotic-induced weight gain: insights into mechanisms of action*. CNS Drugs, 2011. **25**(12): p. 1035-59.
204. Stigler, K.A., et al., *Weight gain associated with atypical antipsychotic use in children and adolescents: prevalence, clinical relevance, and management*. Paediatr Drugs, 2004. **6**(1): p. 33-44.
205. Allison, D.B., et al., *Antipsychotic-induced weight gain: a comprehensive research synthesis*. Am J Psychiatry, 1999. **156**(11): p. 1686-96.
206. Bobes, J., et al., *Frequency of sexual dysfunction and other reproductive side-effects in patients with schizophrenia treated with risperidone, olanzapine, quetiapine, or haloperidol: the results of the EIRE study*. J Sex Marital Ther, 2003. **29**(2): p. 125-47.
207. Caroff, S.N., et al., *Movement disorders induced by antipsychotic drugs: implications of the CATIE schizophrenia trial*. Neurol Clin, 2011. **29**(1): p. 127-48, viii.
208. Kapur, S., *How antipsychotics become anti-"psychotic"--from dopamine to salience to psychosis*. Trends Pharmacol Sci, 2004. **25**(8): p. 402-6.
209. Miyamoto, S., et al., *Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs*. Mol Psychiatry, 2005. **10**(1): p. 79-104.
210. Seeman, P., et al., *Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors*. Nature, 1976. **261**(5562): p. 717-9.
211. Farde, L. and A.L. Nordstrom, *PET examination of central D2 dopamine receptor occupancy in relation to extrapyramidal syndromes in patients being treated with neuroleptic drugs*. Psychopharmacol Ser, 1993. **10**: p. 94-100.
212. Raleigh, F., *Use of novel antipsychotic drugs*. Pharmacotherapy, 1996. **16**(6 Pt 2): p. 160S-165S; discussion 166S-168S.
213. Farde, L., *The advantage of using positron emission tomography in drug research*. Trends Neurosci, 1996. **19**(6): p. 211-4.
214. Farde, L., et al., *Positron emission tomographic analysis of central D1 and D2 dopamine receptor occupancy in patients treated with classical neuroleptics and clozapine. Relation to extrapyramidal side effects*. Arch Gen Psychiatry, 1992. **49**(7): p. 538-44.

215. Kapur, S., et al., *The D2 dopamine receptor occupancy of risperidone and its relationship to extrapyramidal symptoms: a PET study*. Life Sci, 1995. **57**(10): p. PL103-7.
216. Kessler, R.M., et al., *Identification of extrastriatal dopamine D2 receptors in post mortem human brain with [125I]epidepride*. Brain Res, 1993. **609**(1-2): p. 237-43.
217. Vandehey, N.T., et al., *High-affinity dopamine D2/D3 PET radioligands 18F-fallypride and 11C-FLB457: a comparison of kinetics in extrastriatal regions using a multiple-injection protocol*. J Cereb Blood Flow Metab, 2010. **30**(5): p. 994-1007.
218. Agid, O., et al., *Striatal vs extrastriatal dopamine D2 receptors in antipsychotic response--a double-blind PET study in schizophrenia*. Neuropsychopharmacology, 2007. **32**(6): p. 1209-15.
219. Kegeles, L.S., et al., *Dose-occupancy study of striatal and extrastriatal dopamine D2 receptors by aripiprazole in schizophrenia with PET and [18F]fallypride*. Neuropsychopharmacology, 2008. **33**(13): p. 3111-25.
220. Vauquelin, G., et al., *Clozapine, atypical antipsychotics, and the benefits of fast-off D2 dopamine receptor antagonism*. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2012. **385**(4): p. 337-72.
221. Kapur, S. and P. Seeman, *Antipsychotic agents differ in how fast they come off the dopamine D2 receptors. Implications for atypical antipsychotic action*. J Psychiatry Neurosci, 2000. **25**(2): p. 161-6.
222. Creese, I., D.R. Burt, and S.H. Snyder, *Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs*. Science, 1976. **192**(4238): p. 481-3.
223. Farde, L., et al., *D1- and D2-dopamine receptor occupancy during treatment with conventional and atypical neuroleptics*. Psychopharmacology (Berl), 1989. **99 Suppl**: p. S28-31.
224. Sibley, D.R., *Handbook of contemporary neuropharmacology*. 2007, Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons.
225. Meltzer, H.Y. and B.W. Massey, *The role of serotonin receptors in the action of atypical antipsychotic drugs*. Curr Opin Pharmacol, 2011. **11**(1): p. 59-67.
226. Martin, P., et al., *Rodent data and general hypothesis: antipsychotic action exerted through 5-Ht2A receptor antagonism is dependent on increased serotonergic tone*. J Neural Transm, 1998. **105**(4-5): p. 365-96.
227. Weiner, D.M., et al., *5-hydroxytryptamine2A receptor inverse agonists as antipsychotics*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **299**(1): p. 268-76.
228. Aghajanian, G.K. and G.J. Marek, *Serotonin model of schizophrenia: emerging role of glutamate mechanisms*. Brain Res Brain Res Rev, 2000. **31**(2-3): p. 302-12.
229. de Bartolomeis, A., E.F. Buonaguro, and F. Iasevoli, *Serotonin-glutamate and serotonin-dopamine reciprocal interactions as putative molecular targets for novel antipsychotic treatments: from receptor heterodimers to postsynaptic scaffolding and effector proteins*. Psychopharmacology (Berl), 2013. **225**(1): p. 1-19.
230. Frankle, W.G., et al., *Occupancy of dopamine D2 receptors by the atypical antipsychotic drugs risperidone and olanzapine: theoretical implications*. Psychopharmacology (Berl), 2004. **175**(4): p. 473-80.
231. Schmidt, A.J., et al., *Effects of quetiapine, risperidone, 9-hydroxyrisperidone and ziprasidone on the survival of human neuronal and immune cells in vitro*. J Psychopharmacol, 2010. **24**(3): p. 349-54.
232. Meltzer, H.Y. and M. Huang, *In vivo actions of atypical antipsychotic drug on serotonergic and dopaminergic systems*. Prog Brain Res, 2008. **172**: p. 177-97.
233. Molteni, R., et al., *Antipsychotic drug actions on gene modulation and signaling mechanisms*. Pharmacol Ther, 2009. **124**(1): p. 74-85.

234. Hyman, S.E. and E.J. Nestler, *Initiation and adaptation: a paradigm for understanding psychotropic drug action*. Am J Psychiatry, 1996. **153**(2): p. 151-62.
235. Fatemi, S.H., et al., *Comparative gene expression study of the chronic exposure to clozapine and haloperidol in rat frontal cortex*. Schizophr Res, 2012. **134**(2-3): p. 211-8.
236. Robertson, G.S., H. Matsumura, and H.C. Fibiger, *Induction patterns of Fos-like immunoreactivity in the forebrain as predictors of atypical antipsychotic activity*. J Pharmacol Exp Ther, 1994. **271**(2): p. 1058-66.
237. Robertson, G.S. and H.C. Fibiger, *Neuroleptics increase c-fos expression in the forebrain: contrasting effects of haloperidol and clozapine*. Neuroscience, 1992. **46**(2): p. 315-28.
238. Dragunow, M., et al., *D2 dopamine receptor antagonists induce fos and related proteins in rat striatal neurons*. Neuroscience, 1990. **37**(2): p. 287-94.
239. Konradi, C., et al., *The cAMP-response-element-binding protein interacts, but Fos protein does not interact, with the proenkephalin enhancer in rat striatum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(15): p. 7005-9.
240. Turalba, A.V., K.A. Leite-Morris, and G.B. Kaplan, *Antipsychotics regulate cyclic AMP-dependent protein kinase and phosphorylated cyclic AMP response element-binding protein in striatal and cortical brain regions in mice*. Neuroscience Letters, 2004. **357**(1): p. 53-57.
241. Pozzi, L., et al., *Opposite regulation by typical and atypical anti-psychotics of ERK1/2, CREB and Elk-1 phosphorylation in mouse dorsal striatum*. J Neurochem, 2003. **86**(2): p. 451-9.
242. Bateup, H.S., et al., *Cell type-specific regulation of DARPP-32 phosphorylation by psychostimulant and antipsychotic drugs*. Nat Neurosci, 2008. **11**(8): p. 932-9.
243. Lu, X.H., R.J. Bradley, and D.S. Dwyer, *Olanzapine produces trophic effects in vitro and stimulates phosphorylation of Akt/PKB, ERK1/2, and the mitogen-activated protein kinase p38*. Brain Res, 2004. **1011**(1): p. 58-68.
244. Yang, B.H., et al., *Phosphorylation of ERK and CREB in cultured hippocampal neurons after haloperidol and risperidone administration*. Psychiatry Clin Neurosci, 2004. **58**(3): p. 262-7.
245. Valjent, E., et al., *Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(2): p. 491-6.
246. Fumagalli, F., et al., *Long-term exposure to the atypical antipsychotic olanzapine differently up-regulates extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 phosphorylation in subcellular compartments of rat prefrontal cortex*. Mol Pharmacol, 2006. **69**(4): p. 1366-72.
247. Emamian, E.S., et al., *Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3beta signaling in schizophrenia*. Nat Genet, 2004. **36**(2): p. 131-7.
248. Roh, M.S., et al., *Haloperidol and clozapine differentially regulate signals upstream of glycogen synthase kinase 3 in the rat frontal cortex*. Exp Mol Med, 2007. **39**(3): p. 353-60.
249. Masri, B., et al., *Antagonism of dopamine D2 receptor/beta-arrestin 2 interaction is a common property of clinically effective antipsychotics*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(36): p. 13656-61.
250. Dwivedi, Y., H.S. Rizavi, and G.N. Pandey, *Differential effects of haloperidol and clozapine on [(3)H]cAMP binding, protein kinase A (PKA) activity, and mRNA and protein expression of selective regulatory and catalytic subunit isoforms of PKA in rat brain*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **301**(1): p. 197-209.
251. Ahmed, M.R., et al., *Haloperidol and clozapine differentially affect the expression of arrestins, receptor kinases, and extracellular signal-regulated kinase activation*. J Pharmacol Exp Ther, 2008. **325**(1): p. 276-83.

252. Agius, M., et al., *What do large scale studies of medication in schizophrenia add to our management strategies?* Psychiatr Danub, 2010. **22**(2): p. 323-8.
253. Bedard, P., et al., *Haloperidol-induced dyskinesias in the monkey.* Can J Neurol Sci, 1977. **4**(3): p. 197-201.
254. Blanchet, P.J., *Antipsychotic drug-induced movement disorders.* Can J Neurol Sci, 2003. **30 Suppl 1**: p. S101-7.
255. Blanchet, P.J., et al., *Oral dyskinesia: a clinical overview.* Int J Prosthodont, 2005. **18**(1): p. 10-9.
256. American Psychiatric Association. and American Psychiatric Association. Task Force on DSM-IV., *Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-IV-TR.* 4th ed. 2000, Washington, DC: American Psychiatric Association. xxxvii, 943 p.
257. Bhidayasiri, R. and S. Boonyawairoj, *Spectrum of tardive syndromes: clinical recognition and management.* Postgrad Med J, 2011. **87**(1024): p. 132-41.
258. Sachdev, P.S., *The current status of tardive dyskinesia.* Aust N Z J Psychiatry, 2000. **34**(3): p. 355-69.
259. Smith, J.M. and R.J. Baldessarini, *Changes in prevalence, severity, and recovery in tardive dyskinesia with age.* Arch Gen Psychiatry, 1980. **37**(12): p. 1368-73.
260. Jankovic, J., *Tardive syndromes and other drug-induced movement disorders.* Clin Neuropharmacol, 1995. **18**(3): p. 197-214.
261. Tarsy, D. and R.J. Baldessarini, *Epidemiology of tardive dyskinesia: is risk declining with modern antipsychotics?* Mov Disord, 2006. **21**(5): p. 589-98.
262. Correll, C.U. and E.M. Schenk, *Tardive dyskinesia and new antipsychotics.* Curr Opin Psychiatry, 2008. **21**(2): p. 151-6.
263. Rummel-Kluge, C., et al., *Second-generation antipsychotic drugs and extrapyramidal side effects: a systematic review and meta-analysis of head-to-head comparisons.* Schizophr Bull, 2012. **38**(1): p. 167-77.
264. Tarsy, D., *Tardive Dyskinesia.* Curr Treat Options Neurol, 2000. **2**(3): p. 205-214.
265. Klawans, H.L., C.M. Tanner, and A. Barr, *The reversibility of "permanent" tardive dyskinesia.* Clin Neuropharmacol, 1984. **7**(2): p. 153-9.
266. Schultz, S.K., et al., *Withdrawal-emergent dyskinesia in patients with schizophrenia during antipsychotic discontinuation.* Biol Psychiatry, 1995. **38**(11): p. 713-9.
267. Egan, M.F., J. Apud, and R.J. Wyatt, *Treatment of tardive dyskinesia.* Schizophr Bull, 1997. **23**(4): p. 583-609.
268. Mentzel, C.L., et al., *Efficacy and safety of deep brain stimulation in patients with medication-induced tardive dyskinesia and/or dystonia: a systematic review.* J Clin Psychiatry, 2012. **73**(11): p. 1434-8.
269. Blanchet, P.J., et al., *Relevance of animal models to human tardive dyskinesia.* Behav Brain Funct, 2012. **8**: p. 12.
270. Turrone, P., G. Remington, and J.N. Nobrega, *The vacuous chewing movement (VCM) model of tardive dyskinesia revisited: is there a relationship to dopamine D(2) receptor occupancy?* Neurosci Biobehav Rev, 2002. **26**(3): p. 361-80.
271. Roberts, R.C. and B. Lapidus, *Ultrastructural correlates of haloperidol-induced oral dyskinesias in rats: a study of unlabeled and enkephalin-labeled striatal terminals.* J Neural Transm, 2003. **110**(9): p. 961-75.
272. Marchese, G., et al., *Haloperidol versus risperidone on rat "early onset" vacuous chewing.* Behav Brain Res, 2004. **149**(1): p. 9-16.

273. Mitchell, I.J., et al., *Acute administration of haloperidol induces apoptosis of neurones in the striatum and substantia nigra in the rat*. *Neuroscience*, 2002. **109**(1): p. 89-99.
274. Carta, A.R. and C.R. Gerfen, *Lack of a role for the D3 receptor in clozapine induction of c-fos demonstrated in D3 dopamine receptor-deficient mice*. *Neuroscience*, 1999. **90**(3): p. 1021-9.
275. Gunne, L.M. and S. Barany, *Haloperidol-Induced Tardive-Dyskinesia in Monkeys*. *Psychopharmacology*, 1976. **50**(3): p. 237-240.
276. Domino, E.F., *Induction of tardive dyskinesia in Cebus apella and Macaca speciosa monkeys: a review*. *Psychopharmacology Suppl*, 1985. **2**: p. 217-23.
277. Boulton, A.A., G.B. Baker, and M.T. Martin-Iverson, *Animal models in psychiatry*. *Neuromethods*. 1991, Clifton, N.J.: Humana Press.
278. Beaudry, G., et al., *Contrasting patterns and cellular specificity of transcriptional regulation of the nuclear receptor nerve growth factor-inducible B by haloperidol and clozapine in the rat forebrain*. *J Neurochem*, 2000. **75**(4): p. 1694-702.
279. Waln, O. and J. Jankovic, *An update on tardive dyskinesia: from phenomenology to treatment*. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)*, 2013. **3**.
280. Klawans, H.L., Jr. and R. Rubovits, *An experimental model of tardive dyskinesia*. *J Neural Transm*, 1972. **33**(3): p. 235-46.
281. Seeman, P., *Dopamine D2 receptors as treatment targets in schizophrenia*. *Clin Schizophr Relat Psychoses*, 2010. **4**(1): p. 56-73.
282. Nobrega, J.N., et al., *Effects of chronic haloperidol on stress-induced oral behaviour in rats*. *Psychopharmacology (Berl)*, 1989. **98**(4): p. 476-82.
283. Gunne, L.M., J.E. Haggstrom, and B. Sjoquist, *Association with persistent neuroleptic-induced dyskinesia of regional changes in brain GABA synthesis*. *Nature*, 1984. **309**(5966): p. 347-9.
284. Blanchet, P.J., et al., *Relevance of the MPTP primate model in the study of dyskinesia priming mechanisms*. *Parkinsonism Relat Disord*, 2004. **10**(5): p. 297-304.
285. Fibiger, H.C. and K.G. Lloyd, *Neurobiological Substrates of Tardive-Dyskinesia - the Gaba Hypothesis*. *Trends in Neurosciences*, 1984. **7**(12): p. 462-464.
286. Teo, J.T., M.J. Edwards, and K. Bhatia, *Tardive dyskinesia is caused by maladaptive synaptic plasticity: A hypothesis*. *Movement Disorders*, 2012. **27**(10): p. 1205-1215.
287. Delfs, J.M., et al., *Expression of glutamic acid decarboxylase mRNA in striatum and pallidum in an animal model of tardive dyskinesia*. *Exp Neurol*, 1995. **133**(2): p. 175-88.
288. Sakai, K., et al., *Traditional and new antipsychotic drugs differentially alter neurotransmission markers in basal ganglia-thalamocortical neural pathways*. *Synapse*, 2001. **39**(2): p. 152-160.
289. Thelma, B., V. Srivastava, and A.K. Tiwari, *Genetic underpinnings of tardive dyskinesia: passing the baton to pharmacogenetics*. *Pharmacogenomics*, 2008. **9**(9): p. 1285-306.
290. Mathur, B.N. and D.M. Lovinger, *Serotonergic action on dorsal striatal function*. *Parkinsonism Relat Disord*, 2012. **18 Suppl 1**: p. S129-31.
291. Rylander, D., *The serotonin system: a potential target for anti-dyskinetic treatments and biomarker discovery*. *Parkinsonism Relat Disord*, 2012. **18 Suppl 1**: p. S126-8.
292. Hjorth, S. and A. Carlsson, *Buspirone: effects on central monoaminergic transmission--possible relevance to animal experimental and clinical findings*. *Eur J Pharmacol*, 1982. **83**(3-4): p. 299-303.
293. Hutson, P.H., et al., *Hippocampal 5-HT synthesis and release in vivo is decreased by infusion of 8-OHDPAT into the nucleus raphe dorsalis*. *Neurosci Lett*, 1989. **100**(1-3): p. 276-80.
294. Haleem, D.J., E. Shireen, and M.A. Haleem, *Somatodendritic and postsynaptic serotonin-1A receptors in the attenuation of haloperidol-induced catalepsy*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2004. **28**(8): p. 1323-9.

295. Hicks, P.B., *The effect of serotonergic agents on haloperidol-induced catalepsy*. Life Sci, 1990. **47**(18): p. 1609-15.
296. Wadenberg, M.L. and V. Hillegaart, *Stimulation of median, but not dorsal, raphe 5-HT_{1A} autoreceptors by the local application of 8-OH-DPAT reverses raclopride-induced catalepsy in the rat*. Neuropharmacology, 1995. **34**(5): p. 495-9.
297. Prinssen, E.P., M.S. Kleven, and W. Koek, *Interactions between neuroleptics and 5-HT_{1A} ligands in preclinical behavioral models for antipsychotic and extrapyramidal effects*. Psychopharmacology (Berl), 1999. **144**(1): p. 20-9.
298. Mangelsdorf, D.J., et al., *The nuclear receptor superfamily: the second decade*. Cell, 1995. **83**(6): p. 835-9.
299. Bunce, C.M., M.J. Campbell, and SpringerLink (Service en ligne), *Nuclear receptors current concepts and future challenges*. 2010, Dordrecht, Netherlands ; New York: Springer. 1 texte électronique.
300. Lévesque, D., Rouillard, C, *Role of Members of the Nur (NR4A)*

Transcription Factors in Dopamine-Related Neurodegenerative and Neuropsychiatric Disorders., in *The Handbook of Neuropsychiatric Biomarkers,*

Endophenotypes and Genes, M.S. Ritsner, Editor. 2009. p. 195-210.

301. Levesque, D. and C. Rouillard, *Nur77 and retinoid X receptors: crucial factors in dopamine-related neuroadaptation*. Trends Neurosci, 2007. **30**(1): p. 22-30.
302. Maxwell, M.A. and G.E. Muscat, *The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles*. Nucl Recept Signal, 2006. **4**: p. e002.
303. Pols, T.W., P.I. Bonta, and C.J. de Vries, *NR4A nuclear orphan receptors: protective in vascular disease?* Curr Opin Lipidol, 2007. **18**(5): p. 515-20.
304. Chao, L.C., et al., *Inhibition of adipocyte differentiation by Nur77, Nurr1, and Nor1*. Mol Endocrinol, 2008. **22**(12): p. 2596-608.
305. Pearen, M.A. and G.E.O. Muscat, *Minireview: Nuclear Hormone Receptor 4A Signaling: Implications for Metabolic Disease*. Molecular Endocrinology, 2010. **24**(10): p. 1891-1903.
306. Wang, L.Y., et al., *PDGF-induced Proliferation of Smooth Muscular Cells Is Related to the Regulation of CREB Phosphorylation and Nur77 Expression*. Journal of Huazhong University of Science and Technology-Medical Sciences, 2011. **31**(2): p. 169-173.
307. Phillips, A., et al., *Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells*. Molecular and Cellular Biology, 1997. **17**(10): p. 5946-5951.
308. Martin, L.J., et al., *The orphan nuclear receptor NUR77 regulates hormone-induced StAR transcription in Leydig cells through cooperation with Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I*. Mol Endocrinol, 2008. **22**(9): p. 2021-37.
309. McMorrow, J.P. and E.P. Murphy, *Inflammation: a role for NR4A orphan nuclear receptors?* Biochem Soc Trans, 2011. **39**(2): p. 688-93.
310. Mohan, H.M., et al., *Molecular Pathways: The Role of NR4A Orphan Nuclear Receptors in Cancer*. Clinical Cancer Research, 2012. **18**(12): p. 3223-3228.
311. Maden, M., *Retinoid signalling in the development of the central nervous system*. Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(11): p. 843-53.
312. de Urquiza, A.M., et al., *Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain*. Science, 2000. **290**(5499): p. 2140-4.
313. Butt, T.R. and P.G. Walfish, *Human nuclear receptor heterodimers: opportunities for detecting targets of transcriptional regulation using yeast*. Gene Expr, 1996. **5**(4-5): p. 255-68.

314. Chambon, P., *The retinoid signaling pathway: molecular and genetic analyses*. Semin Cell Biol, 1994. **5**(2): p. 115-25.
315. Perlmann, T. and L. Jansson, *A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1*. Genes Dev, 1995. **9**(7): p. 769-82.
316. Luo, Y., *The function and mechanisms of Nurr1 action in midbrain dopaminergic neurons, from development and maintenance to survival*. Int Rev Neurobiol, 2012. **102**: p. 1-22.
317. Ohkura, N., et al., *Structure, mapping and expression of a human NOR-1 gene, the third member of the Nur77/NGFI-B family*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1308**(3): p. 205-14.
318. Zetterstrom, R.H., et al., *Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1*. Mol Endocrinol, 1996. **10**(12): p. 1656-66.
319. Zetterstrom, R.H., et al., *Cellular expression of the immediate early transcription factors Nurr1 and NGFI-B suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system*. Brain Res Mol Brain Res, 1996. **41**(1-2): p. 111-20.
320. Gilbert, F., et al., *Nur77 gene knockout alters dopamine neuron biochemical activity and dopamine turnover*. Biol Psychiatry, 2006. **60**(6): p. 538-47.
321. St-Hilaire, M., et al., *Impaired behavioural and molecular adaptations to dopamine denervation and repeated L-DOPA treatment in Nur77-knockout mice*. Eur J Neurosci, 2006. **24**(3): p. 795-805.
322. Mount, M.P., et al., *Perturbation of transcription factor Nur77 expression mediated by myocyte enhancer factor 2D (MEF2D) regulates dopaminergic neuron loss in response to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)*. J Biol Chem, 2013.
323. St-Hilaire, M., et al., *Denervation and repeated L-DOPA induce a coordinate expression of the transcription factor NGFI-B in striatal projection pathways in hemi-parkinsonian rats*. Neurobiol Dis, 2003. **14**(1): p. 98-109.
324. Werme, M., L. Olson, and S. Brene, *NGFI-B and nor1 mRNAs are upregulated in brain reward pathways by drugs of abuse: different effects in Fischer and Lewis rats*. Brain Res Mol Brain Res, 2000. **76**(1): p. 18-24.
325. St-Hilaire, M., et al., *Effects of cocaine on c-fos and NGFI-B mRNA expression in transgenic mice underexpressing glucocorticoid receptors*. Neuropsychopharmacology, 2003. **28**(3): p. 478-89.
326. Bhardwaj, S.K., et al., *Neonatal ventral hippocampus lesion leads to reductions in nerve growth factor inducible-B mRNA in the prefrontal cortex and increased amphetamine response in the nucleus accumbens and dorsal striatum*. Neuroscience, 2003. **122**(3): p. 669-76.
327. Xing, G., et al., *Reduction of dopamine-related transcription factors Nurr1 and NGFI-B in the prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorders*. Schizophr Res, 2006. **84**(1): p. 36-56.
328. Lipska, B.K., et al., *Effects of reversible inactivation of the neonatal ventral hippocampus on behavior in the adult rat*. J Neurosci, 2002. **22**(7): p. 2835-42.
329. Ujike, H., et al., *Gene expression related to synaptogenesis, neuritogenesis, and MAP kinase in behavioral sensitization to psychostimulants*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **965**: p. 55-67.
330. Maheux, J., et al., *Induction patterns of transcription factors of the nur family (nurr1, nur77, and nor-1) by typical and atypical antipsychotics in the mouse brain: implication for their mechanism of action*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **313**(1): p. 460-73.
331. Werme, M., et al., *Differential patterns of induction of NGFI-B, Nor1 and c-fos mRNAs in striatal subregions by haloperidol and clozapine*. Brain Res, 2000. **863**(1-2): p. 112-9.

332. Hoffman, D.C. and H. Donovan, *Catalepsy as a rodent model for detecting antipsychotic drugs with extrapyramidal side effect liability*. Psychopharmacology (Berl), 1995. **120**(2): p. 128-33.
333. Ethier, I., et al., *Docosahexaenoic acid reduces haloperidol-induced dyskinesias in mice: involvement of Nur77 and retinoid receptors*. Biol Psychiatry, 2004. **56**(7): p. 522-6.
334. Ethier, I., et al., *The transcription factor NGFI-B (Nur77) and retinoids play a critical role in acute neuroleptic-induced extrapyramidal effect and striatal neuropeptide gene expression*. Neuropsychopharmacology, 2004. **29**(2): p. 335-46.
335. Ziolkowska, B. and V. Holtt, *Fos is not involved in the regulation of the proenkephalin gene by haloperidol in the mouse striatum*. Brain Res Mol Brain Res, 1995. **34**(2): p. 351-4.
336. Novak, G., et al., *Association of the orphan nuclear receptor NR4A1 with tardive dyskinesia*. Psychiatr Genet, 2010. **20**(1): p. 39-43.
337. Mahmoudi, S., P.J. Blanchet, and D. Levesque, *Haloperidol-induced striatal Nur77 expression in a non-human primate model of tardive dyskinesia*. Eur J Neurosci, 2013. **38**(1): p. 2192-8.
338. Samadi, P., et al., *Docosahexaenoic acid reduces levodopa-induced dyskinesias in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine monkeys*. Ann Neurol, 2006. **59**(2): p. 282-8.
339. Clow, A., P. Jenner, and C.D. Marsden, *An experimental model of tardive dyskinesias*. Life Sci, 1978. **23**(5): p. 421-3.
340. Gerlach, J., N. Reisby, and A. Randrup, *Dopaminergic hypersensitivity and cholinergic hypofunction in the pathophysiology of tardive dyskinesia*. Psychopharmacologia, 1974. **34**(1): p. 21-35.
341. Andersson, U., et al., *Striatal binding of 11C-NMSP studied with positron emission tomography in patients with persistent tardive dyskinesia: no evidence for altered dopamine D2 receptor binding*. J Neural Transm Gen Sect, 1990. **79**(3): p. 215-26.
342. Blin, J., et al., *Striatal dopamine D2 receptors in tardive dyskinesia: PET study*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1989. **52**(11): p. 1248-52.
343. Nordstrom, A.L., L. Farde, and C. Halldin, *Time course of D2-dopamine receptor occupancy examined by PET after single oral doses of haloperidol*. Psychopharmacology (Berl), 1992. **106**(4): p. 433-8.
344. Nyberg, S., L. Farde, and C. Halldin, *Delayed normalization of central D2 dopamine receptor availability after discontinuation of haloperidol decanoate. Preliminary findings*. Arch Gen Psychiatry, 1997. **54**(10): p. 953-8.
345. Seeman, P., *Atypical antipsychotics: mechanism of action*. Can J Psychiatry, 2002. **47**(1): p. 27-38.
346. Wilmot, C.A. and A.M. Szczepanik, *Effects of acute and chronic treatments with clozapine and haloperidol on serotonin (5-HT₂) and dopamine (D₂) receptors in the rat brain*. Brain Res, 1989. **487**(2): p. 288-98.
347. Joyce, J.N., *D2 but not D3 receptors are elevated after 9 or 11 months chronic haloperidol treatment: influence of withdrawal period*. Synapse, 2001. **40**(2): p. 137-44.
348. Sakata, M. and C. Prasad, *Transient decrease in rat striatal D2 dopamine receptor mRNA level after acute haloperidol treatment*. Brain Res Mol Brain Res, 1992. **14**(3): p. 282-4.
349. Reynolds, G.P., et al., *Dopamine receptor abnormalities in the striatum and pallidum in tardive dyskinesia: a post mortem study*. J Neural Transm Gen Sect, 1992. **87**(3): p. 225-30.
350. Sasaki, T., J.L. Kennedy, and J.N. Norega, *Regional brain changes in [3H]SCH 23390 binding to dopamine D1, receptors after long-term haloperidol treatment: lack of correspondence with the development of vacuous chewing movements*. Behav Brain Res, 1998. **90**(2): p. 125-32.

351. Lublin, H., J. Gerlach, and L. Peacock, *Effect of D1 and D2 agonists in primates withdrawn from long-term treatment with haloperidol: the potential role of dopamine D1 receptors in dyskinesia*. Clin Neuropharmacol, 1992. **15**(6): p. 448-58.
352. Lublin, H., J. Gerlach, and L. Peacock, *Chronic treatment with the D1 receptor antagonist, SCH 23390, and the D2 receptor antagonist, raclopride, in cebus monkeys withdrawn from previous haloperidol treatment. Extrapyramidal syndromes and dopaminergic supersensitivity*. Psychopharmacology (Berl), 1993. **112**(2-3): p. 389-97.
353. Peacock, L., H. Lublin, and J. Gerlach, *The effects of dopamine D1 and D2 receptor agonists and antagonists in monkeys withdrawn from long-term neuroleptic treatment*. Eur J Pharmacol, 1990. **186**(1): p. 49-59.
354. Rosengarten, H., J.W. Schweitzer, and A.J. Friedhoff, *Induction of oral dyskinesias in naive rats by D1 stimulation*. Life Sci, 1983. **33**(25): p. 2479-82.
355. Tauscher, J., et al., *Equivalent occupancy of dopamine D1 and D2 receptors with clozapine: differentiation from other atypical antipsychotics*. Am J Psychiatry, 2004. **161**(9): p. 1620-5.
356. Sanci, V., S. Houle, and J.N. DaSilva, *No change in dopamine D1 receptor in vivo binding in rats after sub-chronic haloperidol treatment*. Can J Physiol Pharmacol, 2002. **80**(1): p. 36-41.
357. Van Kampen, J.M. and A.J. Stoessl, *Dopamine D(1A) receptor function in a rodent model of tardive dyskinesia*. Neuroscience, 2000. **101**(3): p. 629-35.
358. Curran, E.J. and S.J. Watson, Jr., *Dopamine receptor mRNA expression patterns by opioid peptide cells in the nucleus accumbens of the rat: a double in situ hybridization study*. J Comp Neurol, 1995. **361**(1): p. 57-76.
359. Ridray, S., et al., *Coexpression of dopamine D1 and D3 receptors in islands of Calleja and shell of nucleus accumbens of the rat: opposite and synergistic functional interactions*. Eur J Neurosci, 1998. **10**(5): p. 1676-86.
360. Morissette, M., et al., *Associative and limbic regions of monkey striatum express high levels of dopamine D3 receptors: effects of MPTP and dopamine agonist replacement therapies*. Eur J Neurosci, 1998. **10**(8): p. 2565-73.
361. Stanwood, G.D., et al., *Quantitative autoradiographic mapping of rat brain dopamine D3 binding with [(125)I]7-OH-PIPAT: evidence for the presence of D3 receptors on dopaminergic and nondopaminergic cell bodies and terminals*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. **295**(3): p. 1223-31.
362. Damask, S.P., et al., *Differential effects of clozapine and haloperidol on dopamine receptor mRNA expression in rat striatum and cortex*. Brain Res Mol Brain Res, 1996. **41**(1-2): p. 241-9.
363. Florijn, W.J., F.I. Tarazi, and I. Creese, *Dopamine receptor subtypes: differential regulation after 8 months treatment with antipsychotic drugs*. J Pharmacol Exp Ther, 1997. **280**(2): p. 561-9.
364. Fox, C.A., A. Mansour, and S.J. Watson, Jr., *The effects of haloperidol on dopamine receptor gene expression*. Exp Neurol, 1994. **130**(2): p. 288-303.
365. Tarazi, F.I., W.J. Florijn, and I. Creese, *Differential regulation of dopamine receptors after chronic typical and atypical antipsychotic drug treatment*. Neuroscience, 1997. **78**(4): p. 985-96.
366. Tremblay, M., C. Rouillard, and D. Levesque, *Dopamine D3 receptor antisense reduces neuropeptide mRNA levels in rat nucleus accumbens*. Neuroreport, 1997. **8**(18): p. 3901-5.
367. D'Souza, U., P. McGuffin, and P.R. Buckland, *Antipsychotic regulation of dopamine D1, D2 and D3 receptor mRNA*. Neuropharmacology, 1997. **36**(11-12): p. 1689-96.
368. Wang, W., et al., *Up-regulation of D3 dopamine receptor mRNA by neuroleptics*. Synapse, 1996. **23**(3): p. 232-5.

369. Gurevich, E.V. and J.N. Joyce, *Distribution of dopamine D3 receptor expressing neurons in the human forebrain: comparison with D2 receptor expressing neurons*. Neuropsychopharmacology, 1999. **20**(1): p. 60-80.
370. Hall, H., et al., *Autoradiographic localisation of D-3-dopamine receptors in the human brain using the selective D-3-dopamine receptor agonist (+)-[H-3]PD 128907*. Psychopharmacology, 1996. **128**(3): p. 240-247.
371. Steen, V.M., et al., *Dopamine D3-receptor gene variant and susceptibility to tardive dyskinesia in schizophrenic patients*. Mol Psychiatry, 1997. **2**(2): p. 139-45.
372. Levant, B., *Differential distribution of D3 dopamine receptors in the brains of several mammalian species*. Brain Res, 1998. **800**(2): p. 269-74.
373. Burris, K.D., et al., *Lack of discrimination by agonists for D2 and D3 dopamine receptors*. Neuropsychopharmacology, 1995. **12**(4): p. 335-45.
374. Kung, M.P., et al., *Characterization of binding sites for [125I]R(+)-trans-7-OH-PIPAT in rat brain*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1994. **350**(6): p. 611-7.
375. Senogles, S.E., et al., *Specificity of receptor-G protein interactions. Discrimination of Gi subtypes by the D2 dopamine receptor in a reconstituted system*. J Biol Chem, 1990. **265**(8): p. 4507-14.
376. Beart, P.M., R.D. O'Shea, and D.T. Manallack, *Regulation of sigma-receptors: high- and low-affinity agonist states, GTP shifts, and up-regulation by rimcazole and 1,3-Di-(2-tolyl)guanidine*. J Neurochem, 1989. **53**(3): p. 779-88.
377. McCann, D.J., A.D. Weissman, and T.P. Su, *Sigma-1 and sigma-2 sites in rat brain: comparison of regional, ontogenetic, and subcellular patterns*. Synapse, 1994. **17**(3): p. 182-9.
378. Girgis, R.R., et al., *In Vivo Binding of Antipsychotics to D3 and D2 Receptors: A Pet Study in Baboons with [11c]-(+)-Phno*. Schizophrenia Bulletin, 2011. **37**: p. 124-124.
379. McCormick, P.N., et al., *Acutely administered antipsychotic drugs are highly selective for dopamine D2 over D3 receptors*. Pharmacological Research, 2013. **70**(1): p. 66-71.
380. Vanhauwe, J.F., et al., *G-protein sensitivity of ligand binding to human dopamine D(2) and D(3) receptors expressed in Escherichia coli: clues for a constrained D(3) receptor structure*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. **295**(1): p. 274-83.
381. Graff-Guerrero, A., et al., *Blockade of [11C](+)-PHNO binding in human subjects by the dopamine D3 receptor antagonist ABT-925*. Int J Neuropsychopharmacol, 2010. **13**(3): p. 273-87.
382. Guigoni, C., et al., *Pathogenesis of levodopa-induced dyskinesia: focus on D1 and D3 dopamine receptors*. Parkinsonism Relat Disord, 2005. **11 Suppl 1**: p. S25-9.
383. Bezard, E., et al., *Attenuation of levodopa-induced dyskinesia by normalizing dopamine D-3 receptor function*. Nature Medicine, 2003. **9**(6): p. 762-767.
384. Pilowsky, L.S., et al., *Limbic selectivity of clozapine*. Lancet, 1997. **350**(9076): p. 490-1.
385. Xiberas, X., et al., *Extrastriatal and striatal D(2) dopamine receptor blockade with haloperidol or new antipsychotic drugs in patients with schizophrenia*. Br J Psychiatry, 2001. **179**: p. 503-8.
386. Stephenson, C.M., et al., *Striatal and extra-striatal D(2)/D(3) dopamine receptor occupancy by quetiapine in vivo. [(123)I]-epidepride single photon emission tomography(SPET) study*. Br J Psychiatry, 2000. **177**: p. 408-15.
387. Kessler, R.M., et al., *Occupancy of striatal and extrastriatal dopamine D2 receptors by clozapine and quetiapine*. Neuropsychopharmacology, 2006. **31**(9): p. 1991-2001.
388. Andreassen, O.A., et al., *Memantine attenuates the increase in striatal preproenkephalin mRNA expression and development of haloperidol-induced persistent oral dyskinesias in rats*. Brain Res, 2003. **994**(2): p. 188-92.

389. Normand, E., et al., *Anatomical study of enkephalin gene expression in the rat forebrain following haloperidol treatment*. *Neurosci Lett*, 1987. **83**(3): p. 232-6.
390. Egan, M.F., et al., *Alterations in mRNA levels of D2 receptors and neuropeptides in striatonigral and striatopallidal neurons of rats with neuroleptic-induced dyskinesias*. *Synapse*, 1994. **18**(3): p. 178-89.
391. Maneuf, Y.P., et al., *On the role of enkephalin cotransmission in the GABAergic striatal efferents to the globus pallidus*. *Exp Neurol*, 1994. **125**(1): p. 65-71.
392. Samadi, P., P.J. Bedard, and C. Rouillard, *Opioids and motor complications in Parkinson's disease*. *Trends Pharmacol Sci*, 2006. **27**(10): p. 512-7.
393. Nylander, I. and L. Terenius, *Chronic haloperidol and clozapine differentially affect dynorphin peptides and substance P in basal ganglia of the rat*. *Brain Res*, 1986. **380**(1): p. 34-41.
394. Radke, J.M., et al., *Comparison between short- and long-term haloperidol administration on somatostatin and substance P concentrations in the rat brain*. *Brain Res*, 1988. **445**(1): p. 55-60.
395. Kim, S.H., et al., *Haloperidol regulates the phosphorylation level of the MEK-ERK-p90RSK signal pathway via protein phosphatase 2A in the rat frontal cortex*. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2008. **11**(4): p. 509-17.
396. Konradi, C. and S. Heckers, *Antipsychotic drugs and neuroplasticity: insights into the treatment and neurobiology of schizophrenia*. *Biol Psychiatry*, 2001. **50**(10): p. 729-42.
397. Centonze, D., et al., *Chronic haloperidol promotes corticostriatal long-term potentiation by targeting dopamine D2L receptors*. *J Neurosci*, 2004. **24**(38): p. 8214-22.
398. Heckers, S., et al., *Cortex, white matter, and basal ganglia in schizophrenia: a volumetric postmortem study*. *Biol Psychiatry*, 1991. **29**(6): p. 556-66.
399. Jernigan, T.L., et al., *Magnetic resonance imaging abnormalities in lenticular nuclei and cerebral cortex in schizophrenia*. *Arch Gen Psychiatry*, 1991. **48**(10): p. 881-90.
400. Gur, R.E., et al., *Subcortical MRI volumes in neuroleptic-naive and treated patients with schizophrenia*. *Am J Psychiatry*, 1998. **155**(12): p. 1711-7.
401. Benes, F.M., et al., *Synaptic rearrangements in medial prefrontal cortex of haloperidol-treated rats*. *Brain Res*, 1985. **348**(1): p. 15-20.
402. Kerns, J.M., et al., *Synaptic plasticity in the rat striatum following chronic haloperidol treatment*. *Clin Neuropharmacol*, 1992. **15**(6): p. 488-500.
403. Uranova, N.A., et al., *Morphometric study of synaptic patterns in the rat caudate nucleus and hippocampus under haloperidol treatment*. *Synapse*, 1991. **7**(4): p. 253-9.
404. Albert, P.R., et al., *Coupling of a cloned rat dopamine-D2 receptor to inhibition of adenylyl cyclase and prolactin secretion*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(4): p. 2098-104.
405. Adams, M.R., et al., *Loss of haloperidol induced gene expression and catalepsy in protein kinase A-deficient mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(22): p. 12157-61.
406. Konradi, C. and S. Heckers, *Haloperidol-induced Fos expression in striatum is dependent upon transcription factor cyclic AMP response element binding protein*. *Neuroscience*, 1995. **65**(4): p. 1051-61.
407. Kelley, J.J., et al., *The effect of chronic haloperidol treatment on dendritic spines in the rat striatum*. *Exp Neurol*, 1997. **146**(2): p. 471-8.
408. Yael, D., et al., *Haloperidol-induced changes in neuronal activity in the striatum of the freely moving rat*. *Front Syst Neurosci*, 2013. **7**: p. 110.
409. Tian, X., et al., *MEF-2 regulates activity-dependent spine loss in striatopallidal medium spiny neurons*. *Mol Cell Neurosci*, 2010. **44**(1): p. 94-108.

410. Langlois, M.C., et al., *Impact of antipsychotic drug administration on the expression of nuclear receptors in the neocortex and striatum of the rat brain*. Neuroscience, 2001. **106**(1): p. 117-28.
411. Aosaki, T., et al., *Responses of tonically active neurons in the primate's striatum undergo systematic changes during behavioral sensorimotor conditioning*. J Neurosci, 1994. **14**(6): p. 3969-84.
412. Ravel, S., E. Legallet, and P. Apicella, *Responses of tonically active neurons in the monkey striatum discriminate between motivationally opposing stimuli*. J Neurosci, 2003. **23**(24): p. 8489-97.
413. Raz, A., et al., *Neuronal synchronization of tonically active neurons in the striatum of normal and parkinsonian primates*. J Neurophysiol, 1996. **76**(3): p. 2083-8.
414. Fahn, S., *The spectrum of levodopa-induced dyskinesias*. Ann Neurol, 2000. **47**(4 Suppl 1): p. S2-9; discussion S9-11.
415. Bezard, E., J.M. Brotchie, and C.E. Gross, *Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: potential for new therapies*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(8): p. 577-88.
416. Thanvi, B., N. Lo, and T. Robinson, *Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: clinical features, pathogenesis, prevention and treatment*. Postgrad Med J, 2007. **83**(980): p. 384-8.
417. Blanchet, P.J., et al., *Risk factors for peak dose dyskinesia in 100 levodopa-treated parkinsonian patients*. Can J Neurol Sci, 1996. **23**(3): p. 189-93.
418. Mones, R.J., T.S. Elizan, and G.J. Siegel, *Analysis of L-dopa induced dyskinesias in 51 patients with Parkinsonism*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1971. **34**(6): p. 668-73.
419. Nutt, J.G., *Levodopa-induced dyskinesia: review, observations, and speculations*. Neurology, 1990. **40**(2): p. 340-5.
420. Boyce, S., et al., *Nigrostriatal damage is required for induction of dyskinesias by L-DOPA in squirrel monkeys*. Clin Neuropharmacol, 1990. **13**(5): p. 448-58.
421. Hauser, R.A., et al., *Ten-year follow-up of Parkinson's disease patients randomized to initial therapy with ropinirole or levodopa*. Mov Disord, 2007. **22**(16): p. 2409-17.
422. Montastruc, J.L., et al., *A randomised controlled study comparing bromocriptine to which levodopa was later added, with levodopa alone in previously untreated patients with Parkinson's disease: a five year follow up*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1994. **57**(9): p. 1034-8.
423. Rascol, O., et al., *Development of dyskinesias in a 5-year trial of ropinirole and L-dopa*. Mov Disord, 2006. **21**(11): p. 1844-50.
424. Jenner, P., *Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia*. Nat Rev Neurosci, 2008. **9**(9): p. 665-77.
425. Creese, I., D.R. Burt, and S.H. Snyder, *Dopamine receptor binding enhancement accompanies lesion-induced behavioral supersensitivity*. Science, 1977. **197**(4303): p. 596-8.
426. Graham, W.C., M.A. Sambrook, and A.R. Crossman, *Differential effect of chronic dopaminergic treatment on dopamine D1 and D2 receptors in the monkey brain in MPTP-induced parkinsonism*. Brain Res, 1993. **602**(2): p. 290-303.
427. Lee, T., et al., *Receptor basis for dopaminergic supersensitivity in Parkinson's disease*. Nature, 1978. **273**(5657): p. 59-61.
428. Shinotoh, H., K. Hirayama, and Y. Tateno, *Dopamine D1 and D2 receptors in Parkinson's disease and striatonigral degeneration determined by PET*. Adv Neurol, 1993. **60**: p. 488-93.
429. Muriel, M.P., et al., *Levodopa induces a cytoplasmic localization of D1 dopamine receptors in striatal neurons in Parkinson's disease*. Ann Neurol, 1999. **46**(1): p. 103-11.

430. Muriel, M.P., G. Orioux, and E.C. Hirsch, *Levodopa but not ropinirole induces an internalization of D1 dopamine receptors in parkinsonian rats*. *Mov Disord*, 2002. **17**(6): p. 1174-9.
431. Santini, E., E. Valjent, and G. Fisone, *Parkinson's disease: levodopa-induced dyskinesia and signal transduction*. *FEBS J*, 2008. **275**(7): p. 1392-9.
432. Day, M., et al., *Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models*. *Nat Neurosci*, 2006. **9**(2): p. 251-9.
433. Stephens, B., et al., *Evidence of a breakdown of corticostriatal connections in Parkinson's disease*. *Neuroscience*, 2005. **132**(3): p. 741-54.
434. Klawans, H.L., Jr., *The pharmacology of tardive dyskinesias*. *Am J Psychiatry*, 1973. **130**(1): p. 82-6.
435. Frost, D.O., et al., *Early exposure to haloperidol or olanzapine induces long-term alterations of dendritic form*. *Synapse*, 2010. **64**(3): p. 191-9.
436. Critchlow, H.M., et al., *Clozapine and haloperidol differentially regulate dendritic spine formation and synaptogenesis in rat hippocampal neurons*. *Mol Cell Neurosci*, 2006. **32**(4): p. 356-65.
437. Bezard, E., et al., *Dopamine D3 receptor acting compounds dramatically improved L-dopa-induced dyskinesia in the MPTP-treated monkey*. *Movement Disorders*, 2002. **17**: p. S43-S44.
438. Mahmoudi, S., et al., *Nur77 mRNA levels and L-Dopa-induced dyskinesias in MPTP monkeys treated with docosahexaenoic acid*. *Neurobiol Dis*, 2009. **36**(1): p. 213-22.
439. Huot, P., et al., *The Pharmacology of L-DOPA-Induced Dyskinesia in Parkinson's Disease*. *Pharmacological Reviews*, 2013. **65**(1): p. 171-222.
440. Ahmed, I., et al., *Glutamate NMDA receptor dysregulation in Parkinson's disease with dyskinesias*. *Brain*, 2011. **134**(Pt 4): p. 979-86.
441. Hallett, P.J., et al., *Alterations of striatal NMDA receptor subunits associated with the development of dyskinesia in the MPTP-lesioned primate model of Parkinson's disease*. *Neuropharmacology*, 2005. **48**(4): p. 503-16.
442. Arvanov, V.L., et al., *Clozapine and haloperidol modulate N-methyl-D-aspartate- and non-N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotransmission in rat prefrontal cortical neurons in vitro*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997. **283**(1): p. 226-34.
443. Leveque, J.C., et al., *Intracellular modulation of NMDA receptor function by antipsychotic drugs*. *J Neurosci*, 2000. **20**(11): p. 4011-20.
444. Wittmann, M., et al., *Clozapine potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor currents in the nucleus accumbens: role of NR2B and protein kinase A/Src kinases*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. **313**(2): p. 594-603.
445. Kuwajima, M., J. Spacek, and K.M. Harris, *Beyond counts and shapes: Studying pathology of dendritic spines in the context of the surrounding neuropil through serial section electron microscopy*. *Neuroscience*, 2012.
446. Zhang, Y., et al., *Aberrant Restoration of Spines and Their Synapses in L-Dopa-Induced Dyskinesia: Involvement of Corticostriatal but not Thalamostriatal Synapses*. *Cell Transplantation*, 2013. **22**(5): p. 920-920.
447. Picconi, B., et al., *Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia*. *Nat Neurosci*, 2003. **6**(5): p. 501-6.
448. Picconi, B., et al., *L-DOPA dosage is critically involved in dyskinesia via loss of synaptic depotentiation*. *Neurobiol Dis*, 2008. **29**(2): p. 327-35.
449. Calon, F. and T. Di Paolo, *Levodopa response motor complications--GABA receptors and preproenkephalin expression in human brain*. *Parkinsonism Relat Disord*, 2002. **8**(6): p. 449-54.

450. Blanchet, P.J., et al., *Continuous administration decreases and pulsatile administration increases behavioral sensitivity to a novel dopamine D2 agonist (U-91356A) in MPTP-exposed monkeys.* J Pharmacol Exp Ther, 1995. **272**(2): p. 854-9.
451. Turrone, P., et al., *Differential effects of within-day continuous vs. transient dopamine D2 receptor occupancy in the development of vacuous chewing movements (VCMs) in rats.* Neuropsychopharmacology, 2003. **28**(8): p. 1433-9.
452. Greenbaum, L., et al., *Do Tardive Dyskinesia and L-Dopa Induced Dyskinesia Share Common Genetic Risk Factors? An Exploratory Study.* J Mol Neurosci, 2013.
453. Kane, J.M., M. Woerner, and J. Lieberman, *Tardive dyskinesia: prevalence, incidence, and risk factors.* J Clin Psychopharmacol, 1988. **8**(4 Suppl): p. 52S-56S.
454. Quinn, N., P. Critchley, and C.D. Marsden, *Young onset Parkinson's disease.* Mov Disord, 1987. **2**(2): p. 73-91.
455. Lidow, M.S., J.D. Elsworth, and P.S. Goldman-Rakic, *Down-regulation of the D1 and D5 dopamine receptors in the primate prefrontal cortex by chronic treatment with antipsychotic drugs.* J Pharmacol Exp Ther, 1997. **281**(1): p. 597-603.
456. Aubert, I., et al., *Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia.* Ann Neurol, 2005. **57**(1): p. 17-26.
457. Turjanski, N., A.J. Lees, and D.J. Brooks, *In vivo studies on striatal dopamine D1 and D2 site binding in L-dopa-treated Parkinson's disease patients with and without dyskinesias.* Neurology, 1997. **49**(3): p. 717-23.
458. Lidow, M.S. and P.S. Goldman-Rakic, *Differential regulation of D2 and D4 dopamine receptor mRNAs in the primate cerebral cortex vs. neostriatum: effects of chronic treatment with typical and atypical antipsychotic drugs.* J Pharmacol Exp Ther, 1997. **283**(2): p. 939-46.
459. Hurley, M.J., et al., *Dopamine D3 receptors in the basal ganglia of the common marmoset and following MPTP and L-DOPA treatment.* Brain Res, 1996. **709**(2): p. 259-64.
460. Tamim, M.K., et al., *Effect of non-dopaminergic drug treatment on Levodopa induced dyskinesias in MPTP monkeys: common implication of striatal neuropeptides.* Neuropharmacology, 2010. **58**(1): p. 286-96.
461. Morissette, M., et al., *Preproenkephalin mRNA expression in the caudate-putamen of MPTP monkeys after chronic treatment with the D2 agonist U91356A in continuous or intermittent mode of administration: comparison with L-DOPA therapy.* Brain Res Mol Brain Res, 1997. **49**(1-2): p. 55-62.
462. Sivam, S.P., *Dopamine dependent decrease in enkephalin and substance P levels in basal ganglia regions of postmortem parkinsonian brains.* Neuropeptides, 1991. **18**(4): p. 201-7.
463. Jolkkonen, J., P. Jenner, and C.D. Marsden, *L-DOPA reverses altered gene expression of substance P but not enkephalin in the caudate-putamen of common marmosets treated with MPTP.* Brain Res Mol Brain Res, 1995. **32**(2): p. 297-307.
464. Cheshire, P.A. and D.R. Williams, *Serotonergic involvement in levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease.* J Clin Neurosci, 2012. **19**(3): p. 343-8.
465. Pardo, M., et al., *Effect of subtype-selective adenosine receptor antagonists on basal or haloperidol-regulated striatal function: studies of exploratory locomotion and c-Fos immunoreactivity in outbred and A(2A)R KO mice.* Behav Brain Res, 2013. **247**: p. 217-26.

