

Université de Montréal

**Étude longitudinale d'un modèle murin de dystonie progressive causée par un gain de
fonction du récepteur bêta de l'acide rétinoïque**

Présenté par Nicolas LEMMETTI

Département de Neurosciences
Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maîtrise en Neurosciences

Août 2019

© Nicolas Lemmetti, 2019

Université de Montréal
Département de neurosciences, Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé

**Étude longitudinale d'un modèle murin de dystonie progressive causée par un gain
de fonction du récepteur bêta de l'acide rétinoïque**

Présenté par

Nicolas Lemmetti

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Louis-Éric Trudeau
Président-rapporteur

Jacques L. Michaud
Directeur de recherche

Graciela Piñeyro
Membre du jury

Résumé

Récemment, notre laboratoire a décrit plusieurs patients atteints d'une forme sévère et progressive de dystonie présentant des mutations *de novo* dans le gène du récepteur bêta de l'acide rétinoïque (*RARB*). *RARB* est un facteur de transcription activé lors de sa liaison à l'acide rétinoïque (*AR*), un élément essentiel au bon développement du cerveau. Des études de transfection indiquent que ces mutations augmentent l'activité transcriptionnelle de *RARB*, suggérant qu'elles confèrent un gain de fonction (GDF) à la protéine. La dystonie est typiquement expliquée par un dysfonctionnement du striatum, la structure où *RARB* est principalement exprimé. Chez la souris, la perte de fonction de *Rarb* entraîne une réduction des neurones striatonigraux et des anomalies motrices, suggérant une perturbation du développement des circuits striataux. Nous avons ainsi émis l'hypothèse selon laquelle la dystonie des patients porteurs de mutations de GDF serait causée par un accroissement de la signalisation de *RARB*, pouvant perturber l'homéostasie des mêmes circuits que ceux affectés par une diminution de la signalisation de *Rarb*. En utilisant la technologie CRISPR-Cas9, nous avons généré des souris portant la mutation p.R394C, homologue de la p.R387C retrouvée chez plusieurs patients. Ces souris *Rarb*^{R394C/+} présentent des anomalies locomotrices rappelant celles d'autres modèles murins de dystonie, ainsi qu'une diminution des neurones striatopallidaux. Ceci suggère que les mutations de GDF de *RARB* induisent la dystonie en perturbant l'équilibre dans la signalisation dopaminergique striatale. Finalement, cette étude pourrait contribuer à comprendre les troubles neurodégénératifs moteurs, comme les maladies de Huntington et de Parkinson, dans lesquels la signalisation de l'AR semble être compromise.

Mots-clés : acide rétinoïque, dystonie, gain de fonction, mutation de novo, striatum.

Abstract

We previously described several patients with a severe and progressive form of early-onset dystonia who carried *de novo* mutations in the retinoic acid receptor beta gene (*RARB*). *RARB* is a transcription factor that is activated upon binding to retinoic acid (RA), whose signaling is required for proper development of the brain. Transfection studies indicate that these *de novo* mutations increase *RARB* transcriptional activity, suggesting that they confer a gain-of-function (GOF) propriety to the protein. Dystonia is typically explained by some dysfunction of the striatum, a region where *RARB* is predominantly expressed. Interestingly, loss of *Rarb* function in mice leads to a reduction of striatonigral neurons and motor abnormalities, suggesting a disruption in early development of striatal circuits. We hypothesized that the motor impairment of patients with *RARB* GOF mutations is caused by increased *RARB* signaling in the striatum, possibly disrupting homeostatic control of the same pathways as those affected by decreased *Rarb* signaling. Using CRISPR-Cas9 technology, we generated mice carrying the mutation p.R394C, which is homologous to the GOF mutation p.R387C found in several patients. These *Rarb*^{R394C/+} mice show locomotor impairments reminiscent of that of other mouse models of dystonia, along with a decreased striatopallidal neuronal population. Our data suggest that GOF mutations in *RARB* induce dystonia by disrupting striatal dopaminergic signaling necessary for functional equilibrium. This work might also shed light on common neurodegenerative disorders of the basal ganglia including Huntington's and Parkinson's disease, in which RA and *RARB* signaling appear to be compromised.

Key words: retinoic acid, dystonia, gain-of-function, de novo mutation, striatum.

2.2.1. Design expérimental.....	40
2.2.2. Le test du champ ouvert.....	41
2.2.3. Le test du rotarod.....	42
2.2.4. Le test d’empreintes.....	43
2.2.5. Le test de suspension à quatre pattes.....	44
2.2.6. Le test d’équilibre sur poutre.....	45
2.3. Études immunohistochimiques.....	46
2.3.1. Préparation des coupes cérébrales.....	46
2.3.2. Anticorps et microscopie confocale.....	46
2.3.3. Quantifications cellulaires.....	47
2.4. Analyses statistiques.....	48
Chapitre 3 : Résultats.....	50
3.1. Phénotype des animaux.....	50
3.1.1. La mutation R394C influence la masse corporelle des souris au cours du développement.....	50
3.1.2. La mutation R394C augmente la fréquence de la microphthalmie chez les souris.....	51
3.2. Tests comportementaux.....	53
3.2.1. La mutation R394C augmente la locomotion dans le champ ouvert.....	53
3.2.2. La mutation R394C augmente le temps passé en mouvement dans le champ ouvert.....	56
3.2.3. La mutation R394C induit une coordination déficitaire lors du test du rotarod.....	58
3.2.4. Impact de la mutation R394C sur les paramètres de la démarche.....	60
3.2.5. La mutation R394C n’affecte pas le tonus musculaire général des mutants.....	63
3.2.6. La mutation R394C influence la performance lors du test d’équilibre sur la poutre.....	65
3.3. Résultats des expériences d’IHC.....	68
3.3.1. La mutation R394C n’influence pas le nombre de neurones exprimant le récepteur dopaminergique D1.....	68
3.3.2. La mutation R394C induit une diminution du nombre de neurones exprimant le récepteur dopaminergique D2.....	71
Chapitre 4 : Discussion.....	74
Chapitre 5 : Conclusion.....	83
Références bibliographiques.....	84

Liste des figures

Figure 1. Organisation fonctionnelle de la circuiterie désinhibitrice des ganglions de la base.

Figure 2. Données anatomiques des souris mutantes.

Figure 3. Activité ambulatoire des souris mutantes lors du paradigme du champ ouvert.

Figure 4. Proportion du temps passé dans chaque zone et passé immobile des souris mutantes lors du paradigme du champ ouvert.

Figure 5. Performance des souris mutantes lors du test du rotarod en vitesse accélérée.

Figure 6. Analyse des paramètres de la démarche des souris mutantes lors du test d'empreintes.

Figure 7. Performance des souris mutantes lors du test de suspension à 4 pattes.

Figure 8. Performance des souris mutantes lors du paradigme de la traversée en équilibre sur la poutre.

Figure 9. Quantification du nombre de neurones exprimant le récepteur dopaminergique D1 dans le striatum de souris mutantes.

Figure 10. Quantification du nombre de neurones exprimant le récepteur dopaminergique D2 dans le striatum de souris mutantes.

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

ANOVA : analyse de variance

AR : acide rétinoïque

ARN : acide ribonucléique

ATV : aire tegmentaire ventrale

CREB : protéine de liaison des éléments de réponse à l'AMPc

CRISPR : courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées

ENK : enképhaline

ERAR : élément de réponse à l'acide rétinoïque

GABA : acide γ -aminobutyrique

GDF : gain de fonction

GFP : protéine fluorescente verte

GOF : *gain-of-function* (gain de fonction)

GPe : segment externe du globus pallidus

GPi : segment interne du globus pallidus

HET : hétérozygote

IHC : immunohistochimie

MH : maladie de Huntington

MP : maladie de Parkinson

NEM : neurone épineux moyen

NGS : sérum normal de chèvre

NST : noyau sous-thalamique

PBS : solution saline tamponnée au phosphate

PFA : paraformaldéhyde

PKA : protéine kinase A

RA : *retinoic acid* (acide rétinoïque)

RALDH : rétinaldéhyde déshydrogénase

RAR : récepteur à l'acide rétinoïque

RARA : récepteur à l'acide rétinoïque de type alpha

RARB : récepteur à l'acide rétinoïque de type bêta

RARG : récepteur à l'acide rétinoïque de type gamma

RFP : protéine fluorescente rouge

RPM : révolutions par minute

RXR : récepteur X des rétinoïdes

SEM : erreur type de la moyenne

SNC : système nerveux central

SNpc : substance noire *pars compacta*

SNpr : substance noire *pars reticulata*

SP : substance P

VA : noyau ventral antérieur du thalamus

VL : noyau ventral latéral du thalamus

WT : type sauvage

Remerciements

Je tiens à remercier particulièrement mon directeur de recherche, Dr Jacques L. Michaud, pour sa bienveillance, sa franchise et sa confiance en mes aptitudes. Aussi, je remercie les membres de mon comité de parrainage, Dr Louis-Éric Trudeau et Dre Graziella Di Cristo, pour leur appui et leurs conseils dans ce projet, de même que les membres du comité d'évaluation de ce mémoire.

Également, je tiens à souligner le travail formidable effectué par IH, DC et les membres du laboratoire qui ont beaucoup participé à la réalisation des expériences, notamment CN, une perle rare. Aussi, j'adresse ma plus sincère reconnaissance à CAA pour ses commentaires concernant ce manuscrit, de même que pour son immense sagesse qu'elle me partage au quotidien.

Finalement, ma famille et de nombreux amis ont su jouer un rôle important pour moi, au cours de ce voyage, et bien que leur contribution à ce projet ne soit qu'indirecte, elle n'en est pas moins substantielle. Particulièrement, j'exprime ma gratitude à SM, FP et SC pour leur immense support et les réseautages scientifiques, de même qu'aux membres de mon Breakfast Club, YCV et SLG, pour leur hospitalité et leur amour inconditionnel des déjeuners.

Chapitre 1 : Introduction

1.1. Les pathologies du mouvement

Les pathologies du mouvement constituent un ensemble de perturbations motrices involontaires qui s'expriment sous la forme d'un excès ou un manque de mouvement. Ces dysfonctions ne peuvent être contrôlées par la pensée et ne sont pas causées par une faiblesse musculaire (Abdo et al., 2010). Différentes manifestations de ces troubles incluent, entre autres, la dystonie, la dyskinésie, les tics, la rigidité, etc. Par ailleurs, certaines pathologies complexes peuvent présenter plusieurs de ces signes à la fois, comme les maladies de Parkinson (MP) et de Huntington (MH) (Abdo et al., 2010).

A priori, la prévalence des troubles du mouvement, tous confondus, est d'environ 20% chez les 50-59 ans, et augmente progressivement avec l'âge, passant à environ 50% chez les 80-89 ans (Wenning et al., 2005; Bach et al., 2011). De même, on les retrouve aussi chez les enfants d'âge scolaire, la prévalence des tics étant de >20%, par exemple (Kurlan et al., 2002). La population étant vieillissante, de récentes projections indiquent que ces nombres augmenteront de façon remarquable, d'ici 2050. Notamment, le nombre de patients atteints de dystonie, de la MP et de la MH pourrait s'accroître de >40%, >90% et >25%, respectivement (Bach et al., 2011).

Économiquement, les pathologies du mouvement représentent une charge considérable pour de nombreux pays. Par exemple, la MP et la MH génèrent, à elles seules, des frais médicaux directs et indirects par patient de plus de 22 800 dollars américains (30 173 \$ canadiens) et 21 605 livres sterling (34 540 \$ canadiens), respectivement, ce qui représente plusieurs milliards de dollars par année (Kowal et al., 2013; Jones et al., 2016). Ces deux

maladies sont neurodégénératives et sont souvent caractérisées par un amalgame de plusieurs signes cliniques apparaissant progressivement dans plusieurs systèmes, tels que des anomalies de la démarche, des déficits cognitifs, des problèmes gastro-intestinaux, etc. Cependant, les signes moteurs sont généralement parmi les premiers à survenir dans les stades précoces de ces maladies et parmi les premiers pour lesquels les patients décident de consulter un médecin (Kirkwood et al., 2001; Walter et al., 2013). Néanmoins, il n'est pas toujours simple d'établir le diagnostic de certaines pathologies motrices, comme la dystonie (Jinnah and Factor, 2015). En effet, la dystonie étant un signe moteur non pathognomonique, il est donc possible de l'observer seule ou, encore, jumelée à plusieurs autres signes, comme dans les maladies de Parkinson et de Huntington (Camargos and Cardoso, 2016).

1.1.1. Dystonie

La dystonie est définie comme un trouble moteur caractérisé par des contractions musculaires involontaires et soutenues produisant des torsions et des postures anormales (Albanese et al., 2013). Il s'agit donc d'un signe clinique dit hyperkinétique où des mouvements involontaires viennent parasiter les mouvements volontaires. Conséquemment, des symptômes moteurs comme de la douleur chronique, des crampes musculaires et une perte de coordination motrice viennent perturber la qualité de vie de plusieurs patients.

Aussi, la classification des différents types de dystonie s'effectue selon plusieurs critères. Notamment, la dystonie peut se présenter individuellement ou de façon concomitante avec d'autres troubles cliniques. De plus, elle peut être transmise génétiquement ou alors apparaître conséquemment à une lésion cérébrale, une utilisation médicamenteuse, une toxine, une

dégénérescence, etc. Ainsi, elle est classifiée comme focale, lorsque l'atteinte se limite à un groupe musculaire particulier, ou bien généralisée, lorsque l'atteinte est distribuée dans tout le corps du patient (Jinnah and Factor, 2015; Camargos and Cardoso, 2016).

Étant donné que le bagage génétique d'un individu peut contribuer à l'expression et à la pénétrance d'une pathologie, plusieurs études ont visé à mettre en lumière les gènes responsables de ce trouble moteur hyperkinétique (Cooper et al., 2013; Fuchs and Ozelius, 2013). Les mutations retrouvées chez plusieurs patients ont permis d'identifier une multitude de gènes jouant un rôle dans certaines formes de dystonie, tels que *TOR1A* dans la dystonie à début précoce, *THAP1* dans la dystonie débutant à l'adolescence et *ANO3* dans la dystonie craniocervicale à début tardif (Ozelius et al., 1997; Fuchs et al., 2009; Charlesworth et al., 2012). Avec l'amélioration des techniques de séquençage génétique au cours des dernières décennies, plus de 200 gènes ont pu être identifiés et associés à divers types de dystonie (van Egmond et al., 2015). Par ailleurs, bien que la plupart des mutations soient transmises des parents à leurs enfants, un nombre grandissant d'entre elles, dites *de novo*, sont retrouvées spontanément chez des enfants dont les parents sont sains, à l'instar de *TUBB4A*, *RARB*, *ADCY5* et plusieurs autres (Fuchs and Ozelius, 2013; Carapito et al., 2015; Srour et al., 2016).

La dystonie est typiquement associée à une dysfonction des ganglions de la base, notamment au striatum (Narbona et al., 1984; Goto et al., 2005), même si des données récentes montrent qu'elle pourrait aussi être reliée à une anomalie cérébelleuse et/ou une altération du système dopaminergique (Sato et al., 2008; Batla et al., 2015; Kaji et al., 2018). Ainsi, l'étude de la fonction de ces gènes, de leur patron d'expression et de leurs rôles dans le développement des ganglions de la base, en conditions normales et pathologiques, s'avère nécessaire à la

compréhension de la pathologie et au développement de nouvelles stratégies de dépistage et de traitements.

1.2. Ganglions de la base

Les ganglions de la base sont des structures sous-corticales qui sont impliquées dans l'exécution automatique de plans moteurs appris (Marsden, 1982). Cela signifie qu'ils contribuent à plusieurs facettes de la motricité, dont la cinématique, l'apprentissage, la composante motivationnelle, etc (O'Doherty et al., 2004; Rueda-Orozco and Robbe, 2015). Entre autres, les noyaux de la base participent à l'initiation et/ou la sélection des actions (Balleine et al., 2009; Tecuapetla et al., 2016) et à en contrôler l'exécution (Redgrave et al., 2010). Ils sont aussi impliqués dans le regroupement et la consolidation des séquences d'une action (Graybiel, 1998), de même que dans la motivation implicite et explicite à effectuer ces actions (Mazzoni et al., 2007; Moiseello et al., 2009; Wong et al., 2015). Ainsi, les ganglions de la base contribuent au contrôle moteur en filtrant les commandes motrices, ce qui permet une fluidité du mouvement.

Les structures considérées comme la porte d'entrée des noyaux de la base sont le striatum, composé des noyaux caudé, putamen et accumbens, et dans une moindre mesure le noyau sous-thalamique (NST) (figure 1). Les afférences qu'ils reçoivent sont principalement glutamatergiques et proviennent majoritairement du cortex. À l'opposé, les structures considérées comme la porte de sortie des ganglions de la base sont représentées par le segment interne du globus pallidus (GPi) et la substance noire *pars reticulata* (SNpr). Ces structures projettent vers le thalamus et le tronc cérébral. Finalement, d'autres structures intermédiaires, à l'instar du segment externe du globus pallidus (GPe) et de la substance noire *pars compacta*

(SNpc), permettent une modulation des signaux et un raffinement du contrôle moteur. En ce qui a trait à la dystonie, l'étude rigoureuse des noyaux de la base, notamment le striatum, est de mise puisqu'une dysfonction striatale semble souvent être une cause sous-jacente de cette pathologie (Goto et al., 2005).

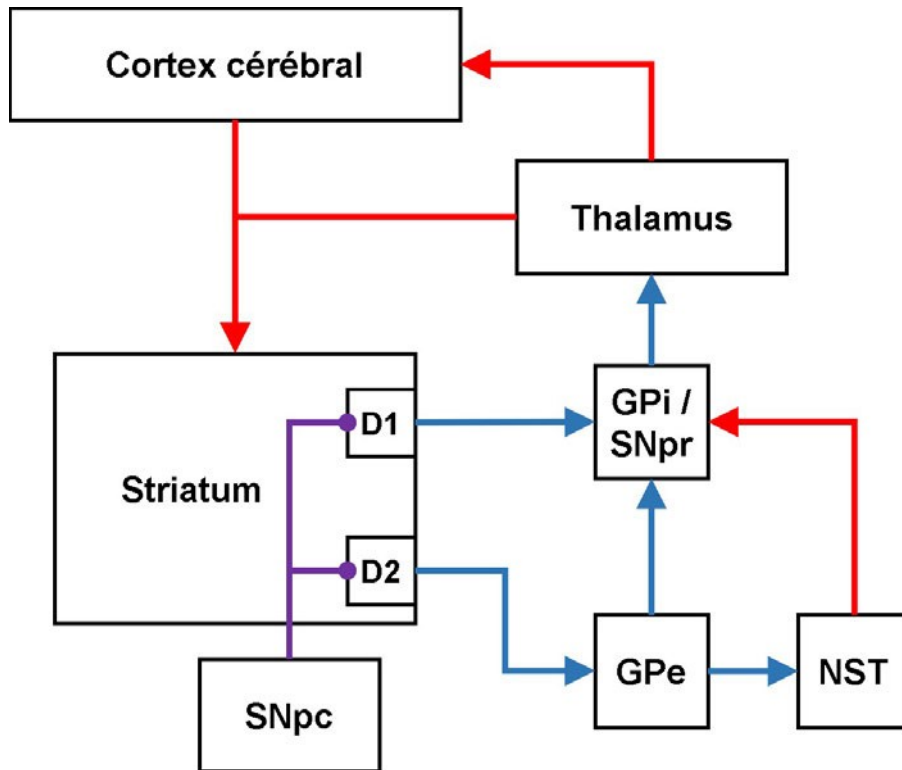


Figure 1. Organisation fonctionnelle de la circuiterie désinhibitrice des ganglions de la base. Les NEMs du striatum sont activés par les projections glutamatergiques en provenance du cortex et du thalamus. Les projections dopaminergiques de la SNpc viennent moduler la signalisation striatale en activant les NEMs de la voie directe et en inhibant ceux de la voie indirecte par leur action sur les récepteurs D1 et D2, respectivement. GPi/SNpr : complexe formé du segment interne du globus pallidus et de la substance noire *pars reticulata*; GPe : segment externe du globus pallidus; NST : noyau sous-thalamique; SNpc : substance noire *pars compacta*. Rouge : projections glutamatergiques; bleu : projections gabaergiques; mauve : projections dopaminergiques.

1.2.1. Cytoarchitecture neuronale du striatum

Typiquement, on subdivise le striatum en portion dorsale et ventrale. Cette dernière est formée du noyau accumbens qui est largement impliqué dans la motivation et le phénomène de récompense. Ainsi, sans être impliqué dans l'apprentissage moteur d'une tâche, le noyau accumbens est particulièrement important dans la composante motivationnelle à commettre telle ou telle action dans le but d'obtenir la récompense qui y est rattachée (Cardinal et al., 2002). Conséquemment, le striatum ventral est un acteur de première ligne dans les phénomènes de dépendance, comme dans la toxicomanie, le jeu compulsif (*gambling*) et la dépendance au sucre (Di Chiara et al., 2004; Avena et al., 2008; Zhang et al., 2015a). Quant au striatum dorsal, il est formé des noyaux caudé et putamen et est davantage impliqué dans l'intégration des signaux sensoriels, la sélection d'un plan moteur approprié pour parvenir à un but, mais aussi, il est plus actif dans les phases initiales d'apprentissage d'une tâche, particulièrement en ce qui a trait à l'association entre un stimulus et une réponse comportementale (O'Doherty et al., 2004; Yin and Knowlton, 2006). Cet apprentissage est donc à la base de la formation de nouvelles habitudes (White, 1997; Packard and Knowlton, 2002).

Anatomiquement, le striatum est constitué de deux compartiments hétérogènes, la matrice et les striosomes. La contribution exacte de chaque compartiment aux fonctions du striatum demeure encore matière à débat. Cependant, des données récentes suggèrent que la matrice hébergerait les neurones épineux moyens (NEMs) formant les voies de sortie, nommées directe et indirecte (Crittenden and Graybiel, 2011). Parallèlement, les striosomes forment une structure semblable à un labyrinthe au sein de la matrice striatale (Bloem et al., 2017; Miyamoto et al., 2018). C'est pour cette raison qu'ils donnent l'impression d'être des trous (*patches*) lorsqu'ils sont observés en coupes coronales. Ces striosomes renfermeraient les NEMs projetant vers la

SNpc, de même que des interneurons capables de moduler l'activité des neurones de la matrice (Crittenden and Graybiel, 2011).

Au sein du striatum, les neurones épineux moyens constituent la plus grande population neuronale locale, soit environ 90-95% des neurones striataux chez la souris (Gerfen and Surmeier, 2011). Ce sont des cellules capables de transmettre des signaux, entre autres, par la relâche d'acide γ -aminobutyrique (GABA) et de neuropeptides, tels que la substance P (SP) et l'enképhaline (ENK). Par ailleurs, la complexité du signal transmis par les NEMs est modulée par leur interaction avec d'autres neurones locaux, comme des interneurons GABAergiques et cholinergiques qui participent au raffinement de la signalisation striatale (Lee et al., 2017; Tepper et al., 2018). De plus, il est intéressant de souligner que la proportion de NEMs et d'interneurones est sujette à une variation entre les différentes espèces. En effet, bien que les interneurons ne représentent qu'environ 5% de la population neuronale du striatum chez le rat et la souris, ils constitueraient plus de 20% de celle du primate et de l'humain (Graveland and DiFiglia, 1985; Graveland et al., 1985).

1.2.2. Afférences du striatum

Le striatum est un noyau complexe et le plus volumineux des ganglions de la base. Comme mentionné plus haut, le striatum est la principale porte d'entrée des ganglions de la base. La majeure partie des projections afférentes qu'il reçoit provient essentiellement du cortex, mais également des noyaux ventral antérieur (VA) et ventral latéral (VL) du thalamus (complexe VA/VL) (Hunnicut et al., 2016). Ces projections corticales et thalamiques sont glutamatergiques, donc excitatrices, et sont responsables de l'activité neuronale générée dans le

striatum, dont les cellules nerveuses sont généralement quiescentes en condition de repos (figure 1). Ainsi, un signal afférent fort et corrélé, de la part des neurones pyramidaux du cortex, est nécessaire pour induire une réponse des NEMs qui forment la principale population neuronale du striatum (Calabresi et al., 1987; Fino and Venance, 2010). Conséquemment, les NEMs permettent de détecter et d'intégrer l'information sensorielle pertinente à la modulation du comportement de l'individu afin qu'il s'adapte adéquatement à son environnement ou à sa situation lorsque nécessaire (Hollerman et al., 1998; Hikosaka et al., 2000).

En plus de la grande quantité d'afférences corticales, l'activité des neurones épineux moyens est aussi influencée par l'information relayée par des neurones dopaminergiques provenant de la SNpc, des neurones glutamatergiques en provenance du thalamus, de même que des interneurons GABAergiques et cholinergiques locaux. De plus, les NEMs peuvent aussi moduler leur activité entre eux par une relâche locale de neurotransmetteurs et neuropeptides.

1.2.3. Efférences du striatum

1.2.3.1. Voies directes et indirectes

1.2.3.1.1. Composition cellulaire des voies directes et indirectes

En ce qui a trait aux projections quittant le striatum, ce sont les NEMs qui projettent leur axone au GPi et à la SNpr, de même qu'au segment externe du globus pallidus. Les neurones épineux moyens qui projettent au complexe GPi/SNpr forment la voie dite directe ou striato-nigrée. Pour leur part, les NEMs qui projettent au GPe forment la voie dite indirecte ou striato-pallidale. Ces deux voies de sortie, directe et indirecte, agissent de façon parallèle et

complémentaire afin d'assurer un contrôle optimal du mouvement. Outre les cibles auxquelles elles projettent, les voies striato-nigree et striato-pallidale peuvent être discriminées par le type de récepteur dopaminergique qu'elles expriment (figure 1). En effet, les neurones striataux exprimant le récepteur dopaminergique de type D1 appartiennent à la voie directe, ce qui représente jusqu'à 49% de tous les NEMs chez la souris adulte (Kreitzer and Malenka, 2008). De plus, un neuropeptide est aussi spécifique à ce groupe neuronal, soit la substance P. En contrepartie, les neurones exprimant le récepteur dopaminergique de type D2 sont associés à la voie indirecte et représentent eux aussi jusqu'à 49% des NEMs (Kreitzer and Malenka, 2008). Concomitamment, ces mêmes neurones sont aussi reconnaissables au récepteur à l'adénosine A2A qu'ils expriment, de même qu'au neuropeptide qu'ils contiennent, l'enképhaline. En dépit de l'expression préférentielle des récepteurs D1 ou D2 dans ces deux voies fonctionnelles, il existe également un faible pourcentage (<5%) de NEMs exprimant les deux récepteurs dopaminergiques à la fois (Matamales et al., 2009; Ade et al., 2011; Thibault et al., 2013). Néanmoins, leur rôle et leur contribution dans la signalisation des noyaux basaux restent obscurs (Lee et al., 2004; Rashid et al., 2007; Frederick et al., 2015; Gagnon et al., 2017). Finalement, bien que les neurones appartenant à l'une ou l'autre des voies se distinguent par quelques caractéristiques de leur composition cellulaire, les deux sous-populations coexistent de façon entremêlée dans le même compartiment, à savoir la matrice striatale (Gerfen and Surmeier, 2011; Gangarossa et al., 2013; Ren et al., 2017).

1.2.3.1.2. Cascade(s) moléculaire(s) associée(s) aux récepteurs D1 et D2

Bien que fonctionnellement distinctes, les voies directe et indirecte sont complémentaires puisqu'elles travaillent en synergie pour un contrôle précis du mouvement. Grâce à la signalisation médiée par les récepteurs dopaminergiques de type D1, la voie directe exerce une influence activatrice sur le mouvement en facilitant l'activation du cortex. À l'opposé, la transduction du signal médiée par les récepteurs D2 de la voie indirecte influence négativement le mouvement en inhibant l'influence excitatrice qu'a le thalamus sur le cortex.

En effet, les récepteurs D1 et D2 sont des récepteurs métabotropes à 7 passages transmembranaires et sont couplés à des protéines G qui déclenchent des cascades de signalisation et interagissent avec des protéines effectrices. Il existe 5 sous-types de récepteurs à la dopamine, encodés par 5 gènes différents, qui sont regroupés en 2 familles selon le type de protéines G auquel ils se lient (Beaulieu and Gainetdinov, 2011). La famille de type D1 comprend les sous-types de récepteurs D1 et D5, alors que la famille de type D2 comprend les sous-types D2, D3 et D4. Au niveau du striatum, seuls les sous-types D1, D2, D3 et D5 sont exprimés dans les populations neuronales. En ce qui a trait aux NEMs, ceux de la voie directe expriment les sous-types D1 et D3, alors que ceux de la voie indirecte expriment le sous-type D2. Pour sa part, le sous-type D5 n'est pas présent dans les NEMs, mais plutôt dans des interneurons locaux. Malgré la présence de plusieurs sous-types dans cette structure sous-corticale, ce sont les D1 et D2 qui y sont le plus abondants, les niveaux de D3 étant relativement faibles dans les noyaux caudé et putamen (Bouthenet et al., 1991; Levesque et al., 1992; Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Gurevich et al., 2016).

Dans le striatum, les récepteurs D1 sont couplés à des protéines de type $G\alpha_{olf}$, et dans une moindre mesure $G\alpha_s$, qui viennent stimuler l'adénylate cyclase et la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), un second messenger (Zhuang et al., 2000). L'AMPc enclenche alors une cascade moléculaire permettant la transduction du signal, ce qui aura pour effet d'activer le neurone. Une des fonctions de ce second messenger est l'activation de la protéine kinase A (PKA), dont l'action principale est la phosphorylation de multiples cibles intracellulaires. Cette phosphorylation par la PKA active, entre autres, la protéine de liaison des éléments de réponse à l'AMPc (CREB), un facteur de transcription qui s'homodimérise avant de lier des séquences d'ADN (acide désoxyribonucléique), nommées éléments de réponse à l'AMPc, pour moduler l'expression de plusieurs gènes (Nestler, 2001; Dudman et al., 2003; Mahajan et al., 2009). Suivant son activation par un agoniste comme la dopamine, le récepteur D1 sera désensibilisé par la protéine β -arrestine qui liera le récepteur et l'empêchera d'activer ses protéines G (Del'guidice et al., 2011). Alternativement, les récepteurs D2 sont couplés à des protéines de type $G\alpha_o$, et moindrement $G\alpha_i$, qui inhibent la production d'AMPc par l'adénylate cyclase, résultant en une inhibition de la signalisation intracellulaire, notamment par la PKA et la CREB (Jiang et al., 2001; Gazi et al., 2003). Les récepteurs de type D2 sont eux aussi sujets à des mécanismes de désensibilisation comme les D1.

Spatialement, les récepteurs de type D1 se retrouvent à la membrane postsynaptique des NEMs et leur activation induit une augmentation de l'excitabilité du neurone. Cette modulation s'effectue de façon directe en augmentant la phosphorylation des récepteurs glutamatergiques AMPA et NMDA et de façon indirecte par l'activation d'une cascade moléculaire qui stimule l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage (type L) (Surmeier et al., 2010; Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Gardoni and Bellone, 2015). À l'opposé, les récepteurs de type D2 se

retrouvent, eux aussi, à la membrane postsynaptique des NEMs, mais également de l'autre côté de la fente synaptique, c'est-à-dire à la membrane présynaptique (autorécepteurs). À la membrane postsynaptique, l'activation des récepteurs D2 diminue l'excitabilité neuronale des NEMs, car elle est responsable de l'inhibition de l'activité des canaux calciques dépendants du voltage (type L) et de l'activation des canaux potassiques rectifiants activés par les protéines G, ou GIRK, ce qui induit une hyperpolarisation de la membrane (Beaulieu and Gainetdinov, 2011). À la membrane présynaptique, l'activation des autorécepteurs D2 des terminaisons axonales des neurones dopaminergiques induit l'activation de canaux potassiques dépendants du voltage Kv1.2, ce qui hyperpolarise la membrane et inhibe temporairement la relâche des vésicules synaptiques de dopamine. De plus, les récepteurs D2 présynaptiques augmentent l'activité et l'expression du transporteur à dopamine, une protéine responsable de la recapture de la dopamine de la fente synaptique (Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Ford, 2014). Globalement, l'excitabilité des neurones épineux moyens est donc modulée par l'activité des neurones qui communiquent avec eux.

1.2.3.1.3. Rôle fonctionnel complémentaire des voies directes et indirectes

Il existe ainsi un équilibre fonctionnel entre les rôles des récepteurs dopaminergiques D1 et D2 au sein des voies striato-nigree et striato-pallidale. Tel que mentionné précédemment, les voies directe et indirecte travaillent de pair et jouent un rôle essentiel au maintien de l'équilibre inhibition/désinhibition qu'ont les noyaux de la base sur le cortex. Les NEMs des 2 voies étant activés par les projections glutamatergiques provenant du cortex et du thalamus, la libération de dopamine dans le striatum vient concomitamment augmenter l'excitabilité des neurones de la

voie directe et diminuer l'activité des neurones de la voie indirecte (figure 1). Ainsi, l'activation de la voie directe viendrait activer le plan moteur désiré pour une tâche, tandis que l'inhibition de la voie indirecte servirait à inhiber des plans moteurs concurrents. Cette complémentarité est connue comme l'hypothèse du centre-pourtour des ganglions de la base qui définit leur fonctionnement et expliquerait comment une rupture de cet équilibre serait à la base des pathologies du mouvement (Beck and Hallett, 2011; Schroll and Hamker, 2013).

1.2.3.2. Circuit désinhibiteur

1.2.3.2.1. Circuit désinhibiteur en condition normale

Traditionnellement, la connectivité neuronale au sein des ganglions de la base est décrite comme un circuit de désinhibition (Chevalier and Deniau, 1990; Purves et al., 2001). Comme mentionné précédemment, les NEMs du striatum sont quiescents au repos en condition non pathologique, donc ils n'affectent pas les neurones du globus pallidus qui sont intrinsèquement actifs et déchargent de façon tonique. Cette activité est naturellement responsable de l'inhibition du complexe VA/VL du thalamus, par la relâche d'un neurotransmetteur inhibiteur (GABA) (figure 1). Son activité ainsi diminuée, le thalamus est moins en mesure d'activer les neurones moteurs corticaux, à l'aide de son neurotransmetteur excitateur, le glutamate (Purves et al., 2001).

À l'opposé, en condition de mouvement, il y a une activation des voies directe et indirecte qui permet une fluidité et une bonne coordination de l'action. Premièrement, on parle de désinhibition, car la voie directe a un effet net désinhibiteur sur le cortex. En effet, lorsque les neurones striato-nigrés sont activés transitoirement par des projections corticales, ils inhibent

l'activité tonique des neurones du GPi. Par conséquent, cela a pour effet de relâcher le contrôle inhibiteur qu'a cette structure sur le complexe VA/VL du thalamus qui, dès lors, devient en mesure d'activer les neurones moteurs corticaux (Purves et al., 2001).

En contrepartie, la voie indirecte a un effet net inhibiteur sur le cortex. L'activation transitoire des neurones striato-pallidés induit l'inhibition de l'activité tonique des neurones du GPe, dont les projections inhibitrices modulent négativement, en conditions basales, le GPi et le noyau sous-thalamique (NST). D'autre part, le NST envoie, lui aussi, des projections activatrices glutamatergiques au GPi. Conséquemment, l'inhibition du GPe par l'activation de la voie indirecte vient relâcher le « frein » qu'il place sur le GPi, en permettant également au NST de jouer son rôle activateur sur le GPi. Alors, l'activité tonique nette du GPi est augmentée, ce qui diminue davantage l'influence excitatrice qu'a le thalamus sur les aires corticales motrices (Purves et al., 2001).

En un mot, la modulation fonctionnelle médiée par les neurones D1 induit une inhibition des neurones du « centre », c'est-à-dire une relâche sélective du frein du pallidum interne, et permet donc la sélection du schéma moteur souhaité. À l'opposé, l'activité médiée par les NEMs exprimant le récepteur D2 vient désinhiber le « pourtour », contribuant ainsi à prévenir l'intrusion de plans moteurs parasites dans le mouvement réellement souhaité. L'organisation en centre-pourtour est donc favorable à l'exécution de tâches simples et plus complexes, car elle permet un raffinement du signal (Purves et al., 2001; Beck and Hallett, 2011).

1.2.3.2.2. Circuit désinhibiteur en condition pathologique

En conditions pathologiques, par exemple dans la maladie de Parkinson, il y a un bris de l'équilibre dans la relation centre-pourtour. Cette dysfonction de la boucle cortico-striato-pallido-thalamo-corticale serait à l'origine des signes moteurs observés chez les patients parkinsoniens. La ou les causes exactes de la MP restent débattues, mais plusieurs hypothèses ont vu le jour. Entre autres, une dégénérescence prédominante des neurones de la substance noire *pars compacta* pourrait être responsable de signes, tels que la bradykinésie (Damier et al., 1999; Surmeier, 2018). Comme les neurones nigro-striés projettent au striatum dorsal, la théorie « fréquentielle » suggère que les troubles parkinsoniens tireraient leur origine d'un changement dans la fréquence de l'activité des structures de sortie des noyaux de la base. Ceci s'exprimerait par une hypoactivité de la voie directe et, réciproquement, par une hyperactivité de la voie indirecte (Brittain and Brown, 2014; Borgkvist et al., 2015). Alternativement, le modèle « oscillatoire » propose qu'il y ait un déséquilibre entre diverses fréquences d'oscillations dans les circuits. Ces fréquences proviennent du degré de synchronisation de l'activité de plusieurs neurones. Ainsi, il y aurait un surplus d'ondes thêta et bêta, considérées comme anti-kinétiques, de même qu'un manque d'oscillations gamma, pro-kinétiques, ce qui viendrait perturber le mouvement en produisant l'akinésie (Brown, 2003; Foffani et al., 2003).

Analogiquement, des perturbations des voies directe et indirecte, causant un bris de la relation centre-pourtour, seraient également présentes dans la dystonie. En effet, une étude récente montre qu'il y aurait une activation excessive de la voie striato-nigrée, de même qu'une hypoactivation de la voie striato-pallidale (Simonyan et al., 2017). D'autres études supportent aussi une activité altérée dans le striatum, de même que dans le pallidum et le thalamus (Vitek, 2002; Zhuang et al., 2004; Starr et al., 2005). Comme décrit précédemment, certaines formes de

dystonie peuvent survenir à l'âge adulte, suite à des lésions ou autres, mais d'autres formes surviennent de façon précoce dans la jeunesse, suggérant une implication développementale des gènes mutés.

1.2.4. Développement du striatum

1.2.4.1. L'éminence ganglionnaire

Lors du développement embryonnaire, le striatum est formé à partir de l'éminence ganglionnaire, une structure transitoire donnant naissance à plusieurs types cellulaires qui migrent vers diverses régions cérébrales. Cette structure est subdivisée en 3 sous-régions, soit l'éminence ganglionnaire médiane (EGM), latérale (EGL) et caudale (EGC). L'EGM est responsable de la formation d'interneurones GABAergiques qui migrent de façon tangentielle vers le néocortex (Moreno et al., 2009). Pour sa part, l'EGL est non seulement à l'origine de la migration de nouveaux interneurones dopaminergiques vers le bulbe olfactif par la coulée migratoire rostrale, mais c'est également elle qui donne naissance au striatum et au tubercule olfactif (Deacon et al., 1994; Yun et al., 2003). Enfin, l'EGC est une région riche en progéniteurs cellulaires, tels que des neurones, interneurones et de la glie, et qui est principalement responsable de leur migration vers différentes régions, comme l'hippocampe et le cortex (Nery et al., 2002). Finalement, puisque l'EGL joue un rôle important dans la genèse du striatum, elle semble intimement reliée à l'apparition de troubles moteurs, comme la dystonie primaire, chez les individus porteurs de mutations dans des gènes à risque, tels que *TORIA*, *THAPI*, *RARB*, etc.

1.2.4.1.1. Principaux gènes développementaux de l'éminence ganglionnaire latérale

Pendant le développement du télencéphale, qui est la vésicule encéphalique de laquelle est issue l'éminence ganglionnaire, plusieurs gènes agissent et interagissent afin de permettre le développement différentiel des multiples régions qui le composent (Hebert and Fishell, 2008). En premier lieu, il y a une séparation des domaines dorsal et ventral par *GLI3*, induisant une identité dorsale, et *SHH*, dont l'influence donne un caractère ventral. Une dysfonction ou une ablation de ces gènes a été reliée, entre autres, à l'entrave du développement de l'hippocampe et du plexus choroïdien (Grove et al., 1998; Theil et al., 1999; Rash and Grove, 2011). Chez la souris *Shh*^{-/-}, il est possible de restituer l'identité ventrale des cellules en effectuant l'ablation concomitante de *Gli3* (Rallu et al., 2002). Néanmoins, la perte du gène *Foxg1*, un gène ventral comme *Shh*, résulte en l'échec du développement de l'identité ventrale, et ce, sans possibilité de secours par la perte de *Gli3* (Martynoga et al., 2005; Hanashima et al., 2007).

Parallèlement, *Foxg1* tire aussi son importance de son habileté à induire l'expression de *Fgf8*, un gène essentiel dans le développement du télencéphale ventral de la souris et du poisson-zèbre (Shinya et al., 2001; Gutin et al., 2006; Storm et al., 2006). Ainsi, il est connu que des altérations de la signalisation médiée par la famille des gènes *FGF* peuvent avoir de lourdes conséquences développementales. Par exemple, l'ablation de *Fgf8* induit une perte de l'expression de *Nkx2.1* et de *Gsh2*, respectivement nécessaires au développement de l'EGL et de l'EGL (Sussel et al., 1999; Toresson and Campbell, 2001; Yun et al., 2003; Martynoga et al., 2005; Gutin et al., 2006).

Outre *SHH* et les *FGF*, d'autres facteurs importants, tels que l'acide rétinoïque (AR), sont aussi impliqués dans le développement de structures dites intermédiaires, c'est-à-dire qui se

situent entre le télencéphale ventral et le cortex, comme l'éminence ganglionnaire latérale (Marklund et al., 2004). Comme mentionné précédemment, la dystonie est traditionnellement attribuée à une altération du striatum, lui-même formé à partir de l'EGL. Or, il se trouve que l'AR joue un rôle important dans la spécification intermédiaire des cellules neurales de l'EGL par son action sur la signalisation des FGFs et *Meis1/2*, gène proneuronal de l'EGL (Marklund et al., 2004; Rataj-Baniowska et al., 2015). Par ailleurs, il est important de mentionner que l'AR est majoritairement produit par l'enzyme RALDH3 au sein de l'EGL, durant les stades embryonnaires, et qu'il influence la différenciation des neurones striataux (Toresson et al., 1999; Molotkova et al., 2007).

1.3. Acide rétinoïque

1.3.1. Importance de l'acide rétinoïque

L'acide rétinoïque est un dérivé de la vitamine A (rétinol) et représente un élément essentiel de la nutrition. En effet, il a une fonction vitale dans le développement de plusieurs organes (yeux, cœur, diaphragme, etc.), mais il est aussi particulièrement impliqué dans le développement du système nerveux central (Simeone et al., 1995; Maden, 2007; Zieger and Schubert, 2017). Par ailleurs, des études *in vitro* et *ex vivo* ont aussi montré les effets de la vitamine A sur la croissance des neurites de plusieurs types de cellules neuronales en culture, mais aussi sur la différenciation neuronale (Edwards and McBurney, 1983; Clagett-Dame et al., 2006; Jacobs et al., 2011). Ainsi, une régulation précise et dynamique du métabolisme de l'AR est nécessaire puisqu'un manque ou un excès dans l'apport journalier en vitamine A peut mener

à des conséquences importantes, telles que la cécité, l'hypertension, voire la mort (Cohlan, 1953; Lammer et al., 1985; Maden et al., 1998).

1.3.2. Synthèse et fonction intracellulaire de l'acide rétinoïque

La synthèse de l'acide rétinoïque commence par l'absorption intestinale du rétinol provenant de la consommation. Le rétinol se lie à des protéines sécrétées par le foie, nommées RBP4 (Retinol Binding Protein 4), qui assurent son transport jusqu'aux cellules cibles. Un transporteur membranaire spécifique, le STRA6, fait ensuite transloquer le rétinol dans le cytoplasme des cellules. Ensuite, deux étapes consécutives d'oxydation ont lieu. D'abord, le rétinol est converti en rétinaldéhyde par l'alcool déshydrogénase ou la rétinol déshydrogénase, deux enzymes oxydoréductrices. Puis, ce rétinaldéhyde est oxydé en AR par la rétinaldéhyde déshydrogénase (RALDH). Des protéines cellulaires de liaison à l'AR s'occupent alors de son transport nucléaire (Duester, 2008).

Dans le noyau des cellules cibles, l'AR se lie principalement à des hétérodimères formés d'un récepteur à l'acide rétinoïque (RAR) et d'un récepteur X des rétinoïdes (RXR), leurs principaux partenaires. Chez les mammifères, il existe 3 types de ces récepteurs nucléaires (RAR α , RAR β , RAR γ), dont les fonctions, les cibles moléculaires et les patrons d'expression varient, mais se chevauchent aussi (Dolle, 2009). Suivant l'hétérodimérisation d'un RAR et d'un RXR, le complexe RAR-RXR est en mesure de s'attacher à des séquences d'ADN qu'il reconnaît en amont du promoteur de plusieurs gènes cibles. Ces motifs d'ADN, nommés éléments de réponse à l'AR (ERAR), servent de sites d'amarrage au complexe RAR-RXR qui est un facteur de transcription activé par son ligand. Somme toute, suivant sa liaison avec l'AR, le

complexe RAR-RXR lié à un ERAR recrute des coactivateurs ou corépresseurs afin de moduler l'expression génique (Shen et al., 1993).

1.3.3. Patrons d'expression des RARs

Chez la souris, tôt durant la période embryonnaire, *Rara* semble avoir un patron d'expression plutôt diffus au sein du système nerveux central (SNC), ayant été détecté assez uniformément dans les régions rostrales du cerveau jusqu'au tronc cérébral (Ruberte et al., 1991; Dolle, 2009). Pour sa part, *Rarb* semble être plus faiblement exprimé et de façon plus circonscrite dans des régions plus caudales de l'encéphale, comme le tronc cérébral (Ruberte et al., 1991; Dolle, 2009). Finalement, *Rarg* montre également un patron assez diffus à l'intérieur du SNC, surtout en régions plus caudales.

À partir de E9.5, les patrons d'expression des 3 gènes *Rar* se modifient. En effet, *Rara* montre un patron d'expression ubiquitaire, ayant été détecté dans la plupart des tissus autant à l'intérieur qu'à l'extérieur du SNC. Dans le SNC, l'expression de *Rarb* augmente et devient surtout régionalisée à l'EGL, alors qu'à l'extérieur du SNC, *Rarb* est détecté dans plusieurs tissus, comme l'œil et les intestins. Quant à lui, *Rarg* voit son expression réduire jusqu'à disparaître du SNC, mais demeure assez diffus à l'extérieur dans des régions telles que les poumons, le cœur et le cartilage (Dolle, 2009). Ainsi, *Rara*, *Rarb* et *Rarg* sont coexprimés dans le tube neural en développement, selon des patrons différents, mais qui se chevauchent dans une certaine mesure. Entre autres, ils seraient nécessaires à la bonne segmentation des rhombomères par leur action sur les gènes *Hox* (Ruberte et al., 1991; Dupe et al., 1997; Dupe et al., 1999). De plus, bien que *Rara* et *Rarb* semblent être tous les deux présents dans le striatum durant une large

partie du développement, *Rarb* y prédomine rapidement et y est spécifique (Ruberte et al., 1993; Mollard et al., 2000; Liao and Liu, 2005; Liao et al., 2005).

Chez la souris adulte, le patron d'expression de *Rara* et *Rarg* est détecté dans le SNC de manière assez diffuse. Cependant, *Rarb* demeure celui qui prédomine dans le striatum de la souris mature (Krezel et al., 1999). Vu l'expression préférentielle et plus abondante de RARB dans le striatum, c'est ce récepteur qui serait responsable de la médiation de la cascade de signalisation de l'AR dans cette structure. Son implication dans la locomotion et les fonctions cognitives est d'ailleurs connue depuis plusieurs années (Chiang et al., 1998; Krezel et al., 1998).

1.3.4. RARB

1.3.4.1. Fonctions de RARB dans le striatum en développement

Autour du 12^e jour développemental embryonnaire (entre E11.5 et E13.5) chez la souris, une importante source d'acide rétinoïque est constituée par les cellules postmitotiques de la zone sous-ventriculaire de l'EGL qui produisent la RALDH3 (Chatzi et al., 2011). Puis, l'expression de la RALDH3 s'estompe progressivement et disparaît de cette région dès la naissance (Li et al., 2000; Niederreither et al., 2002; Liao et al., 2005; Molotkova et al., 2007; Liao et al., 2008). Par la suite, la principale source d'AR dans cette région provient des cellules de l'ATV et de la SNpc qui expriment la RALDH1, dont l'expression augmente à la naissance et demeure élevée même jusqu'à l'âge adulte. À l'aide de leurs projections dopaminergiques, ces cellules de l'ATV et de la SNpc acheminent, par transport antérograde, la RALDH1 aux terminaisons nerveuses qui contactent les NEMs du striatum dorsal, leur assurant un apport en AR (McCaffery and Drager,

1994; Wallen et al., 1999; Smith et al., 2001; Liao et al., 2005; Crandall et al., 2011; Kumar et al., 2012; Sgobio et al., 2017).

Sommairement, des études d'ablation complète du gène *Raldh3* ont montré une ablation de l'activité de l'AR et une diminution de l'expression de *Rarb* et du récepteur D2, chez les souris embryonnaires (Molotkova et al., 2007). L'ablation de *Raldh3* mène également à une altération substantielle de la différenciation des neurones GABAergiques dans le striatum de la souris en développement (Chatzi et al., 2011). De plus, la perte du gène *Rarb* induit une réduction de la population de NEMs, exprimant le récepteur dopaminergique de type D1, qui serait causée par une prolifération diminuée, de même que par une différenciation prématurée de leurs cellules progénitrices (Liao et al., 2008; Rataj-Baniowska et al., 2015). Par ailleurs, le déséquilibre dans la régulation neuronale par RARB serait médié par FGF3 et MEIS1 (Rataj-Baniowska et al., 2015).

1.3.4.2. Fonctions de RARB dans le striatum postnatal

Dans le striatum postnatal, le rôle de RARB est tout aussi important, car ce récepteur reste le RAR exprimé de façon prédominante dans cette région (Krezel et al., 1999). En effet, la perte de *Rarb* engendre des déficits dans la coordination motrice, dans les fonctions cognitives, de même qu'une réponse anormale aux agonistes dopaminergiques chez la souris (Chiang et al., 1998; Krezel et al., 1998; Liao et al., 2008).

Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'expression du récepteur D2 est directement influencée par RARB puisqu'un ERAR est présent en amont de ce gène (Samad et al., 1997; Valdenaire et al., 1998; Balmer and Blomhoff, 2002; Niewiadomska-Cimicka et al., 2017). Étant

une des cibles moléculaires régulées par RARB, cela suggère que les déficits moteurs observés chez les souris *Rarb*^{-/-} pourraient être en partie expliqués par un débalancement de l'équilibre D1/D2, présent entre les voies directe et indirecte des ganglions de la base (Samad et al., 1997; Krezel et al., 1998; Wolf, 1998; Niewiadomska-Cimicka et al., 2017). Ainsi, la perte de fonction du gène *RARB* pourrait causer ces anomalies par la perturbation des circuits striataux, lors du développement du SNC, en affectant la signalisation dopaminergique (Liao et al., 2008; Rataj-Baniowska et al., 2015).

Parallèlement, l'ablation du gène responsable de la seule enzyme produisant l'AR dans le striatum de la souris adulte, *Raldh1*, induit chez cet animal des déficits moteurs empirant avec l'âge et il est suggéré que la signalisation déficitaire de l'AR jouerait un rôle dans la dyskinésie, chez les patients parkinsoniens (Wey et al., 2012; Pan et al., 2019). De plus, alors que l'AR serait nécessaire à la différenciation GABAergique dans l'EGL, la présence de *Raldh1* serait aussi très importante à la neurotransmission GABAergique dans le striatum de la souris adulte (Chatzi et al., 2011; Addae et al., 2012; Kim et al., 2015).

1.3.4.3. Mutations de RARB dans une forme de dystonie progressive à début précoce

Des travaux récents de notre laboratoire ont permis de décrire une cohorte de patients porteurs de mutations *de novo* (p.Arg387Cys, p.Arg387Ser, p.Gly296Ala, p.Leu213Pro) dans le gène *RARB* (Srour et al., 2013; Srour et al., 2016). Ces patients présentaient une microphthalmie, des anomalies intestinales et des déficits cognitifs. De plus, une caractéristique proéminente de leur tableau phénotypique, apparaissant dès l'âge de 1 an, est une régression progressive de leurs fonctions motrices qui serait principalement causée par la dystonie. Par des analyses *in vitro*, il a

été observé que ces mutations *de novo* dans *RARB* augmentent l'activité transcriptionnelle, médiée par l'AR, de 2 à 3 fois au-delà de l'activité endogène du récepteur de type sauvage, indiquant alors un mécanisme de gain de fonction (GDF) du récepteur muté (Srouf et al., 2013; Srouf et al., 2016).

La structure tridimensionnelle de *RARB* montre que les mutations *RARB*^{L213P}, *RARB*^{G296A}, *RARB*^{R387C} et *RARB*^{R387S} sont localisées à l'intérieur de la pochette de liaison du ligand et qu'elles affectent des acides aminés adjacents à ceux établissant un contact direct avec l'AR (Germain et al., 2004). Conséquemment, ces mutations *de novo* pourraient induire un effet de GDF en augmentant l'affinité du récepteur pour la liaison à l'AR. Néanmoins, il est aussi possible que ces mutations agissent en induisant un changement de conformation de *RARB* qui affecterait le recrutement de coactivateurs (Srouf et al., 2013; Srouf et al., 2016).

1.4. Hypothèses et objectifs de recherche

Les patients porteurs de mutations de type GDF dans *RARB* présentent une dystonie progressive à début précoce, ce qui affecte considérablement leur qualité de vie et peut mener au décès (Srouf et al., 2013; Srouf et al., 2016). La dystonie découle notamment d'une dysfonction du striatum, structure cérébrale où *RARB* est exprimé de façon prédominante durant le développement et chez l'adulte. Ainsi, *RARB* semble jouer 2 rôles importants dans cette région : il régule premièrement le développement de neurones épineux moyens exprimant les récepteurs dopaminergiques de types D1 et D2, puis sa présence postnatale serait requise pour la régulation de la signalisation dopaminergique et/ou la survie des NEMs (Rataj-Baniowska et al., 2015).

Bien que le rôle de RARB ait été étudié depuis plusieurs années à l'aide de modèles animaux porteurs de mutations induisant une perte de fonction, rien n'est connu concernant la fonction *in vivo* du récepteur portant une mutation GDF. Notre hypothèse est que l'augmentation de la signalisation de l'acide rétinoïque induit la dystonie chez les patients porteurs de mutations de type GDF dans *RARB* en affectant le développement et/ou la fonction du striatum, possiblement par la perturbation du contrôle homéostatique des mêmes voies moléculaires que celles affectées par la diminution de la signalisation médiée par RARB.

Les objectifs du projet sont donc, d'abord, d'investiguer si des souris portant la mutation de type GDF *Rarb*^{R394C}, homologue de la mutation *de novo* de *RARB* la plus récurrente (*RARB*^{R387C}), montrent un phénotype moteur similaire à celui des patients, puis d'évaluer l'intégrité du striatum de ces souris en utilisant des biomarqueurs spécifiques aux neurones des 2 voies fonctionnelles striatales.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

2.1. Animaux

2.1.1. Génération de souris transgéniques par la technique CRISPR-Cas9

Dans le but d'explorer l'impact sur les fonctions motrices et l'intégrité du striatum de la mutation R387C du gène *RARB*, étant la mutation GDF la plus récurrente chez nos patients, nous avons utilisé la technique de CRISPR-Cas9 afin de générer des souris transgéniques porteuses de la mutation homologue, R394C. Brièvement, le système CRISPR-Cas9 est médié par la protéine Cas9, une endonucléase bactérienne capable de reconnaître de courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées (CRISPR), c'est-à-dire des séquences fréquemment rencontrées dans l'ADN bactérien. Le système CRISPR-Cas9 est un mécanisme de défense adaptatif des procaryotes, permettant l'immunisation de l'hôte contre le matériel génétique étranger. En effet, l'ADN inconnu est intégré dans les séquences CRISPR, puis est transcrit en de petits ARN (acide ribonucléique) interférents qui guident la Cas9 jusqu'aux séquences complémentaires invasives, afin qu'elle les clive (Barrangou and Marraffini, 2014). Naturellement absent dans les cellules eucaryotes, le système CRISPR-Cas9 a été étudié et est désormais exploité dans divers organismes, où il permet d'effectuer des modifications génomiques dans les sites de clivage de la Cas9. Conséquemment, il est possible de manipuler des séquences d'intérêt dans de nombreux gènes, pourvu qu'ils soient reconnus par la Cas9 (Ran et al., 2013).

Ainsi, à l'aide de cette technique, 2 lignées indépendantes de souris portant la mutation homologue R394C ont été produites et maintenues sur un fond génétique de C57BL/6NHsd. Le génotypage a été effectué à l'aide de l'enzyme de restriction HpyCH4IV pour les souris de la 1^{re}

(*Rarb*^{R394C/+}) et de la 2^e lignée (*Rarb*^{R394C/+; A392A/+}). En effet, en plus de porter la mutation GDF, la seconde lignée porte également la mutation A392A, une mutation dite synonyme ou silencieuse, car le nucléotide muté au 392^e codon ne modifie pas l'acide aminé produit, l'alanine. Ainsi, la mutation synonyme A392A ne devrait pas avoir d'impact fonctionnel, mais la 2^e lignée a tout de même été maintenue et testée, afin de vérifier cette éventualité. Finalement, les 2 lignées de souris ont été rétrocroisées, indépendamment, pour un minimum de 3 générations avant le début des tests.

2.1.2. Souris utilisées lors des expériences

Toutes les procédures effectuées lors de ce projet ont été approuvées par le Comité Institutionnel de Bonnes Pratiques Animales en Recherche (CIBPAR) du centre de recherche du CHU Sainte-Justine, en accord avec les principes éthiques du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA). Préalablement séparées selon leur lignée et leur sexe, les souris de type sauvage (WT) cohabitaient avec les hétérozygotes (HET) et ont été élevées dans des conditions d'hébergement standard. Les animaux avaient libre accès à la nourriture et l'eau, ils vivaient à une température ambiante de 22-25°C et selon un cycle de 12h de lumière/12h d'obscurité. Pour chaque lignée, les souris mutantes constituaient le groupe expérimental et elles étaient comparées à leurs congénères WT, représentant le groupe témoin. Dans le cadre de cette étude, les souris homozygotes (*Rarb*^{R394C/R394C}) n'ont pas été testées puisqu'elles ne survivent que très peu de temps après la naissance.

Dans l'intention de mesurer les différences dans le phénotype locomoteur entre les génotypes, une cohorte de 60 souris a été suivie sur une période de 12 mois. Lors de chaque

séance de test comportemental, des souris représentant chacun des deux génotypes, sexes et lignées ont été évaluées. Au total, 32 animaux de la 1^{re} lignée, soit 16 WT (*Rarb*^{+/+}) et 16 HET (*Rarb*^{R394C/+}), de même que 28 souris de la 2^e lignée, soit 14 WT (*Rarb*^{+/+}) et 14 HET (*Rarb*^{R394C/+; A392A/+}), ont été inclus dans cette partie de l'étude.

Parallèlement, des études d'immunohistochimie (IHC) ont été menées afin d'élucider l'impact cellulaire de la mutation dans les populations neuronales du striatum. Pour ces expériences d'IHC, des souris hétérozygotes *Rarb*^{R394C/+} ont été croisées avec des souris Tg(*Drd1a*-tdTomato) ou Tg(*Drd2*-GFP), gracieuseté du Dr Louis-Éric Trudeau de l'Université de Montréal. Précédemment générées à l'aide de chromosomes bactériens artificiels, ces souris expriment le rapporteur tdTomato, une protéine fluorescente rouge (RFP), sous le contrôle du promoteur de *Drd1a* ou alors la protéine fluorescente verte (GFP), sous le contrôle du promoteur de *Drd2* (Gong et al., 2003; Shuen et al., 2008). Les souris obtenues par ces croisements sont les Tg(*Drd1a*-tdTomato);*Rarb*^{+/+} et Tg(*Drd1a*-tdTomato);*Rarb*^{R394C/+}, de même que les Tg(*Drd2*-GFP);*Rarb*^{+/+} et Tg(*Drd2*-GFP);*Rarb*^{R394C/+}. Compte tenu que les protéines RFP et GFP sont ici exprimées selon les promoteurs des récepteurs D1 et D2, respectivement, l'utilisation d'anticorps dirigés contre ces protéines fluorescentes est un indicateur de l'intégrité des 2 populations de NEMs, car les cellules exprimant la RFP ou la GFP expriment théoriquement aussi le récepteur dopaminergique associé, et ce, de manière assez fidèle (Gong et al., 2003; Shuen et al., 2008).

Les résultats des études d'IHC présentés proviennent d'un total de 14 souris âgées d'environ 1 mois ($33,9 \pm 3,4$ jours), soit 6 souris Tg(*Drd1a*-tdTomato), dont 3 WT (*Rarb*^{+/+}) et 3 HET (*Rarb*^{R394C/+}), de même que 8 souris Tg(*Drd2*-GFP), dont 4 WT (*Rarb*^{+/+}) et 4 HET (*Rarb*^{R394C/+}), où chaque souris HET était associée à une WT provenant de la même portée.

2.2. Études comportementales

2.2.1. Design expérimental

Afin de comparer les fonctions motrices des souris mutantes *Rarb*^{R394C/+} et *Rarb*^{R394C/+; A392A/+} à celles de leurs compagnons de cage WT, une série de 5 tests comportementaux a été mise en place. Les paradigmes ont été effectués dans un ordre déterminé dans le but de minimiser l'impact que chaque test peut avoir sur les résultats des suivants (McIlwain et al., 2001). Cette batterie d'expériences débute par le test du champ ouvert (*open field*), puis se poursuit avec celui du rotarod, le test d'empreinte, le test de suspension et, finalement, par le test d'équilibre sur poutre (*balance beam*). De plus, les tests étaient séparés au minimum d'une journée de repos, un intervalle permettant aux animaux de récupérer et réduisant ainsi l'impact de la fatigue sur leur performance lors des tests suivants (Paylor et al., 2006).

Sachant que les patients connaissent une régression de leurs fonctions motrices avec le temps, la série de 5 tests a été effectuée à 3 moments dans la vie des souris. Ainsi, dans le but d'évaluer l'impact de la mutation à long terme, les 60 souris ont effectué la série de 5 paradigmes moteurs aux âges de 2 mois, 6 mois et 12 mois. Lors de chacun des paradigmes, des souris de chaque génotype, sexe et lignée ont été incluses et l'expérimentateur a testé les animaux sans connaissance préalable des génotypes et des lignées. De plus, les souris ont été pesées au début de chaque test pour évaluer leur croissance.

Les rongeurs étant des mammifères nocturnes, la phase active de leur rythme circadien débute le soir et se termine en fin de nuit (Roedel et al., 2006). Ainsi, les tests comportementaux ont été effectués en soirée, à l'exception du test d'empreintes, pour des raisons pratiques.

Brièvement, les souris étaient transférées à la salle d'expérimentation, où elles y restaient en

habituations pour au moins 1 heure. Les tests débutaient vers 19 heures, soit 1 heure après l'extinction des lumières de leur salle d'hébergement. Hormis pour les tests du champ ouvert et d'empreintes qui se déroulaient en condition de luminosité standard (550-600 lux), les trois autres tests se déroulaient en condition d'obscurité, où une lumière rouge (25-30 lux) permettait à l'expérimentateur de voir ses manipulations, sans pour autant perturber l'activité des animaux puisqu'ils sont beaucoup moins sensibles à la couleur rouge que l'humain (Studholme et al., 2013; Peirson et al., 2018).

2.2.2. Le test du champ ouvert

Le test du champ ouvert (*open field*) permet d'observer le comportement naturel de l'animal lorsqu'il se retrouve en terrain découvert. Il renseigne donc sur l'activité ambulatoire générale de l'animal, sa tendance à l'exploration d'un nouvel environnement, la présence de comportements stéréotypés, etc. De plus, ce paradigme apporte certaines informations qui peuvent parfois déceler un certain degré d'anxiété (Crawley and Paylor, 1997; Glynn et al., 2003; Karl et al., 2003). Physiquement, le test se déroule dans une boîte ouverte formant une arène carrée de 45 x 45 cm de surface (2025 cm²). Cette superficie est divisée en deux zones, soit la périphérie (1125 cm²) et le centre (900 cm²). Ce paradigme se déroule en condition de luminosité standard, imitant ainsi le conflit naturel des rongeurs entre leur tendance intrinsèque à vouloir explorer un nouvel environnement et leur propension à vouloir éviter les endroits éclairés et à découvert (DeFries et al., 1966; Crawley, 1985).

Lors du test, l'individu est déposé au centre du champ ouvert et est libre de se déplacer à sa guise durant 10 minutes. Une caméra située au-dessus de l'arène enregistre la scène et permet

de suivre les déplacements de l'animal, à l'aide du logiciel SMART 3.0 (Panlab, Harvard Apparatus) qui détecte et suit le centre de masse de la souris. Le temps passé dans les différentes zones, de même que la distance totale parcourue sont utilisés pour évaluer la locomotion des animaux. À la fin, la souris est remise dans sa cage et l'arène du champ ouvert est lavée précautionneusement avec de l'éthanol 70%, afin d'éviter l'influence que peut avoir l'odeur sur le comportement des animaux suivants (Arakawa et al., 2008).

2.2.3. Le test du rotarod

Le test du rotarod renseigne sur la coordination générale d'un animal et est l'un des tests locomoteurs les plus utilisés (Crawley and Paylor, 1997; Carter et al., 2001; Karl et al., 2003; Gantois et al., 2007). Sommairement, le rotarod (Cat. #47600, Ugo Basile S.R.L., Italy) consiste en un appareil formé d'un cylindre rotatif surélevé. Des disques séparent ce rotor en 5 sections et permettent ainsi de tester plusieurs individus à la fois, évitant donc tout contact entre eux. Les souris doivent se maintenir sur le rotor allant à vitesse constante ou accélérée jusqu'à ce qu'elles tombent doucement sur une plateforme reliée à un chronomètre, située au-dessous.

Le test s'effectue en 2 phases, soit 2 journées consécutives d'entraînement et le véritable test la 3^e journée. Lors de l'entraînement, les sujets apprennent à se maintenir sur le rotor, tournant à la vitesse constante de 24 révolutions par minute (RPM), pour une durée de 120 secondes. Pendant ce délai, chaque fois que l'animal tombe du rotor, il y est replacé afin de l'habituer à s'y maintenir le plus longtemps possible. Le dernier jour, le rotor tourne de façon accélérée, soit de 4 à 40 RPM, pour une durée de 300 secondes. Lorsqu'une souris tombe, elle est retournée à sa cage et le temps affiché sur le chronomètre est pris en note. Un intervalle de 10

minutes, avant le prochain essai, permet à la souris de se reposer. Le résultat final d'un animal provient de la moyenne des mesures de 3 essais.

2.2.4. Le test d'empreintes

Le test d'empreintes permet d'évaluer la coordination et l'équilibre des individus par l'analyse de leur démarche (Carter et al., 1999; Carter et al., 2001; Gantois et al., 2007). Le paradigme s'effectue sur 2 jours consécutifs et, pour des raisons pratiques, se déroule le jour, en condition de luminosité standard. Un expérimentateur maintient une souris immobile, alors qu'un second applique différentes gouaches non toxiques, bleue et orange, respectivement sur les pattes avant et arrière de l'animal. Ensuite, la souris est déposée sur une feuille de papier blanc, située dans une boîte rectangulaire (50 cm X 10 cm X 10 cm), et se déplace jusqu'à l'autre extrémité en y laissant ses empreintes de pattes. Pour terminer le test, l'animal doit effectuer au moins 2 tracés valides, c'est-à-dire lorsqu'il se déplace sans s'arrêter d'un bout à l'autre de la feuille. Enfin, la souris est déposée dans une cage propre pour 5-10 minutes, ce qui lui permet de nettoyer les résidus excédentaires de peinture, avant d'être retournée à sa cage d'hébergement.

Plus tard, lorsque les empreintes ont séché, un expérimentateur mesure la longueur des enjambées avant et arrière, la largeur de la base avant et arrière, de même que le chevauchement des empreintes. En effet, lors de la démarche normale, le chevauchement décrit la tendance naturelle des souris à positionner leurs pattes arrière à l'endroit où leurs pattes avant s'étaient précédemment placées. Ainsi, il s'agit d'une mesure de l'exactitude du positionnement des pattes et elle renseigne sur l'uniformité de leur alternance (Carter et al., 2001). Les résultats représentés ont été obtenus suite à la moyenne d'au moins 5 mesures par paramètre.

2.2.5. Le test de suspension à quatre pattes

Le test de suspension à quatre pattes est une méthode non invasive d'interroger les fonctions motrices globales de l'animal (Karl et al., 2003; Carlson et al., 2010). Ce paradigme est effectué à l'aide d'un couvercle grillagé recouvrant normalement les cages de souris. Dans le but de standardiser la zone de suspension, du ruban adhésif a été appliqué sur le grillage pour délimiter un carré de 10 x 10 cm (100 cm²). En bref, l'expérimentateur dépose l'animal sur la zone grillagée, puis agite délicatement le couvercle pour s'assurer que la souris s'y agrippe bien. Ensuite, le couvercle est retourné et maintenu, à l'aide de supports, à une hauteur de 30 cm au-dessus de la litière, une distance qui permet à l'animal de retomber sur ses pattes sans se blesser. Pour chacun des 3 essais, séparés d'un intervalle de 10 minutes de repos, l'expérimentateur chronomètre la durée de suspension de l'animal, pour laquelle aucun temps limite n'est imposé.

Néanmoins, la masse corporelle d'une souris pouvant influencer son temps de suspension maximal, il est possible de multiplier ces deux variables afin d'obtenir une appréciation de l'impulsion (*holding impulse*) qui est déployée par l'animal pour s'opposer à la force gravitationnelle. En physique, l'impulsion équivaut à l'intégrale d'une force, F, qui est appliquée sur un intervalle de temps donné, t. Il est possible de simplifier l'équation pour l'appliquer au test de suspension à quatre pattes, tel que :

$$IIIIIIIIIIIIIIII = FFIIFFFFF XX$$

$$IIIIIIIIIIIIIIII \text{ ddf } IIIIIIIFFFFIIIIIIIIII = II\text{mm}IIIIFF XX \text{ tt}FFIIIIII$$

Cette mesure, exprimée en Newtons*seconde, permet de normaliser les scores afin de tenir compte qu'un animal plus lourd doit développer davantage de tension musculaire

(impulsion) pour s'opposer à la gravité pour un temps donné (Carlson et al., 2010; van Putten et al., 2012).

2.2.6. Le test d'équilibre sur poutre

Le test de la poutre d'équilibre (*balance beam*) est effectué dans le but d'évaluer l'équilibre et la coordination des animaux, de façon complémentaire au test du rotarod (Carter et al., 2001). Le montage (TS0806-M, RPC OpenScience Ltd, Russia) est constitué d'une poutrelle surélevée de 100 cm de longueur (graduée à chaque 5 cm), dont la largeur diminue progressivement (initiale = 4 cm; finale = 0,5 cm) avec la distance afin d'augmenter la difficulté graduellement.

Lors du test, la performance de l'animal étant filmée, celui-ci est déposé sur le bout le plus large de la poutrelle et doit la traverser jusqu'à une boîte située de l'autre côté. L'entraînement et le test se déroulent sur 2 jours consécutifs, où l'animal effectue 2 fois 2 essais par jour, séparés d'un intervalle de repos minimal de 10 minutes. À l'aide des vidéos, la latence pour traverser la poutre est chronométrée. De plus, lorsqu'une patte de l'animal glisse de la poutrelle, le nombre total de glissements lors de la traversée, de même que la distance à laquelle se produit le 1^{er} glissement de patte sont pris en note. Les mesures présentées proviennent de la moyenne des essais finaux (Carter et al., 2001; Brooks and Dunnett, 2009).

2.3. Études immunohistochimiques

2.3.1. Préparation des coupes cérébrales

Tout d'abord, les animaux ont été anesthésiés par voie intrapéritonéale avec un mélange de kétamine (100 mg/kg) et xylazine (10 mg/kg), avant d'être perfusés de façon transcardiaque à l'aide d'une solution saline (0.9% NaCl) suivie d'une solution de fixation de paraformaldéhyde (PFA, 4% dans 0,1 M PBS, pH = 7,4). Les cerveaux ont alors été prélevés, puis fixés à 4°C dans la solution de PFA pendant toute une nuit. Par la suite, les cerveaux ont été cryoprotégés en les submergeant dans une solution à 30% de sucrose, pendant la nuit à 4°C, puis inclus dans un bloc d'OCT (Tissue-Tek O.C.T. Compound, Sakura), un composé de préservation structurelle, avant d'être congelés et maintenus à -80°C. Finalement, des tranches coronales de 40 µm d'épaisseur ont été sectionnées à l'aide d'un cryostat (Leica CM1950) et gardées dans des puits remplis d'une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) jusqu'à leur utilisation.

2.3.2. Anticorps et microscopie confocale

Pour les études d'IHC par tranches flottantes (*free-floating*), des sections adjacentes provenant de la partie rostrale du striatum (1,94 mm antérieur au Bregma jusqu'à 0,22 mm postérieur au Bregma) ont été sélectionnées (Paxinos and Franklin, 2004). Premièrement, les tranches ont été incubées dans une solution de blocage au sérum normal de chèvre (NGS à 10%, 1% triton, PBS 1X), pendant 1h30 à température ambiante. Ensuite, pendant la nuit à 4°C, les tranches de cerveaux ont été incubées dans une solution (5% NGS, 0,1% triton et PBS 1X) contenant divers anticorps primaires. Selon le contexte, l'anticorps de lapin anti-RFP (600-401-379S, Rockland, 1:1000), pour les tranches *Drd1a*-tdTomato, ou l'anticorps de poulet anti-GFP

(AB16901, Millipore, 1:2000), pour les tranches *Drd2*-GFP, ont été utilisés. Aussi, l'anticorps de souris anti-NeuN (MAB377, Millipore, 1:1000) a été utilisé pour toutes les tranches afin d'être en mesure de détecter les cellules neuronales. Le lendemain, les tranches flottantes ont été lavées dans du PBS 1X, pendant 10 minutes et à 3 reprises, avant d'être incubées dans une solution (5% NGS, 0,1% triton et PBS 1X) contenant les anticorps secondaires, pour une durée de 1h30 à température ambiante. Les anticorps secondaires de chèvre ont été choisis relativement aux anticorps primaires qu'ils devaient reconnaître, soit l'anti-lapin conjugué à un Alexa Fluor 555 (A21430, Invitrogen, 1:1000), l'anti-poulet conjugué à un Alexa Fluor 488 (ab150169, Abcam, 1:1000) et l'anti-souris conjugué à un Alexa Fluor 633 (A21053, Invitrogen, 1:1000). De plus, les tranches ont à nouveau été lavées 10 minutes dans du PBS 1X, à 3 reprises, avant d'être montées sur lames de microscope, dans un milieu de montage Vectashield (Vector laboratories). Finalement, un striatum entier de chaque tranche a été imagé par carrelage (*tiling*) à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser (Leica TCS SP8).

2.3.3. Quantifications cellulaires

Afin de comparer les 2 populations de NEMs entre les souris WT et les souris portant la mutation *Rarb*^{R394C/+}, le nombre de cellules marquées par les différents anticorps a été mesuré, sans connaissance préalable des génotypes et des sexes. Pour toutes les images, le signal provenant de chaque canal a d'abord été analysé individuellement, afin de caractériser la distribution de tous les neurones (NeuN⁺), des neurones exprimant le récepteur D1 (RFP⁺) et des neurones exprimant le récepteur D2 (GFP⁺), puis les canaux combinés ont été analysés pour identifier les cellules doublement marquées. Bien que NeuN n'est pas spécifique aux NEMs, il

en offre une approximation fiable puisque ces derniers constituent >90% de la population neuronale de cette région (Shuen et al., 2008; Matamales et al., 2009; Gerfen and Surmeier, 2011).

À l'aide du logiciel NeuroLucida (MBF Bioscience), les cellules RFP⁺, GFP⁺ et NeuN⁺ ont été automatiquement comptées, suivi d'une inspection visuelle. Ensuite, les neurones doublement marqués (RFP⁺-NeuN⁺ ou GFP⁺-NeuN⁺) ont été comptés manuellement afin d'évaluer la colocalisation des marqueurs. Pour ces quantifications cellulaires, le striatum dorsal a été préalablement divisé en 4 quadrants, au centre desquels une boîte d'échantillonnage (250 µm x 250 µm) a été positionnée. Pour chaque tranche, la moyenne des comptes cellulaires provenant des 4 boîtes d'échantillonnage a été effectuée, alors que les résultats finaux d'un animal expriment la moyenne des mesures obtenues de 3 tranches adjacentes.

2.4. Analyses statistiques

Les résultats présentés dans ce rapport sont des moyennes \pm l'erreur type de la moyenne (SEM), où le seuil afin d'établir un effet significatif a été choisi comme étant $p < 0,05$, et ont été analysés à l'aide du logiciel Prism 6 (GraphPad Software Inc., Californie). Des analyses de variance (ANOVA) à mesures répétées à deux facteurs, « Génotype » et « Âge » ont été effectuées afin de comparer l'effet de la mutation et de l'âge sur les paramètres des tests comportementaux. Les différences entre les génotypes, aux divers âges, ont été déterminées à la suite de tests *post hoc* de comparaisons multiples de Bonferroni. Finalement, les analyses statistiques relatives aux expériences immunohistochimiques ont été effectuées à l'aide de tests de t indépendants suivis de la correction de Welch. Aussi, les différences dans la fréquence

d'observation de microphthalmie entre les génotypes des 2 lignées ont été évaluées à l'aide de tests exacts de Fisher. Finalement, les séries de données incomplètes, provenant de souris décédées en cours d'étude, ont été omises des analyses statistiques.

Chapitre 3 : Résultats

3.1. Phénotype des animaux

3.1.1. La mutation R394C influence la masse corporelle des souris au cours du développement

Il est tout d'abord important de mentionner que les souris *Rarb*^{R394C/+} et *Rarb*^{R394C/+; A392A/+} sont viables, fertiles et ne présentent pas un taux de mortalité différent de celui de leurs congénères WT au cours de la première année de vie. En effet, seulement 5 souris WT et 3 souris mutantes sont décédées durant la période d'expérimentation comportementale.

Sachant que la masse corporelle est un facteur pouvant avoir un impact sur la performance motrice des souris, nous avons pesé les animaux au cours du temps afin de comparer l'évolution de leur gain de masse corporelle (Kudwa et al., 2013). Pendant leur développement, la masse corporelle des souris HET des 2 lignées est comparable à celle des WT à 2 mois, par contre, elle est significativement diminuée à 6 mois et 12 mois (figure 2, A-A'). En effet, pour la masse des souris des 2 lignées, des ANOVAs à mesures répétées montrent qu'il y a un effet significatif de l'âge ($F_{2,60} \geq 218,7$; $p < 0,0001$), du génotype ($F_{1,30} \geq 17,36$; $p \leq 0,0002$), de même qu'une interaction entre les 2 facteurs ($F_{2,60} \geq 5,357$; $p \leq 0,0072$). Ainsi, bien que l'âge des souris ait une influence sur le développement de leur masse corporelle, la présence de la mutation R394C induit une différence significative entre les HET et les WT des 2 lignées au 6^e et au 12^e mois (figure 2, A-A'; $t \geq 4,00$; $p \leq 0,0004$).

3.1.2. La mutation R394C augmente la fréquence de la microphthalmie chez les souris

Comme les patients porteurs de mutations dans *RARB* présentent une microphthalmie, caractérisée par des globes oculaires dont la taille est sous la normale, nous avons voulu évaluer si cette condition ophtalmologique est présente chez les souris porteuses de la mutation R394C (Srour et al., 2013; Srour et al., 2016). Il faut mentionner que la microphthalmie est une condition qui apparaît naturellement, à faible fréquence, chez les souris possédant le fond génétique C57BL/6 (Smith et al., 1994). Ainsi, dans le but d'évaluer une différence dans la fréquence d'apparition de microphthalmie entre les souris WT et mutantes, nous avons visuellement inspecté la morphologie des yeux de nos animaux afin d'y détecter la présence de la condition. Visuellement, il est facile de déterminer si une souris est atteinte ou non par cette condition, car il y a une différence notable de la taille des globes oculaires (figure 2, B). Lorsque l'on représente et analyse la proportion de souris aux yeux non atteints comparée à celle des souris ayant une microphthalmie à l'aide de tests exacts de Fisher, il est possible de noter certaines différences significatives. En effet, il y a un effet significatif du génotype sur la fréquence de la condition chez les souris des 2 lignées (figure 2, C-C'; $p < 0,0001$). Ainsi, tout comme les patients, les souris mutantes sont plus fréquemment atteintes de microphthalmie, ce qui rappelle le rôle important que joue le gène *RARB* dans l'organogenèse, notamment au sein de l'oeil (Ghyselinck et al., 1997).

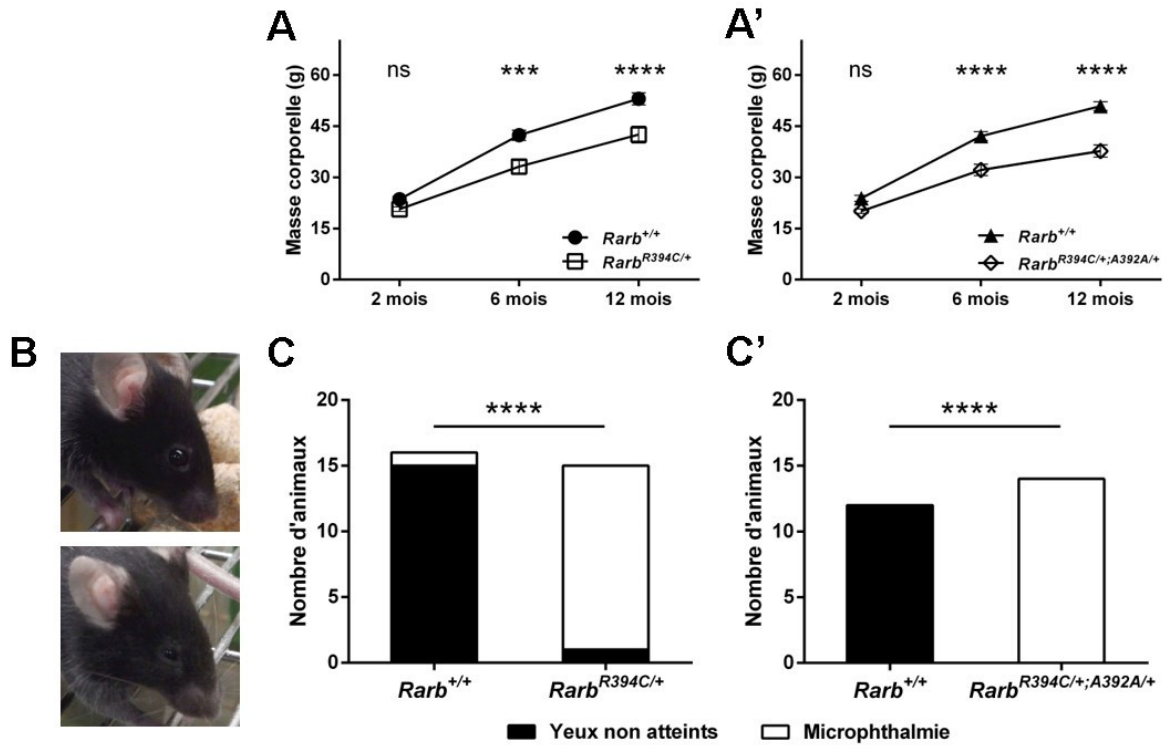


Figure 2. Données anatomiques des souris mutantes. La masse corporelle des souris de la 1^{re} lignée (A) et de la 2^e lignée (A'). Photographies représentatives d'une souris aux yeux non atteints (B, panneau du haut) et d'une souris affectée par la microphthalmie (B, panneau du bas), de même que la fréquence de microphthalmie chez les souris de la 1^{re} lignée (C) et de la 2^e lignée (C'). (A-A') 1^{re} lignée ($Rarb^{R394C/+}$) : n = 14 WT, 15 HET; 2^e lignée ($Rarb^{R394C/+;A392A/+}$) : n = 11 WT, 14 HET. (C-C') 1^{re} lignée : n = 16 WT, 15 HET; 2^e lignée : n = 12 WT, 14 HET. Indépendamment pour chaque lignée, les génotypes ont été comparés à l'aide d'ANOVAs à mesures répétées à 2 facteurs (Génotype, âge) suivies de comparaisons multiples de Bonferroni. Les fréquences de microphthalmie ont été comparées à l'aide du test exact de Fisher. ***, p < 0,001; ****, p < 0,0001 comparativement aux compagnons de cage WT. ns : non significatif.

3.2. Tests comportementaux

3.2.1. La mutation R394C augmente la locomotion dans le champ ouvert

Étant donné que la dystonie est une pathologie du mouvement et qu'elle est un phénotype prééminent des patients porteurs de mutations GDF dans *RARB*, nous avons évalué la locomotion globale des souris mutantes à l'aide du paradigme du champ ouvert (Srouf et al., 2013; Srouf et al., 2016). Comme mentionné précédemment, ce test renseigne sur l'activité ambulatoire générale d'un animal, de même que sa tendance à l'exploration d'un nouvel environnement (Crawley and Paylor, 1997; Karl et al., 2003). Par ailleurs, il est connu que les souris dont la fonction de *Rarb* a été abolie présentent des anomalies locomotrices dans ce paradigme (Krezel et al., 1998). Ainsi, la distance parcourue dans chaque zone, de même que la distance totale, ont été mesurées afin d'établir le niveau d'activité ambulatoire des souris, à chacun des 3 âges (figure 3).

En premier lieu, en ce qui a trait à la distance parcourue en périphérie par les souris des 2 lignées, des ANOVAs à mesures répétées montrent qu'il y a un effet significatif de l'âge ($F_{2,60} \geq 12,31$; $p < 0,0001$) et du génotype ($F_{1,30} \geq 27,48$; $p < 0,0001$). Pour les 2 lignées, la distance parcourue en périphérie par les souris hétérozygotes était supérieure à celle des WT, cette différence étant présente aux trois âges chez la 1^{re} lignée (figure 3, A; $t \geq 2,86$; $p \leq 0,016$), alors qu'elle n'apparaît qu'aux 6^e et 12^e mois chez la 2^e lignée (figure 3, A'; $t \geq 4,18$; $p \leq 0,0002$). Parallèlement, les souris mutantes parcourent une plus grande distance que leurs congénères dans la zone centrale, et ce, pour les souris des 2 lignées. D'ailleurs, des ANOVAs à mesures répétées montrent qu'il y a un effet significatif de l'âge ($F_{2,60} \geq 43,58$; $p < 0,0001$), de même qu'une interaction entre l'âge et le génotype ($F_{2,60} \geq 3,723$; $p \leq 0,030$). Cependant, cette différence n'est

présente qu'à 6 mois chez la 1^{re} lignée (figure 3, B; $t = 3,05$; $p = 0,0090$), alors qu'elle apparaît aux 6^e et 12^e mois chez la 2^e lignée (figure 3, B'; $t \geq 2,69$; $p \leq 0,026$). Finalement, la distance totale parcourue est supérieure chez les souris mutantes (figure 3, C-C'). En effet, pour la distance totale parcourue par les souris des 2 lignées, des ANOVAs à mesures répétées montrent qu'il y a un effet significatif de l'âge ($F_{2,60} \geq 33,49$; $p < 0,0001$) et du génotype ($F_{1,30} \geq 26,06$; $p < 0,0001$). Par ailleurs, cette différence est présente aux trois âges chez la 1^{re} lignée (figure 3, C; $t \geq 3,00$; $p \leq 0,011$), alors qu'elle n'apparaît qu'aux 6^e et 12^e mois chez la 2^e lignée (figure 3, C'; $t \geq 4,57$; $p < 0,0001$).

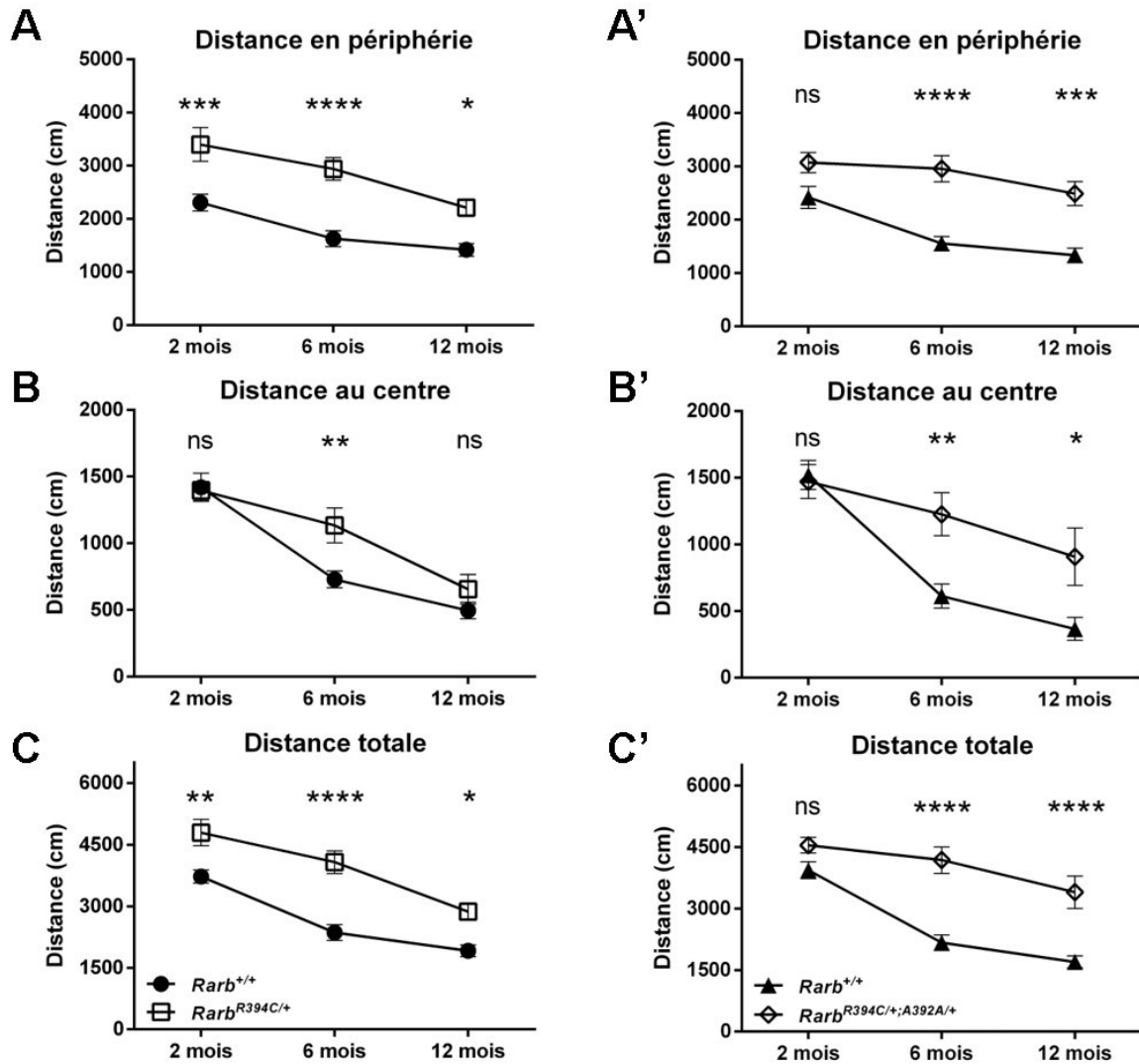


Figure 3. Activité ambulatoire des souris mutantes lors du paradigme du champ ouvert. La distance parcourue dans la zone périphérique par les souris de la 1^{re} lignée (A) et de la 2^e lignée (A'). La distance parcourue dans la zone centrale par les souris de la 1^{re} lignée (B) et de la 2^e lignée (B'). La distance totale parcourue par les souris de la 1^{re} lignée (C) et de la 2^e lignée (C'). (A-C') 1^{re} lignée (*Rarb*^{R394C/+}) : n = 16 WT, 16 HET; 2^e lignée (*Rarb*^{R394C/+; A392A/+}) : n = 13 WT, 14 HET. Indépendamment pour chaque lignée, les génotypes ont été comparés à l'aide d'ANOVAs à mesures répétées à 2 facteurs (Génotype, âge) suivies de comparaisons multiples de Bonferroni. *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001; ****, p < 0,0001 comparativement aux compagnons de cage WT. ns : non significatif.

3.2.2. La mutation R394C augmente le temps passé en mouvement dans le champ ouvert

Chez d'autres modèles murins de dystonie, ce phénomène d'hyperactivité, pouvant s'exprimer par une plus grande distance parcourue, mais également par une plus grande proportion du temps passé en mouvement, a aussi été observé (Glynn et al., 2005; Gantois et al., 2007). Dans le but d'évaluer la présence de ces différences temporelles dans le champ ouvert, nous avons tout d'abord comparé le pourcentage de temps passé dans chaque zone. Pour les souris des 2 lignées, il n'y a pas de différence entre les WT et les HET dans le temps passé en périphérie, car des ANOVAs à mesures répétées montrent qu'il y a un effet significatif de l'âge ($F_{2,60} \geq 5,734$; $p \leq 0,0053$), mais aucun effet du génotype ($F_{1,30} \leq 1,482$; $p \geq 0,23$). En effet, il n'y a aucune différence significative entre les génotypes, et ce, à aucun des 3 âges (figure 4, A-A'; $t \leq 1,27$; $p \geq 0,63$). Aussi, ce même phénomène peut être observé dans la zone centrale, pour laquelle des ANOVAs à mesures répétées montrent qu'il y a également un effet significatif de l'âge ($F_{2,60} \geq 5,735$; $p \leq 0,0053$), mais aucun effet du génotype ($F_{1,30} \leq 1,483$; $p \geq 0,23$). Pour les souris des 2 lignées, il n'y a aucune variation significative entre les génotypes, et ce, à aucun des 3 âges (figure 4, B-B'; $t \leq 1,27$; $p \geq 0,63$).

En contrepartie, lorsque l'on compare la proportion du temps passé à être immobile, il est possible de noter que les mutantes des 2 lignées passent moins de temps à rester immobiles, indiquant qu'elles sont plus longtemps en mouvement comparativement aux WT. Effectivement, pour le temps passé à rester immobile dans l'ensemble du champ ouvert par les souris des 2 lignées, des ANOVAs à mesures répétées montrent qu'il y a un effet significatif de l'âge ($F_{2,60} \geq 47,02$; $p < 0,0001$), du génotype ($F_{1,30} \geq 26,82$; $p < 0,0001$), de même qu'une interaction entre les 2 facteurs ($F_{2,60} \geq 4,748$; $p \leq 0,012$). Similairement pour les 2 lignées, il y a une différence significative entre les génotypes aux 6^e et 12^e mois (figure 4, C-C'; $t \geq 4,23$; $p \leq 0,0002$).

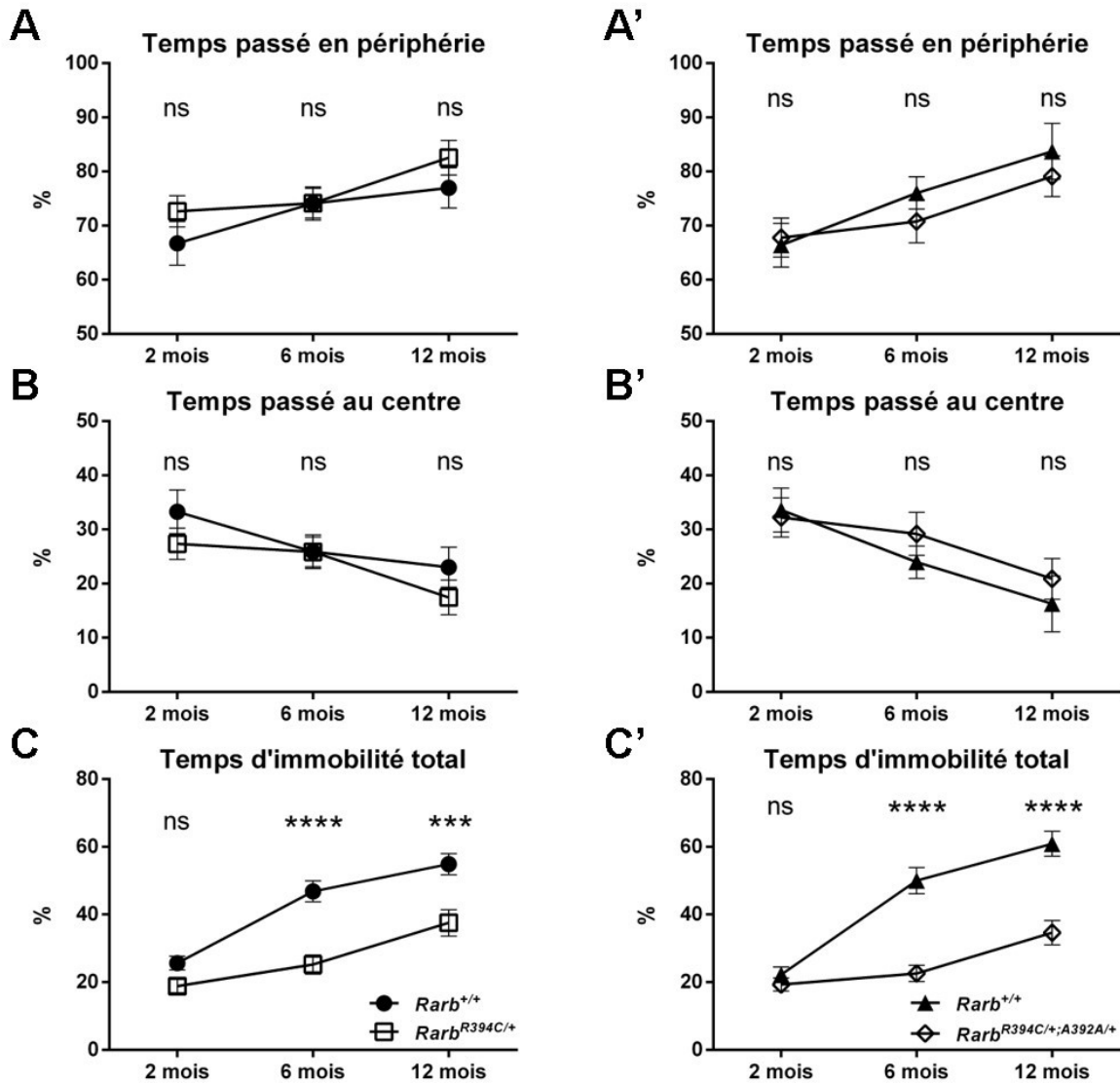


Figure 4. Proportion du temps passé dans chaque zone et passé immobile des souris mutantes lors du paradigme du champ ouvert. Le pourcentage du temps passé dans la zone périphérique par les souris de la 1^{re} lignée (A) et de la 2^e lignée (A'). Le pourcentage du temps passé dans la zone centrale par les souris de la 1^{re} lignée (B) et de la 2^e lignée (B'). Le pourcentage du temps passé à rester immobile dans l'ensemble de l'arène par les souris de la 1^{re} lignée (C) et de la 2^e lignée (C'). (A-C') 1^{re} lignée (*Rarb*^{R394C/+}) : n = 16 WT, 16 HET; 2^e lignée (*Rarb*^{R394C/+; A392A/+}) : n = 13 WT, 14 HET. Indépendamment pour chaque lignée, les génotypes ont été comparés à l'aide d'ANOVAs à mesures répétées à 2 facteurs (Génotype, âge) suivies de comparaisons multiples de Bonferroni. ***, p < 0,001; ****, p < 0,0001 comparativement aux compagnons de cage WT. ns : non significatif.

3.2.3. La mutation R394C induit une coordination déficitaire lors du test du rotarod

Sachant que la dystonie est définie par une infiltration de mouvements involontaires venant parasiter les mouvements volontaires, nous avons voulu évaluer la présence de déficits dans la coordination des souris mutantes. Le test du rotarod représente un bon indicateur de la coordination générale d'un animal et il est l'un des tests locomoteurs les plus utilisés (Crawley and Paylor, 1997; Carter et al., 2001; Karl et al., 2003). D'autant plus, il est connu que les souris dont la fonction de *Rarb* a été abolie présentent de lourdes anomalies locomotrices lors de ce paradigme (Krezel et al., 1998). Effectivement, à la manière des souris ayant une perte de fonction de *Rarb*, nos souris mutantes portant la mutation de GDF exhibent une coordination déficitaire, reflétée par une diminution marquée de la latence à tomber du rotarod, et ce, aux 3 âges testés et pour les 2 lignées (figure 5). De cette façon, des différences significatives sont visibles dans la latence avant de tomber du rotor en accélération, entre les souris WT et les mutantes, des ANOVAs à mesures répétées montrant qu'il y a un effet de l'âge ($F_{2,58} \geq 34,83$; $p < 0,0001$), du génotype ($F_{1,29} \geq 49,46$; $p < 0,0001$) et que ces différences sont significatives entre les génotypes tout au long du développement des souris (figure 5, A-A'; $t \geq 3,28$; $p \leq 0,0049$).

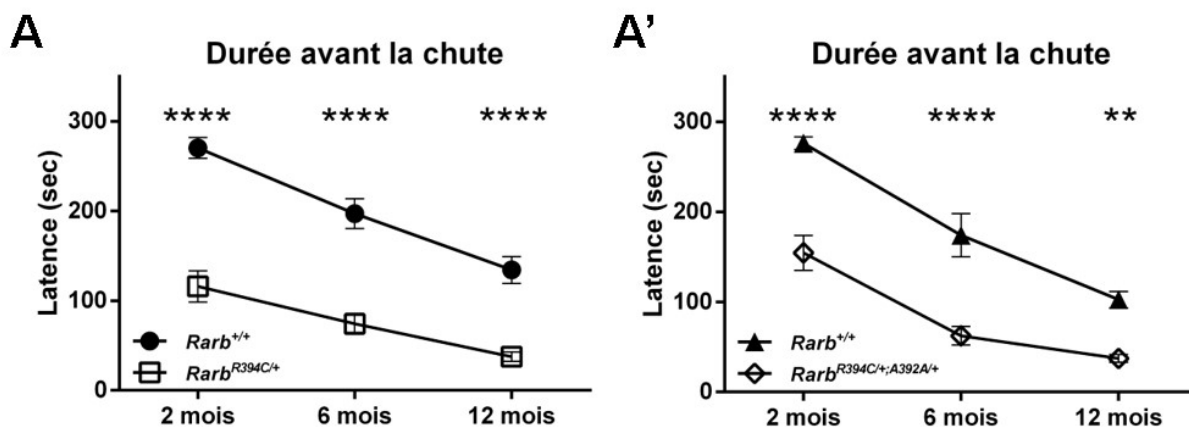


Figure 5. Performance des souris mutantes lors du test du rotarod en vitesse accélérée. La latence moyenne avant de tomber du rotor, accélérant de 4 à 40 RPM sur une période de 5 minutes, par les souris de la 1^{re} lignée (A) et de la 2^e lignée (A'). (A-A') 1^{re} lignée (*Rarb*^{R394C/+}) : n = 16 WT, 15 HET; 2^e lignée (*Rarb*^{R394C/+;A392A/+}) : n = 12 WT, 14 HET. Indépendamment pour chaque lignée, les génotypes ont été comparés à l'aide d'ANOVAs à mesures répétées à 2 facteurs (Génotype, âge) suivies de comparaisons multiples de Bonferroni. **, p < 0,01; ****, p < 0,0001 comparativement aux compagnons de cage WT.

3.2.4. Impact de la mutation R394C sur les paramètres de la démarche

Ayant remarqué que nos souris mutantes présentaient un dandinement lors de leur déplacement, nous avons ainsi voulu comparer les paramètres de leur démarche à celle de leurs congénères WT (figure 6, A). Le test d'empreintes permet l'évaluation de la coordination et de l'équilibre des individus par l'analyse de leur démarche (Carter et al., 2001). Ce test, faisant ressortir les anomalies dans le patron de la démarche, est couramment utilisé chez les modèles murins de pathologies du mouvement, tels que la dystonie, l'ataxie et même pour la MH (Carter et al., 1999; Glynn et al., 2005; Gantois et al., 2007). Globalement, de multiples différences significatives font surface chez les souris mutantes lorsque l'on compare les mesures de différents paramètres de leur démarche (figure 6).

Tout d'abord, comparativement aux WT, il y a une réduction de la distance séparant les pattes avant chez les mutants des 2 lignées. D'ailleurs, il y a un effet significatif de l'âge ($F_{2,56} \geq 5,023$; $p \leq 0,011$) et du génotype ($F_{1,28} \geq 10,93$; $p \leq 0,0026$) sur la largeur de la base avant des souris, où des comparaisons multiples montrent aussi des écarts significatifs entre les génotypes aux 6^e et 12^e mois pour la 1^{re} lignée (figure 6, B; $t \geq 3,10$; $p \leq 0,0079$), de même qu'aux 3 âges pour la 2^e lignée (figure 6, B'; $t \geq 2,70$; $p \leq 0,027$). Paradoxalement, ce changement dans la largeur de la base avant n'est pas accompagné d'une variation au niveau de la base arrière. En effet, il n'y a pas de différence entre les génotypes dans la distance séparant les pattes arrière, excepté d'une légère réduction uniquement présente chez les souris mutantes de la 2^e lignée à 12 mois (figure 6, C-C'). Cela est représenté par la présence d'un effet significatif de l'âge ($F_{2,56} \geq 38,79$; $p < 0,0001$), mais sans effet du génotype ($F_{1,28} \leq 1,229$; $p \geq 0,28$).

Par la suite, en ce qui a trait à la longueur des enjambées des pattes avant et arrière, le test d'empreintes révèle une réduction significative de ces 2 paramètres chez les mutantes des 2 lignées, et ce, tout au cours de leur vie. Ainsi, cette diminution des enjambées avant des mutantes (figure 6, D-D'; $t \geq 2,91$; $p \leq 0,014$) indique la présence d'un effet significatif de l'âge ($F_{2,56} \geq 3,916$; $p \leq 0,026$) et du génotype ($F_{1,28} \geq 17,21$; $p \leq 0,0003$). Parallèlement, le raccourcissement des enjambées des pattes arrière des mutants (figure 6, E-E'; $t \geq 3,08$; $p \leq 0,0085$) montre également l'existence d'un effet significatif du génotype ($F_{1,28} \geq 17,13$; $p \leq 0,0003$).

Finalement, nous avons évalué l'exactitude du chevauchement des pas puisque des différences ont été observées chez d'autres modèles de pathologies du mouvement. Par exemple, certains déficits moteurs comme la MH affectent la démarche de la souris et rendent ses pas plus variables, se reflétant par un plus grand écart entre les empreintes appariées, donc par un plus faible chevauchement (Carter et al., 1999). Contrairement au modèle murin de la MH testé dans l'étude précédente, nos souris modélisant une dystonie causée par le GDF de *Rarb* ne présentent aucune différence avec leurs congénères WT dans le chevauchement de leurs pas, et ce, à aucun des 3 stades évalués (figure 6, F-F'; $t \leq 1,51$; $p \geq 0,41$). Ceci se reflète par l'absence d'effet du génotype ($F_{1,28} \leq 1,070$; $p \geq 0,31$), bien qu'un effet de l'âge soit noté ($F_{2,56} \geq 11,69$; $p < 0,0001$).

Globalement, bien qu'un effet de l'âge existe au sein de la largeur des bases, de la longueur des enjambées et du chevauchement, un effet du génotype n'aurait lieu que pour la largeur de la base avant et la longueur des enjambées, désignant l'influence de la mutation R394C sur ces paramètres en particulier. Bien que contre-intuitif, la présence d'une différence de la base avant couplée à un manque de changement dans la base arrière est compatible avec les résultats d'autres études menées chez un modèle murin de la MH avec des déficits moteurs progressifs (Carter et al., 1999; Pallier et al., 2009).

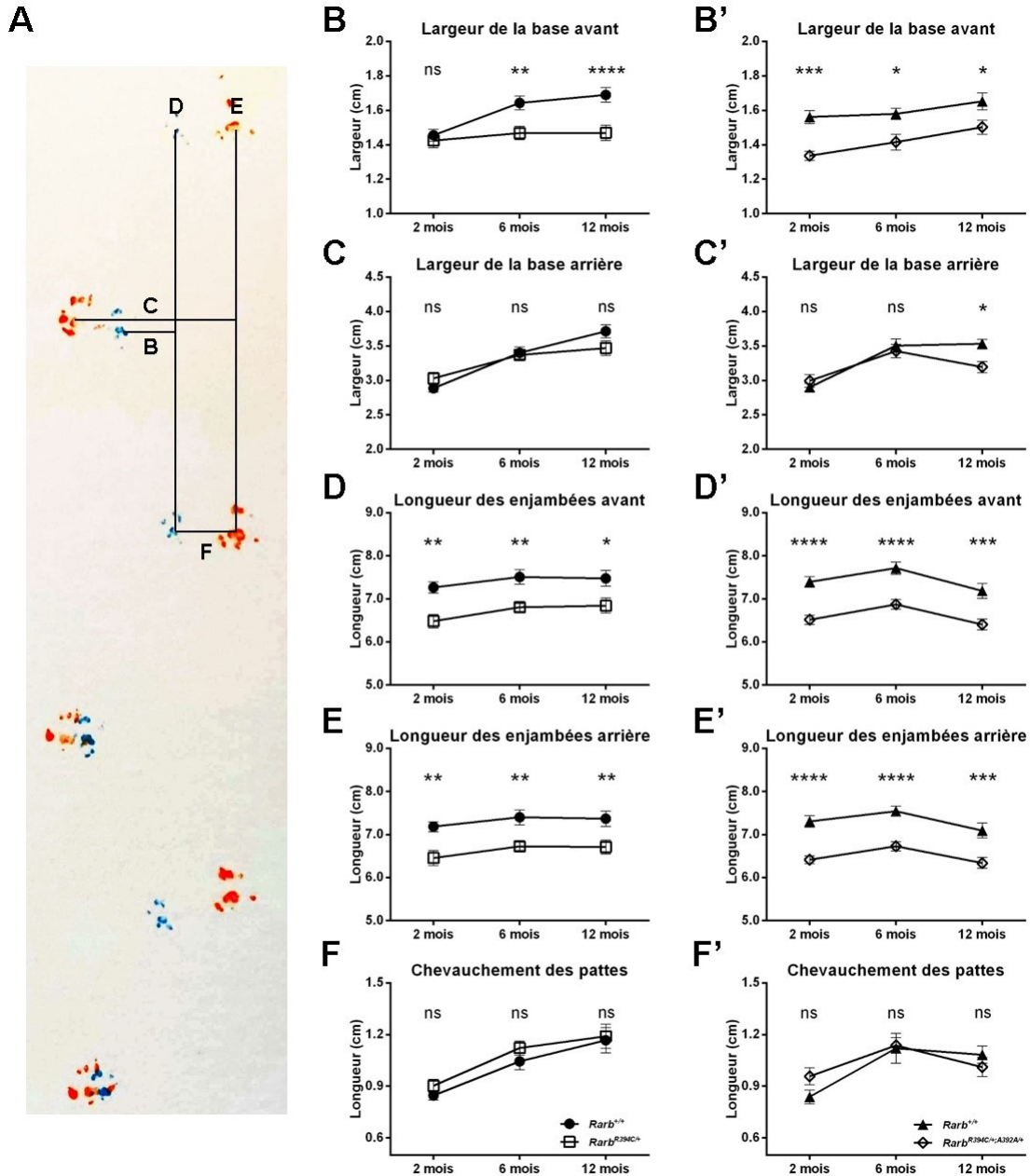


Figure 6. Analyse des paramètres de la démarche des souris lors du test d’empreintes.

Schématisation des paramètres mesurés sur un tracé représentatif (A). La largeur des bases avant et arrière, la longueur des enjambées avant et arrière, de même que le chevauchement des pattes pour les souris de la 1^{re} lignée (B,C,D,E,F) et de la 2^e lignée (B’,C’,D’,E’,F’). (B-F’) 1^{re} lignée (*Rarb*^{R394C/+}) : n = 15 WT, 15 HET; 2^e lignée (*Rarb*^{R394C/+}; *A392A/+*) : n = 11 WT, 13 HET.

Indépendamment pour chaque lignée, les génotypes ont été comparés à l’aide d’ANOVAs à mesures répétées à 2 facteurs (Génotype, âge) suivies de comparaisons multiples de Bonferroni. *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001; ****, p < 0,0001 comparativement aux compagnons de cage WT. ns : non significatif.

3.2.5. La mutation R394C n'affecte pas le tonus musculaire général des mutants

Étant donné que la dystonie affecte l'activité musculaire de divers muscles, nous avons voulu évaluer la condition musculaire de nos souris avec l'objectif de détecter la présence potentielle de différences dans leur force ou leur tonus et, le cas échéant, leur contribution au phénotype locomoteur mesuré lors des autres tests. Ainsi, le test de suspension à 4 pattes a été sélectionné dans le but d'interroger les fonctions motrices globales de l'animal, de façon non invasive (Carlson et al., 2010). Lors de ce test, la durée de suspension est un indicateur sommaire de la capacité musculaire des souris. De prime abord, la latence avant la chute est fortement corrélée à l'âge des individus (figure 7, A-A'; $F_{2,54} \geq 18,30$; $p < 0,0001$). De plus, il n'y a pas d'effet du génotype sur la latence moyenne ($F_{1,27} \leq 1,034$; $p \geq 0,32$), bien qu'une interaction des facteurs soit présente pour la 2^e lignée ($F_{2,46} = 3,987$; $p = 0,025$), connotant une différence uniquement visible à 2 mois (figure 7, A'; $t = 2,80$; $p = 0,020$).

Néanmoins, étant donné que la masse corporelle d'une souris peut influencer son temps de suspension maximal, il s'avère judicieux de multiplier ces deux variables afin d'obtenir une appréciation de l'impulsion de suspension déployée par l'animal pour s'opposer à la force gravitationnelle. Tel que mentionné précédemment, cette mesure permet de normaliser les scores obtenus afin de tenir compte du fait qu'un animal plus lourd doit développer davantage de tension musculaire (impulsion) pour s'opposer à la gravité pour un temps donné (Carlson et al., 2010; van Putten et al., 2012). Ainsi, malgré une différence apparaissant ponctuellement entre les WT et les mutantes dans la latence de suspension, celle-ci est effacée avec la normalisation des scores (figure 7, B-B'; $t \leq 2,45$; $p \geq 0,051$). Tandis qu'un effet significatif de l'âge soit encore présent ($F_{2,54} \geq 17,86$; $p < 0,0001$), l'effet du génotype demeure absent ($F_{1,27} \leq 0,8417$; $p \geq 0,37$) et l'interaction entre les 2 facteurs disparaît ($F_{2,54} \leq 2,922$; $p \geq 0,064$).

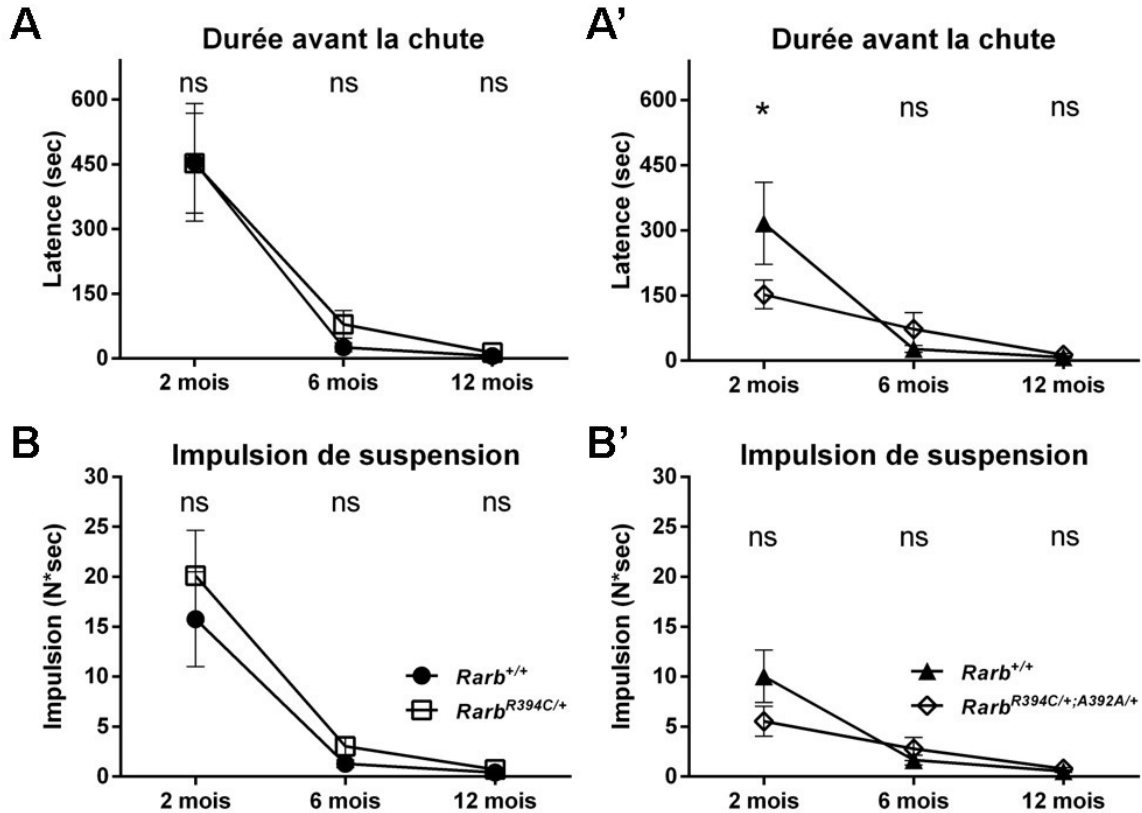


Figure 7. Performance des souris mutantes lors du test de suspension à 4 pattes. La latence moyenne avant de lâcher prise par les souris de la 1^{re} lignée (A) et de la 2^e lignée (A'). L'impulsion de suspension maximale, exprimée par la latence maximale de suspension multipliée à la masse individuelle des souris pour la 1^{re} lignée (B) et la 2^e lignée (B'). (A-B') 1^{re} lignée (*Rarb*^{R394C/+}) : n = 14 WT, 15 HET; 2^e lignée (*Rarb*^{R394C/+;A392A/+}) : n = 11 WT, 14 HET. Indépendamment pour chaque lignée, les génotypes ont été comparés à l'aide d'ANOVAs à mesures répétées à 2 facteurs (Génotype, âge) suivies de comparaisons multiples de Bonferroni. *, p < 0,05 comparativement aux compagnons de cage WT. ns : non significatif.

3.2.6. La mutation R394C influence la performance lors du test d'équilibre sur la poutre

Dans le but d'évaluer simultanément la coordination et la balance des animaux, nous avons intégré le paradigme de la poutre d'équilibre à notre batterie de tests locomoteurs (Carter et al., 2001). Ce paradigme est complémentaire à celui du rotarod, mais il a l'avantage d'être plus sensible que ce dernier, permettant la détection d'anomalies motrices plus subtiles qui auraient pu passer inaperçues lors du test du rotarod (Stanley et al., 2005; Yhnell et al., 2016; Wagner et al., 2019).

Tout d'abord, nous avons comparé le temps nécessaire à traverser la poutre et nous n'avons identifié aucune différence significative entre les groupes de souris des 2 lignées et aux 3 âges (figure 8, A-A'; $t \leq 1,69$; $p \geq 0,29$). En effet, bien que des ANOVAs à 2 facteurs relèvent un effet significatif de l'âge ($F_{2,55} \geq 3,906$; $p \leq 0,026$), le génotype demeure sans effet sur la performance des souris ($F_{1,55} \leq 2,492$; $p \geq 0,12$), exprimant un manque d'impact de la mutation sur ce paramètre. Par la suite, nous avons comparé les ratios du nombre de traversées sans faute, soit les traversées où les pattes de la souris ne glissent jamais de la poutre, divisé par le nombre total de traversées. Les ratios obtenus nous renseignent sur la proportion de traversées parfaitement effectuées par les souris de chaque groupe. Les analyses statistiques indiquent un impact significatif de l'âge ($F_{2,55} \geq 10,23$; $p \leq 0,0002$) et du génotype ($F_{1,55} \geq 8,959$; $p \leq 0,0041$), une différence significative entre les génotypes des 2 lignées étant présente uniquement au 6^e mois (figure 8, B-B'; $t \geq 2,75$; $p \leq 0,026$).

De plus, le test d'équilibre sur la poutre permet de mettre en lumière l'impact de la mutation R394C sur le nombre moyen de glissements de pattes par traversée, reflétant le caractère progressif de la condition dystonique des patients. L'analyse du nombre d'erreurs

moyen révèle non seulement un effet de l'âge ($F_{2,55} \geq 6,489$; $p \leq 0,0030$), mais aussi du génotype ($F_{1,55} \geq 10,49$; $p \leq 0,0020$). D'ailleurs, une différence significative entre les génotypes est présente au 12^e mois pour les 2 lignées (figure 8, C-C'; $t \geq 3,30$; $p \leq 0,0051$), ce qui suggère que la mutation de GDF de *Rarb* influence progressivement la précision ou la fluidité motrice des souris mutantes jusqu'à instaurer une différence notable à l'âge de 12 mois. Parallèlement, la poutre que nous avons utilisée pour ce paradigme a un diamètre qui rétrécit avec la longueur, passant de 4 cm au départ à 0,5 cm à l'extrémité opposée. Conséquemment, étant donné que la difficulté de la tâche augmente graduellement avec la réduction de la largeur de la poutre, la distance moyenne parcourue au 1^{er} glissement de patte vient alors aussi nous renseigner sur les aptitudes motrices des souris. À nouveau, il est possible d'observer que les souris porteuses de la mutation de GDF commencent à glisser plus tôt que leurs congénères WT (figure 8, D-D'). La mutation R394C affecte donc significativement la distance parcourue selon l'âge ($F_{2,55} \geq 4,762$; $p \leq 0,012$) et selon le génotype ($F_{1,55} \geq 5,571$; $p \leq 0,022$). Par ailleurs, la différence entre les génotypes est présente au 6^e mois pour la 2^e lignée (figure 8, D'; $t = 2,53$; $p = 0,043$), de même qu'au 12^e mois pour la 1^{re} lignée (figure 8, D; $t = 2,59$; $p = 0,039$).

Bref, la présence d'un effet de l'âge sur chacun des 4 paramètres mesurés lors du test d'équilibre sur la poutre rappelle la régression motrice qui survient de façon normale chez la souris, lors de son vieillissement (Fahlstrom et al., 2012). Cependant, l'effet du génotype, observé pour 3 des 4 paramètres de ce test, montre que la mutation R394C a un impact sur la précision de la performance des souris mutantes sans pour autant affecter la vitesse à laquelle elles traversent la poutre. Cela suggère une capacité intacte à générer le mouvement, mais un déficit qui se situe plutôt dans la fluidité de l'exécution, rappelant par le fait même la condition dystonique des patients.

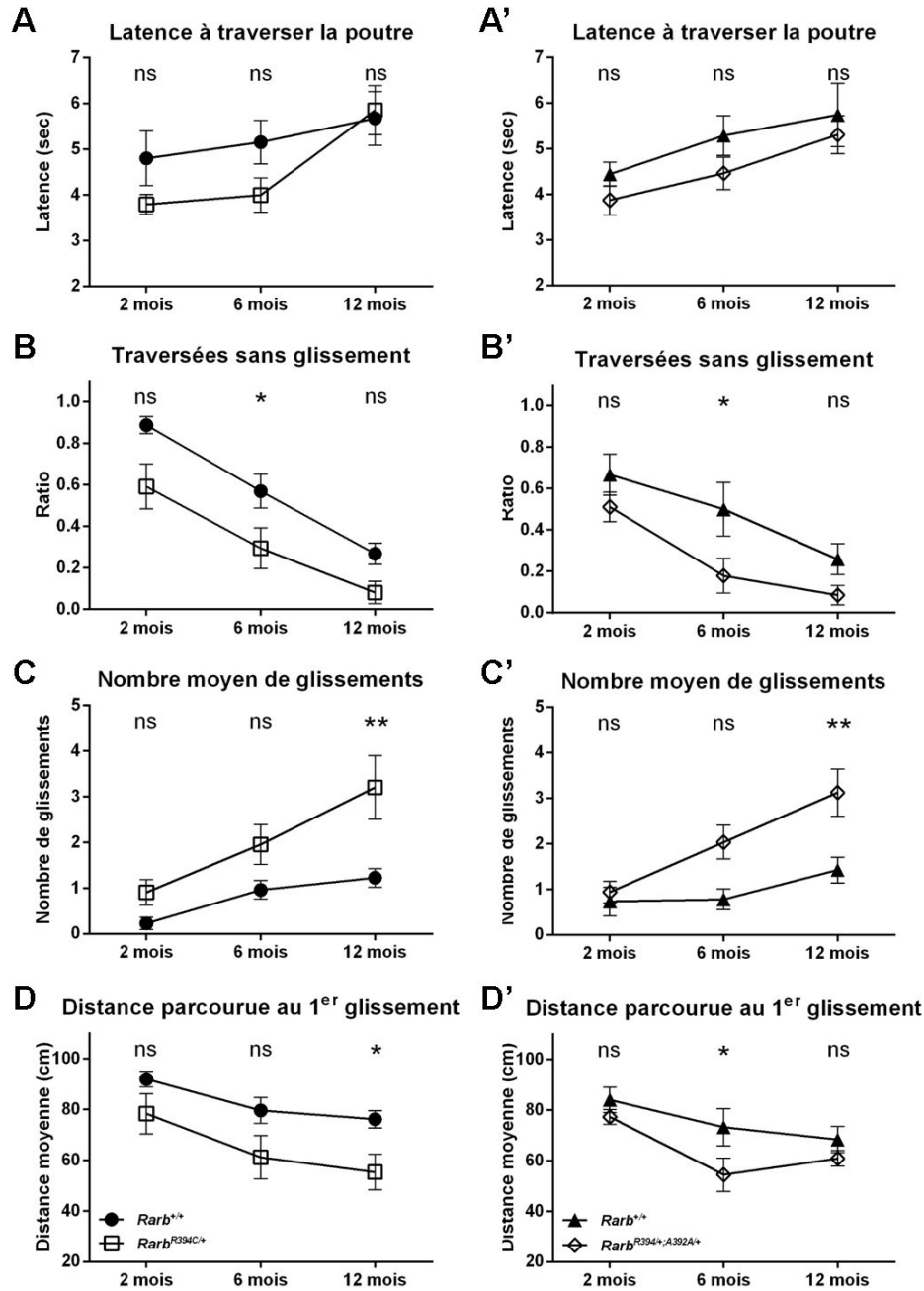


Figure 8. Performance des souris mutantes lors du paradigme de la traversée en équilibre sur la poutre. La latence moyenne à traverser, le ratio de traversées sans faute, le nombre moyen de glissements de pattes par traversée et la distance parcourue lors du 1^{er} glissement de patte des souris de la 1^{re} lignée (A,B,C,D) et de la 2^e lignée (A',B',C',D'). (A-D') 1^{re} lignée ($Rarb^{R394C/+}$) : n = 11 WT, 9 HET; 2^e lignée ($Rarb^{R394C/+; A392A/+}$) : n = 10 WT, 13 HET. Indépendamment pour chaque lignée, les génotypes ont été comparés à l'aide d'ANOVAs à 2 facteurs (Génotype, âge) suivies de comparaisons multiples de Bonferroni. *, p < 0,05; **, p < 0,01 comparativement aux compagnons de cage WT. ns : non significatif.

3.3. Résultats des expériences d'IHC

3.3.1. La mutation R394C n'influence pas le nombre de neurones exprimant le récepteur dopaminergique D1

Une étude récente menée chez la souris au stade embryonnaire a révélé que la perte de fonction de RARB induit une diminution de l'ARN messager des gènes *Drd1* et *SP*, deux marqueurs des neurones de la voie directe, suggérant une réduction de la population neuronale striato-nigree (Rataj-Baniowska et al., 2015). Par conséquent, nous avons voulu investiguer l'impact de la mutation de GDF de *Rarb* sur les 2 principales populations de NEMs dans le striatum de nos souris. Pour ce faire, nous avons croisé une de nos souris mutantes (*Rarb*^{R394C/+}) avec une souris transgénique exprimant la protéine fluorescente tdTomato sous le contrôle du promoteur du gène *Drd1a*, présent dans les neurones de la voie striato-nigree. Marquée à l'aide d'un anticorps anti-RFP, la protéine tdTomato nous a servi d'intermédiaire afin de détecter les neurones exprimant le récepteur D1, étant donné que les anticorps ciblant ce dernier manquent de spécificité (Shuen et al., 2008).

Dans le but d'apprécier la densité de la population exprimant le récepteur dopaminergique D1, nous avons effectué des expériences d'IHC sur coupes flottantes et avons compté les cellules exprimant différents marqueurs, dans la partie dorsale du striatum rostral. Lors des quantifications des cellules marquées RFP⁺ et NeuN⁺, de même que celles doublement marquées RFP⁺-NeuN⁺, chez les souris WT (figure 9, A-B-C) et les souris mutantes (figure 9, D-E-F), aucune différence significative n'a été révélée entre les génotypes (figure 9, G). Les tests statistiques comparant les génotypes (tests de t indépendants suivis de la correction de Welch) ont révélé que les densités des marqueurs sont similaires pour les populations exprimant le

rapporteur fluorescent RFP ($77,6 \pm 20,2$ contre $65,8 \pm 12,7$; $t = 0,4973$; $p = 0,65$), le marqueur neuronal NeuN ($117,6 \pm 18,0$ contre $93,1 \pm 8,4$; $t = 1,23$; $p = 0,31$) et même le nombre de cellules étant doublement marquées ($73,6 \pm 20,0$ contre $60,7 \pm 13,0$; $t = 0,54$; $p = 0,62$) (figure 9, G). Les populations exprimant NeuN étant comparables, il est possible de calculer le ratio du nombre de cellules exprimant la protéine RFP sur le nombre de celles exprimant NeuN, permettant ainsi de normaliser les différences interindividuelles qu'il pourrait y avoir entre les animaux et qui pourraient camoufler un effet potentiel du génotype. Cependant, il n'y a toujours pas de différence significative suivant cette normalisation (figure 9, H; $0,61 \pm 0,066$ contre $0,64 \pm 0,076$; $t = 0,32$; $p = 0,77$). En somme, ces données suggèrent que la densité de la population exprimant le récepteur D1 n'est pas affectée par la mutation de GDF de *Rarb*.

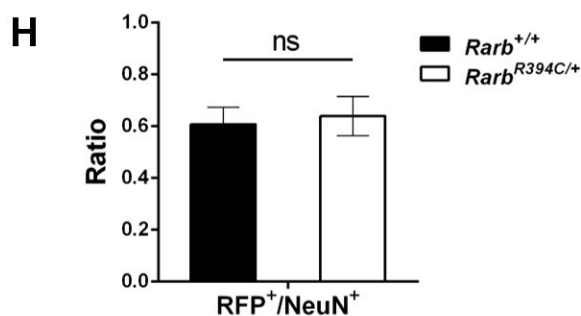
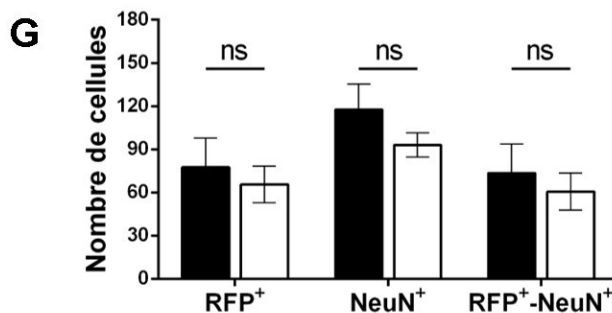
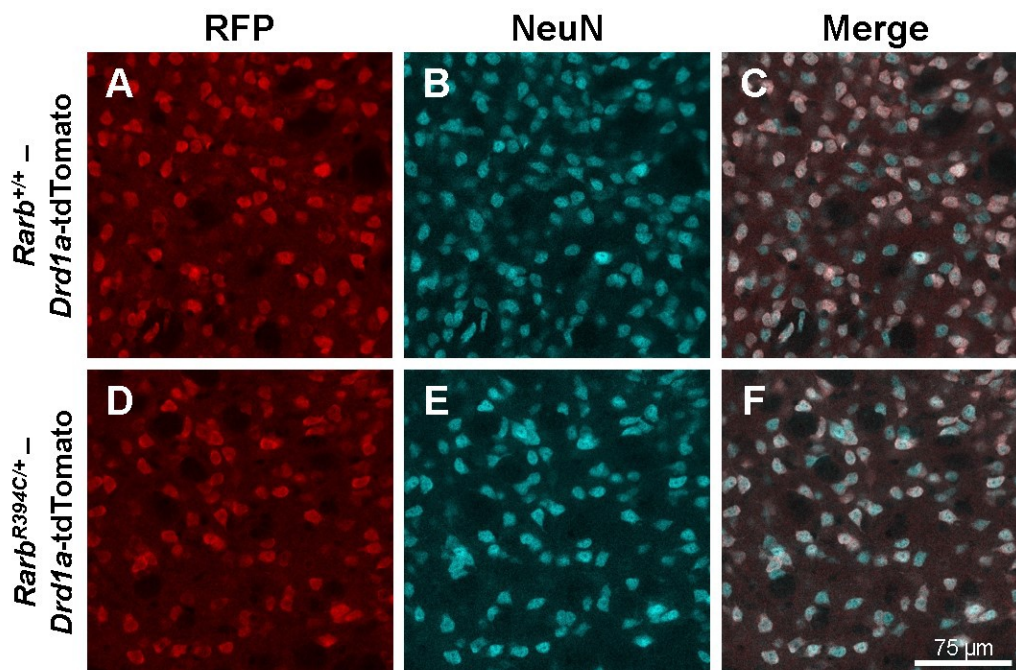


Figure 9. Quantification du nombre de neurones exprimant le récepteur dopaminergique D1 dans le striatum de souris mutantes. Images représentatives, prises par microscopie confocale, de l'expression des marqueurs RFP et NeuN, de même que leur colocalisation (*merge*) pour des souris *Rarb*^{+/+} (A,B,C) et *Rarb*^{R394C/+} (D,E,F) âgées de 1 mois. Le nombre de cellules marquées, et leur ratio, pour chaque génotype (G-H). Les données de 3 WT et 3 HET ont été utilisées. Les génotypes ont été comparés à l'aide de tests de t indépendants suivis d'une correction de Welch. ns : non significatif.

3.3.2. La mutation R394C induit une diminution du nombre de neurones exprimant le récepteur dopaminergique D2

Parallèlement aux expériences menées pour investiguer la distribution du récepteur D1, nous avons effectué des études similaires avec l'objectif de déterminer l'impact de la mutation sur le nombre de neurones striataux exprimant le récepteur dopaminergique D2. Pour ce faire, une mutante (*Rarb*^{R394C/+}) a été croisée avec une souris transgénique exprimant la protéine fluorescente GFP sous le contrôle du promoteur du gène *Drd2*, présent dans les NEMs de la voie striato-pallidée. Analogiquement, la protéine GFP nous a servi d'indicateur fiable afin de détecter les neurones exprimant le récepteur D2 (Gong et al., 2003).

Nous avons réalisé des études d'IHC et des comptages cellulaires similaires à ceux déjà effectués, en utilisant plutôt le marqueur GFP (figure 10, A-F). Inversement à ce que nous avons trouvé pour l'autre récepteur, la quantification des marqueurs de cette population de NEMs a révélé des différences notables entre les génotypes (figure 10, G). En effet, les souris mutantes ont significativement moins de cellules GFP⁺ ($56,7 \pm 6,2$ contre $33,9 \pm 5,1$; $t = 2,84$; $p = 0,031$), de même que de cellules doublement marquées GFP⁺-NeuN⁺ ($51,7 \pm 6,2$ contre $30,8 \pm 4,9$; $t = 2,65$; $p = 0,040$). De façon analogique, le simple marquage par NeuN demeure inchangé entre les génotypes ($131,2 \pm 14,9$ contre $108,9 \pm 17,5$; $t = 0,97$; $p = 0,37$), indicateur d'une population globale de neurones striataux similaire entre les souris WT et les mutantes. Ceci nous a permis de calculer le ratio de GFP⁺ sur NeuN⁺ et, même avec cette normalisation, les différences obtenues entre les génotypes étaient toujours présentes ($0,39 \pm 0,018$ contre $0,28 \pm 0,0030$; $t = 6,065$; $p = 0,0077$). Bien que la mutation R394C est restée sans effet sur le nombre de neurones exprimant le récepteur D1, ces données suggèrent en revanche qu'elle altère le nombre de neurones exprimant le récepteur D2 au sein de la population striato-pallidée, tel que dévoilé par

la diminution du rapporteur fluorescent GFP (figure 10, G). Puisque le rapporteur GFP n'est produit que dans les cellules où le gène *Drd2* est exprimé, une diminution du nombre de cellules GFP⁺ sans changement du nombre de cellules NeuN⁺ suggère une perte de la transcription du gène *Drd2* par certains neurones de la voie indirecte (Gong et al., 2003).

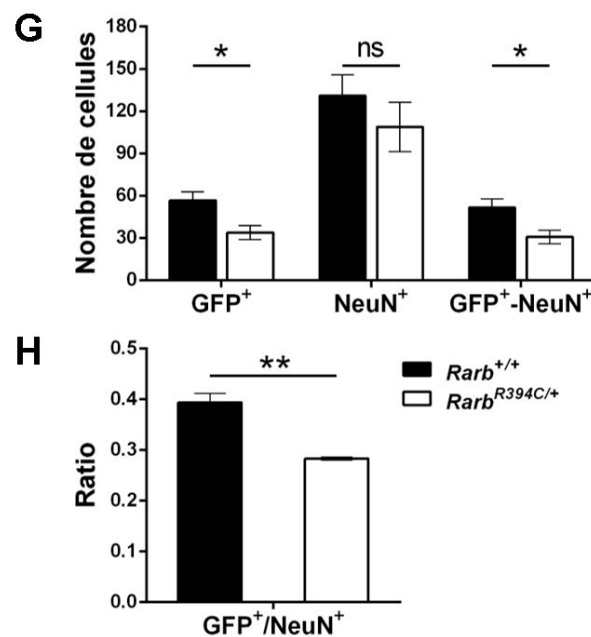
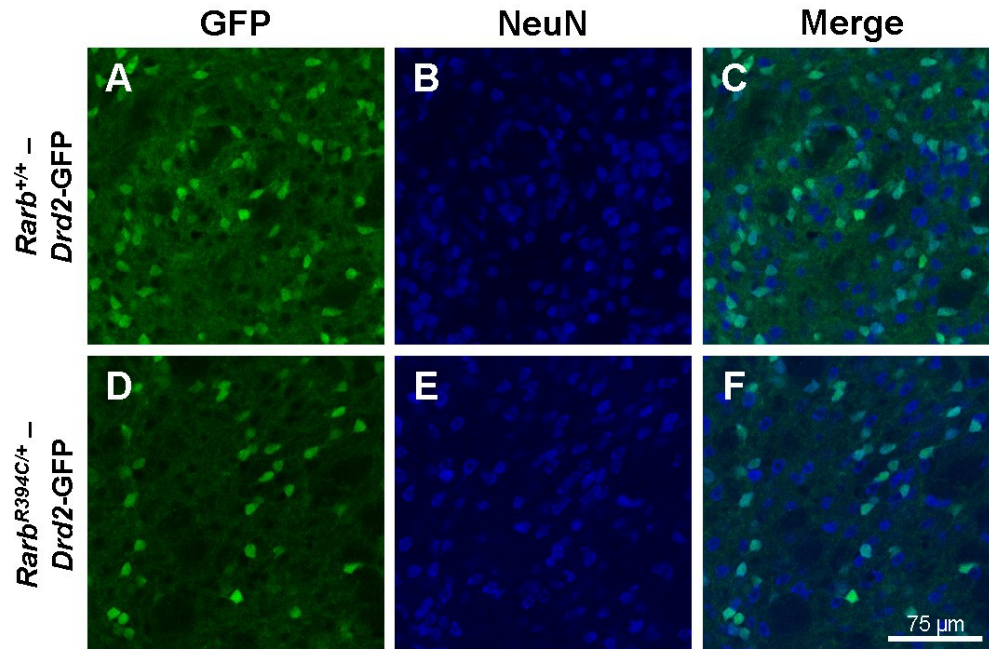


Figure 10. Quantification du nombre de neurones exprimant le récepteur dopaminergique D2 dans le striatum de souris mutantes. Images représentatives, prises par microscopie confocale, de l'expression des marqueurs GFP et NeuN, de même que leur colocalisation (*merge*) pour des souris *Rarb*^{+/+} (A,B,C) et *Rarb*^{R394C/+} (D,E,F) âgées de 1 mois. Le nombre de cellules marquées, et leur ratio, pour chaque génotype (G-H). Les données de 4 WT et 4 HET ont été utilisées. Les génotypes ont été comparés à l'aide de tests de t indépendants suivis d'une correction de Welch. *, p < 0,05; **, p < 0,01 comparativement aux compagnons de cage WT. ns : non significatif.

Chapitre 4 : Discussion

La dystonie progressive à début précoce, dont les patients de mutations de GDF dans *RARB* sont atteints, affecte considérablement leur qualité de vie, car ils en viennent à perdre la faculté de marcher et de s'asseoir, cette régression motrice ayant également conduit à la mort de plusieurs d'entre eux (Srour et al., 2013; Srour et al., 2016). La dystonie découle notamment d'une dysfonction du striatum, structure cérébrale où RARB est exprimé de façon prédominante chez l'adulte (Narbona et al., 1984). Bien que le rôle de RARB ait été étudié depuis plusieurs années à l'aide de modèles animaux porteurs de mutations de perte de fonction, rien n'était connu concernant la fonction *in vivo* du récepteur portant une mutation de GDF (Krezel et al., 1998).

Selon ces observations, nous avons émis l'hypothèse que l'augmentation de la signalisation de l'AR, médiée par RARB, induit la dystonie chez les patients porteurs de mutations de GDF en affectant le développement et/ou la fonction du striatum, possiblement par la perturbation des mêmes voies moléculaires que celles affectées par la diminution de la signalisation médiée par RARB. Dans le but d'étudier la contribution des mutations de GDF sur la fonction de RARB, nous avons voulu investiguer si des souris transgéniques, modélisant la pathologie, montrent un phénotype moteur similaire à celui des patients, puis évaluer l'intégrité du striatum de ces souris à l'aide de biomarqueurs spécifiques aux 2 voies fonctionnelles striatales.

Les résultats de cette étude mettent en lumière l'impact qu'ont les mutations de GDF dans le gène *Rarb* sur les habiletés motrices des souris, de même que sur la progression du phénotype. Générées par la technologie de CRISPR-Cas9, les souris transgéniques porteuses de la mutation

R394C, homologue de la récurrente mutation humaine R387C, montrent un profil comportemental locomoteur qui reflète bien la dystonie dont sont atteints les patients de mutations de GDF dans *RARB*.

Premièrement, le test du champ ouvert (*open field*) a révélé un phénotype d'hyperactivité chez les souris hétérozygotes, exprimé par une plus grande distance parcourue et une plus grande partie du temps passée en mouvement (figures 3 et 4). Bien qu'un phénotype d'hyperactivité puisse sembler en conflit avec celui d'une pathologie du mouvement comme la dystonie, nos résultats concordent avec ceux présents dans la littérature puisque ce signe moteur a été rapporté chez plusieurs modèles murins de dystonie (Shashidharan et al., 2005; Yokoi et al., 2006; Gantois et al., 2007; Richter and Richter, 2014; Pappas et al., 2015). Ainsi, même si un comportement moteur hyperactif n'a jamais été rapporté chez les patients porteurs de mutations de GDF dans *RARB*, il est possible que cette caractéristique ait été masquée par la progression de la dystonie qui, dans plusieurs cas, engendre une régression des fonctions motrices en l'espace de quelques années (Srour et al., 2016).

Par ailleurs, la dystonie étant caractérisée par des contractions musculaires involontaires et soutenues produisant des torsions et des postures anormales (Albanese et al., 2013), il n'est donc pas surprenant d'observer un déficit de coordination marqué chez les souris mutantes, reflété par une latence à chuter significativement réduite lors du paradigme du rotarod (figure 5, A-A') et un nombre accru de glissements de pattes lors de la traversée de la poutre (figure 8, C-C'). Cette large différence de coordination observée au test du rotarod pourrait être partiellement expliquée par les résultats obtenus lors de l'analyse de la démarche. En effet, étant donné que les souris mutantes effectuent des enjambées avant et arrière de plus courte amplitude (figure 6, D-

E'), cela entraverait leur capacité à maintenir le rythme sur le rotor en accélération comme le font leurs congénères WT, les faisant chuter plus rapidement (figure 5, A-A').

Néanmoins, les résultats recueillis par l'analyse de la démarche ne sauraient expliquer entièrement le phénotype locomoteur mesuré lors des paradigmes du rotarod et celui de l'équilibre sur la poutre (figures 5, 6 et 8). En effet, alors que les différences observées dans les paramètres de la démarche sont relativement stables au cours du temps, la performance au rotarod décline dans le temps pour toutes les souris et les différences entre les génotypes à la traversée de la poutre ne surviennent qu'à 6 ou 12 mois. De plus, comme les souris mutantes possèdent une masse corporelle réduite comparativement à leurs congénères WT (figure 2 A-A'), cela suggère qu'elles pourraient être de plus petite taille que les WT, ce qui serait donc la source des différences observées lors de l'analyse de la démarche (figure 6). Cependant, cette différence de masse n'explique pas totalement les différences observées dans la démarche, car les longueurs des enjambées avant et arrière des mutantes sont déjà plus courtes à l'âge de 2 mois (figure 6, D-E'), alors que leur masse est similaire à celle des WT à ce stade (figure 2, A-A'). De plus, alors que des différences dans la largeur de la base avant peuvent être notées aussitôt qu'à l'âge de 2 mois (figure 6, B-B'), la largeur de la base arrière des mutantes est comparable à celle des WT, à l'exception d'une différence présente à 12 mois chez une seule lignée (figure 6, C'). Ainsi, la masse corporelle des souris mutantes ne peut également pas expliquer entièrement leur phénotype comportemental puisque les différences observées dans la masse ne sont pas toujours corrélées avec celles présentes dans les paradigmes du rotarod, de l'analyse de la démarche et de la traversée de la poutre. En effet, alors que la masse des souris est similaire à 2 mois, la différence dans les performances au rotarod est présente à tous les stades (figure 5, A-A') et

connote donc de l'implication de la mutation GDF de *Rarb* dans la pathophysiologie de cette forme rare de dystonie.

Parallèlement, tout comme les patients, les souris mutantes présentent également une fréquence plus élevée de microphthalmie (figure 2, C-C') (Srouf et al., 2016). Bien que RARB joue un rôle dans le développement de l'œil (Ghyselinck et al., 1997), une réduction des globes oculaires est une condition qui peut naturellement survenir chez les souris de souche C57BL/6 avec une fréquence pouvant atteindre 12% (Smith et al., 1994). À la suite d'une inspection visuelle, la présence de globes oculaires de taille normale (figure 2, B, panneau du haut) ou affectés par la microphthalmie (figure 2, B, panneau du bas) a été notée chez les souris WT et les mutantes. L'analyse statistique a révélé une fréquence nettement plus grande chez les souris porteuses de la mutation que chez les WT (figure 2, C-C'), indiquant un effet de la mutation de GDF de *Rarb* qui ne peut être qu'uniquement attribué au fond génétique des souris. Considérant que cette condition ophtalmologique peut être accompagnée d'anomalies de la vision comme c'est le cas chez les patients, il est plausible que cela ait pu avoir un impact sur les résultats des souris lors des tests comportementaux (Verma and Fitzpatrick, 2007; Srouf et al., 2016). Néanmoins, une étude a montré que les souris aveugles peuvent utiliser l'information qu'elles perçoivent avec leurs moustaches, leur permettant ainsi de performer de façon similaire aux souris dont la vision est intacte pour les tests du rotarod, de l'équilibre sur la poutre, d'empreintes et même dans le champ ouvert (*open field*) (Voller et al., 2014). Conséquemment, ces observations suggèrent que les souris semblent dépendre davantage des informations tactiles que visuelles, mais également que les différences comportementales mesurées chez nos souris mutantes seraient bel et bien attribuables à la mutation de GDF de *Rarb* (Voller et al., 2014). Malgré tout, cela constitue une interprétation indirecte et qualitative de l'acuité visuelle de nos

souris et l'absence de données quantitatives pour ce paramètre représente une limitation de notre étude.

Encore, le comportement moteur des souris porteuses de la mutation de GDF rappelle aussi le phénotype de nos patients lors du test de suspension à quatre pattes. En effet, dans le but de s'assurer que le phénotype locomoteur observé dans les autres tests découlait bien d'une dysfonction neurologique, comme les troubles du mouvement, et non pas seulement d'une faiblesse musculaire, nos souris ont été soumises au test de suspension afin de mesurer leur capacité à générer et maintenir de l'activité musculaire. Une normalisation des scores avec la masse respective des souris a indiqué que les souris mutantes sont en mesure de générer une impulsion de suspension comparable à celle des WT, dénotant des capacités musculaires similaires (figure 7, B-B'), comme cela a été relevé chez d'autres modèles de dystonie (DeAndrade et al., 2011; Bhagat et al., 2016). La cause du profil dystonique des souris ne résiderait donc pas dans la capacité à générer le mouvement, mais découlerait plutôt d'une réduction de la fluidité dans l'exécution de celui-ci, expliquant les résultats contrastants observés au rotarod et au test de suspension (figures 5 et 7). Toutefois, la durée de suspension n'offre pas d'information précise sur des muscles particuliers. Ainsi, elle constitue une limitation de notre étude, surtout lorsque l'on considère que la dystonie peut causer une suractivation de muscles antagonistes et même un déficit dans la relaxation musculaire (Buccolieri et al., 2004; Jinnah and Factor, 2015). Alternativement, il serait possible d'utiliser un appareil mesurant la force de préhension (*grip-strength meter*) ou encore d'effectuer des enregistrements d'électromyographie.

Parallèlement, le comptage cellulaire chez les animaux n'a révélé aucune différence dans la population neuronale exprimant la protéine tdTomato, indiquant que les populations exprimant le récepteur dopaminergique D1 sont de densité comparable entre les souris WT et les mutantes.

De plus, nous avons aussi noté une diminution du nombre de neurones exprimant le marqueur GFP, signe d'une réduction du nombre de NEMs exprimant le récepteur D2 chez les souris portant la mutation R394C. Sachant que le rapporteur GFP n'est produit que dans les cellules où le gène *Drd2* est exprimé et que la population neuronale totale du striatum est restée inchangée, la diminution du marquage GFP suggère une perte de la transcription du gène *Drd2* par certains neurones de la voie indirecte (Gong et al., 2003). Conséquemment, ces neurones de la voie striato-pallidée seraient toujours présents, mais ne seraient plus détectés par le marquage GFP. Potentiellement, ceci pourrait indiquer la présence d'un déséquilibre entre les voies directe et indirecte à la source des perturbations motrices observées chez nos souris *Rarb*^{R394C/+}. Par ailleurs, des études montrent que l'ablation de *Rarb* chez les souris (*Rarb*^{-/-}) affecte l'expression du récepteur D1 lors du développement embryonnaire et diminue l'expression du récepteur D2 plus tard à l'âge adulte, sous-tendant leurs déficits locomoteurs (Samad et al., 1997; Krezel et al., 1998; Rataj-Baniowska et al., 2015; Niewiadomska-Cimicka et al., 2017). Bien que nos résultats chez les mutants *Rarb*^{R394C/+} sont en accord avec le changement du récepteur D2 à l'âge adulte, il est judicieux de mettre en exergue le fait que nos données reflètent l'expression de protéines fluorescentes rapportant la présence des récepteurs dopaminergiques chez des souris hétérozygotes pour le GDF de *Rarb* (*Rarb*^{R394C/+}) alors que les résultats des études précédentes proviennent de souris homozygotes pour la perte de fonction de *Rarb* (*Rarb*^{-/-}). Par conséquent, puisque notre mutation affecte le nombre de NEMs exprimant le récepteur D2, mais pas D1 chez les hétérozygotes (*Rarb*^{R394C/+}), il serait intéressant d'investiguer l'impact cellulaire, au stade embryonnaire, de nos souris hétérozygotes (*Rarb*^{R394C/+}) et homozygotes (*Rarb*^{R394C/R394C}) et s'il est compatible avec celui des souris *Rarb*^{-/-}. Néanmoins, puisque des anomalies en lien avec les récepteurs D1 et D2 ont été associées à la dystonie, il est alors possible que des différences soient

observées dans l'expression des gènes cibles de nos mutants comparativement aux mutants *Rarb*^{-/-}, ce qui reflèterait une réelle distinction fonctionnelle entre les mutations de perte et de gain de fonction de *Rarb*, (Klein et al., 1999; Gantois et al., 2007; Sciamanna et al., 2009; Yokoi et al., 2015; Zhang et al., 2015b). Toutefois, un point faible de notre étude provient du fait que les comptages cellulaires ont été effectués manuellement ce qui peut représenter une source d'erreurs. Il serait idéal de répéter les expériences d'IHC en effectuant des comptages stéréologiques non-biaisés et en utilisant davantage d'animaux par génotype afin d'augmenter la puissance statistique.

Globalement, le phénotype de notre modèle de souris est compatible avec le tableau clinique observé chez les patients de dystonie progressive liée aux GDF de *RARB*. En effet, tout comme les patients, les souris présentent de la microphthalmie et des anomalies locomotrices qui peuvent être relevées dans plusieurs paradigmes moteurs. Aussi, ce phénotype moteur semble progressif, notamment entre le 6^e et le 12^e mois pour la distance totale dans le champ ouvert (figure 3, C-C') et le nombre de fautes commises sur la poutre (figure 8, C-C'), connotant la régression des facultés motrices que montrent plusieurs patients. Malgré certaines différences très ponctuelles entre les lignées, lorsque l'on considère l'ensemble des résultats, il est possible de noter que le portrait pathophysiologique des souris mutantes est très robuste entre nos 2 lignées et qu'il témoigne, non seulement, de celui des patients, mais également de celui de plusieurs modèles murins de dystonie. De même, cela confirme que la mutation synonyme A392A semble bel et bien silencieuse du point de vue comportemental, quoique cela reste à tester en ce qui a trait aux données immunohistochimiques.

Les expériences d'IHC ont permis d'éclairer un mécanisme d'action potentiel par lequel se développerait la dystonie, c'est-à-dire un débalancement dans la circuiterie fonctionnelle des

voies directe et indirecte médié par la réduction de l'expression du récepteur dopaminergique D2 du striatum. Par ailleurs, une diminution de la liaison au récepteur D2 est rencontrée chez les patients de divers types de dystonie (Thompson et al., 2011). Étant donné qu'une activité normale de leurs transporteurs à dopamine du côté présynaptique suggère une fonction normale des autorécepteurs, cette dysfonction des NEMs de la voie indirecte serait alors imputable aux récepteurs D2 postsynaptiques résultant en une désinhibition de la signalisation thalamocorticale (Naumann et al., 1998). En accord avec ces résultats, un modèle murin de dystonie montre lui aussi des anomalies électrophysiologiques de l'activité du récepteur D2 postsynaptique, sans altérations du côté présynaptique et sans changements dans la signalisation glutamatergique striatale (Sciamanna et al., 2009; Napolitano et al., 2010). Alternativement, une étude récente suggère que l'expression du récepteur D2 puisse être modulée par la protéine régulatrice RGS9-2 et que l'augmentation des niveaux de cette dernière permettrait de corriger la diminution de l'expression de D2 chez un modèle de dystonie (Bonsi et al., 2019).

En parallèle, sachant que le sommeil joue un rôle important dans la consolidation des apprentissages moteurs et que des perturbations du sommeil sont présentes chez quelques-uns de nos patients, notamment reliées à l'apnée obstructive du sommeil, il serait intéressant d'évaluer la neurophysiologie du sommeil de nos souris (Walker et al., 2002). En effet, il est connu que des dérèglements du sommeil surviennent fréquemment chez les patients de dystonie et que la qualité du sommeil peut être reliée à la sévérité de leurs symptômes moteurs (Avanzino et al., 2010; Kuyper et al., 2011). Par ailleurs, une étude a suggéré que la signalisation de l'AR médiée par RARB influence la synchronie corticale, notamment en période de sommeil (Maret et al., 2005). En effet, des enregistrements d'électroencéphalographie chez ces souris, dont les différents isoformes de *Rarb* ont été ablatés, montrent des perturbations de l'activité de la bande

de fréquences delta (1-4 Hz), principal marqueur de la pression homéostatique du sommeil (Neckelmann and Ursin, 1993; Maret et al., 2005). Le rythme delta représente la synchronisation de l'activité d'une grande population de neurones présents dans les circuits corticaux et thalamocorticaux, ces boucles étant d'ailleurs fortement impliquées dans la signalisation dopaminergique et celle des ganglions de la base (Steriade et al., 1993; Haber, 2014; Ikemoto et al., 2015). Déjà, il est connu qu'une déficience dans l'apport en vitamine A, chez la souris, réduit l'activité des ondes delta et diminue la locomotion sur 24 heures et le métabolisme dopaminergique dans le striatum (Kitaoka et al., 2007). De plus, l'utilisation d'un antagoniste qui serait spécifique à RARB induit cette réduction du delta, mais serait aussi accompagné d'une réduction de l'expression du récepteur D1 (Li et al., 1999; Kitaoka et al., 2011). Ces résultats suggèrent une interaction notable entre les signalisations de l'AR et de la dopamine dans la régulation motrice induite par le sommeil. Ainsi, l'étude des paramètres neurophysiologiques du sommeil de nos souris permettrait d'évaluer la présence de telles anomalies et, le cas échéant, d'améliorer la qualité du sommeil de nos patients à l'aide de traitements appropriés et de réduire l'exacerbation des déficits moteurs et/ou cognitifs que peut induire un sommeil dysfonctionnel (Alhola and Polo-Kantola, 2007; Scullin and Bliwise, 2015).

Chapitre 5 : Conclusion

En somme, les souris transgéniques porteuses de la mutation *de novo* R394C causant un GDF de la protéine RARB constituent un modèle robuste de la pathologie motrice sévère et progressive observée chez nos patients dystoniques. Cette étude a permis de confirmer que nos souris transgéniques de GDF présentent un tableau phénotypique semblable à celui des patients et que leur comportement locomoteur s'aligne sur celui des souris dont la fonction de *Rarb* a été ablatée. Néanmoins, comme plusieurs anomalies dans les signalisations dopaminergique et de l'AR ont été relevées dans les ganglions de la base, en ce qui a trait à la dystonie, nos données sont en accord avec l'hypothèse d'un déséquilibre fonctionnel dans les voies directe et indirecte. Dans le but de clarifier comment le fonctionnement de la circuiterie des ganglions de la base est potentiellement modifié chez nos souris, il serait intéressant d'effectuer des mesures de libération de dopamine et/ou des expériences électrophysiologiques. Alternativement, des expériences de réponse comportementale aux agonistes dopaminergiques pourraient aussi appuyer les résultats des tests *in vivo*. En perspectives, il serait souhaitable d'effectuer des expériences d'étude du transcriptome de nos souris, afin d'élucider l'impact des mutations de GDF de *RARB* sur l'expression de gènes cibles, de même que leur évaluation comportementale cognitive. Finalement, cette étude pourrait contribuer à comprendre les troubles neurodégénératifs des ganglions de la base, comme les maladies de Huntington et de Parkinson, dans lesquels la signalisation de l'AR et RARB semble également être compromise (Yin et al., 2012; Niewiadomska-Cimicka et al., 2017; Kim et al., 2018).

Références bibliographiques

- Abdo WF, van de Warrenburg BP, Burn DJ, Quinn NP, Bloem BR (2010) The clinical approach to movement disorders. *Nat Rev Neurol* 6:29-37.
- Addae C, Yi X, Gernapudi R, Cheng H, Musto A, Martinez-Ceballos E (2012) All-trans-retinoid acid induces the differentiation of encapsulated mouse embryonic stem cells into GABAergic neurons. *Differentiation* 83:233-241.
- Ade KK, Wan Y, Chen M, Gloss B, Calakos N (2011) An Improved BAC Transgenic Fluorescent Reporter Line for Sensitive and Specific Identification of Striatonigral Medium Spiny Neurons. *Front Syst Neurosci* 5:32.
- Albanese A, Bhatia K, Bressman SB, DeLong MR, Fahn S, Fung VS, Hallett M, Jankovic J, Jinnah HA, Klein C, Lang AE, Mink JW, Teller JK (2013) Phenomenology and classification of dystonia: a consensus update. *Mov Disord* 28:863-873.
- Alhola P, Polo-Kantola P (2007) Sleep deprivation: Impact on cognitive performance. *Neuropsychiatric disease and treatment* 3:553-567.
- Arakawa H, Blanchard DC, Arakawa K, Dunlap C, Blanchard RJ (2008) Scent marking behavior as an odorant communication in mice. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 32:1236-1248.
- Avanzino L, Martino D, Marchese R, Aniello MS, Minafra B, Superbo M, Defazio G, Abbruzzese G (2010) Quality of sleep in primary focal dystonia: a case-control study. *Eur J Neurol* 17:576-581.
- Avena NM, Rada P, Hoebel BG (2008) Evidence for sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 32:20-39.
- Bach JP, Ziegler U, Deuschl G, Dodel R, Doblhammer-Reiter G (2011) Projected numbers of people with movement disorders in the years 2030 and 2050. *Mov Disord* 26:2286-2290.
- Balleine BW, Liljeholm M, Ostlund SB (2009) The integrative function of the basal ganglia in instrumental conditioning. *Behavioural brain research* 199:43-52.
- Balmer JE, Blomhoff R (2002) Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res* 43:1773-1808.
- Barrangou R, Marraffini LA (2014) CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol Cell* 54:234-244.
- Batla A, Sanchez MC, Erro R, Ganos C, Stamelou M, Balint B, Brugger F, Antelmi E, Bhatia KP (2015) The role of cerebellum in patients with late onset cervical/segmental dystonia?--evidence from the clinic. *Parkinsonism Relat Disord* 21:1317-1322.
- Beaulieu JM, Gainetdinov RR (2011) The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev* 63:182-217.
- Beck S, Hallett M (2011) Surround inhibition in the motor system. *Experimental brain research* 210:165-172.
- Bhagat SL, Qiu S, Caffall ZF, Wan Y, Pan Y, Rodriguiz RM, Wetsel WC, Badea A, Hochgeschwender U, Calakos N (2016) Mouse model of rare TOR1A variant found in sporadic focal dystonia impairs domains affected in DYT1 dystonia patients and animal models. *Neurobiology of disease* 93:137-145.
- Bloem B, Huda R, Sur M, Graybiel AM (2017) Two-photon imaging in mice shows striosomes and matrix have overlapping but differential reinforcement-related responses. *eLife* 6.

- Bonsi P, Ponterio G, Vanni V, Tassone A, Sciamanna G, Migliarini S, Martella G, Meringolo M, Dehay B, Doudnikoff E, Zachariou V, Goodchild RE, Mercuri NB, D'Amelio M, Pasqualetti M, Bezard E, Pisani A (2019) RGS9-2 rescues dopamine D2 receptor levels and signaling in DYT1 dystonia mouse models. *EMBO Mol Med* 11.
- Borgkvist A, Avegno EM, Wong MY, Kheirbek MA, Sonders MS, Hen R, Sulzer D (2015) Loss of Striatonigral GABAergic Presynaptic Inhibition Enables Motor Sensitization in Parkinsonian Mice. *Neuron* 87:976-988.
- Bouthenet ML, Souil E, Martres MP, Sokoloff P, Giros B, Schwartz JC (1991) Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain Res* 564:203-219.
- Brittain JS, Brown P (2014) Oscillations and the basal ganglia: motor control and beyond. *NeuroImage* 85 Pt 2:637-647.
- Brooks SP, Dunnett SB (2009) Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nature reviews Neuroscience* 10:519-529.
- Brown P (2003) Oscillatory nature of human basal ganglia activity: relationship to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Mov Disord* 18:357-363.
- Buccolieri A, Avanzino L, Marinelli L, Trompetto C, Marchese R, Abbruzzese G (2004) Muscle relaxation is impaired in dystonia: a reaction time study. *Mov Disord* 19:681-687.
- Calabresi P, Misgeld U, Dodt HU (1987) Intrinsic membrane properties of neostriatal neurons can account for their low level of spontaneous activity. *Neuroscience* 20:293-303.
- Camargos S, Cardoso F (2016) Understanding dystonia: diagnostic issues and how to overcome them. *Arq Neuropsiquiatr* 74:921-936.
- Carapito R, Paul N, Untrau M, Le Gentil M, Ott L, Alsaleh G, Jochem P, Radosavljevic M, Le Caignec C, David A, Damier P, Isidor B, Bahram S (2015) A de novo ADCY5 mutation causes early-onset autosomal dominant chorea and dystonia. *Mov Disord* 30:423-427.
- Cardinal RN, Parkinson JA, Hall J, Everitt BJ (2002) Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 26:321-352.
- Carlson CG, Rutter J, Bledsoe C, Singh R, Hoff H, Bruemmer K, Sesti J, Gatti F, Berge J, McCarthy L (2010) A simple protocol for assessing inter-trial and inter-examiner reliability for two noninvasive measures of limb muscle strength. *J Neurosci Methods* 186:226-230.
- Carter RJ, Morton J, Dunnett SB (2001) Motor coordination and balance in rodents. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 8:Unit 8.12.
- Carter RJ, Lione LA, Humby T, Mangiarini L, Mahal A, Bates GP, Dunnett SB, Morton AJ (1999) Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:3248-3257.
- Charlesworth G, Plagnol V, Holmstrom KM, Bras J, Sheerin UM, Preza E, Rubio-Agusti I, Ryten M, Schneider SA, Stamelou M, Trabzuni D, Abramov AY, Bhatia KP, Wood NW (2012) Mutations in ANO3 cause dominant craniocervical dystonia: ion channel implicated in pathogenesis. *American journal of human genetics* 91:1041-1050.
- Chatzi C, Brade T, Duester G (2011) Retinoic acid functions as a key GABAergic differentiation signal in the basal ganglia. *PLoS Biol* 9:e1000609.
- Chevalier G, Deniau JM (1990) Disinhibition as a basic process in the expression of striatal functions. *Trends in neurosciences* 13:277-280.

- Chiang MY, Misner D, Kempermann G, Schikorski T, Giguere V, Sucov HM, Gage FH, Stevens CF, Evans RM (1998) An essential role for retinoid receptors RARbeta and RXRgamma in long-term potentiation and depression. *Neuron* 21:1353-1361.
- Clagett-Dame M, McNeill EM, Muley PD (2006) Role of all-trans retinoic acid in neurite outgrowth and axonal elongation. *J Neurobiol* 66:739-756.
- Cohlan SQ (1953) Excessive intake of vitamin A as a cause of congenital anomalies in the rat. *Science* 117:535-536.
- Cooper DN, Krawczak M, Polychronakos C, Tyler-Smith C, Kehrer-Sawatzki H (2013) Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. *Hum Genet* 132:1077-1130.
- Crandall JE, Goodman T, McCarthy DM, Duester G, Bhide PG, Drager UC, McCaffery P (2011) Retinoic acid influences neuronal migration from the ganglionic eminence to the cerebral cortex. *J Neurochem* 119:723-735.
- Crawley JN (1985) Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 9:37-44.
- Crawley JN, Paylor R (1997) A proposed test battery and constellations of specific behavioral paradigms to investigate the behavioral phenotypes of transgenic and knockout mice. *Horm Behav* 31:197-211.
- Crittenden JR, Graybiel AM (2011) Basal Ganglia disorders associated with imbalances in the striatal striosome and matrix compartments. *Front Neuroanat* 5:59.
- Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM (1999) The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology* 122 (Pt 8):1437-1448.
- Deacon TW, Pakzaban P, Isacson O (1994) The lateral ganglionic eminence is the origin of cells committed to striatal phenotypes: neural transplantation and developmental evidence. *Brain Res* 668:211-219.
- DeAndrade MP, Yokoi F, van Groen T, Lingrel JB, Li Y (2011) Characterization of Atp1a3 mutant mice as a model of rapid-onset dystonia with parkinsonism. *Behavioural brain research* 216:659-665.
- DeFries JC, Hegmann JP, Weir MW (1966) Open-field behavior in mice: evidence for a major gene effect mediated by the visual system. *Science* 154:1577-1579.
- Del'guidice T, Lemasson M, Beaulieu JM (2011) Role of Beta-arrestin 2 downstream of dopamine receptors in the Basal Ganglia. *Front Neuroanat* 5:58.
- Di Chiara G, Bassareo V, Fenu S, De Luca MA, Spina L, Cadoni C, Acquas E, Carboni E, Valentini V, Lecca D (2004) Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:227-241.
- Dolle P (2009) Developmental expression of retinoic acid receptors (RARs). *Nucl Recept Signal* 7:e006.
- Dudman JT, Eaton ME, Rajadhyaksha A, Macias W, Taher M, Barczak A, Kameyama K, Haganir R, Konradi C (2003) Dopamine D1 receptors mediate CREB phosphorylation via phosphorylation of the NMDA receptor at Ser897-NR1. *J Neurochem* 87:922-934.
- Duester G (2008) Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell* 134:921-931.
- Dupe V, Ghyselinck NB, Wendling O, Chambon P, Mark M (1999) Key roles of retinoic acid receptors alpha and beta in the patterning of the caudal hindbrain, pharyngeal arches and otocyst in the mouse. *Development* 126:5051-5059.

- Dupe V, Davenne M, Brocard J, Dolle P, Mark M, Dierich A, Chambon P, Rijli FM (1997) In vivo functional analysis of the Hoxa-1 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Development* 124:399-410.
- Edwards MK, McBurney MW (1983) The concentration of retinoic acid determines the differentiated cell types formed by a teratocarcinoma cell line. *Dev Biol* 98:187-191.
- Fahlstrom A, Zeberg H, Ulfhake B (2012) Changes in behaviors of male C57BL/6J mice across adult life span and effects of dietary restriction. *Age (Dordr)* 34:1435-1452.
- Fino E, Venance L (2010) Spike-timing dependent plasticity in the striatum. *Front Synaptic Neurosci* 2:6.
- Foffani G, Priori A, Egidi M, Rampini P, Tamma F, Caputo E, Moxon KA, Cerutti S, Barbieri S (2003) 300-Hz subthalamic oscillations in Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology* 126:2153-2163.
- Ford CP (2014) The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission. *Neuroscience* 282:13-22.
- Frederick AL, Yano H, Trifilieff P, Vishwasrao HD, Biezonski D, Meszaros J, Urizar E, Sibley DR, Kellendonk C, Sonntag KC, Graham DL, Colbran RJ, Stanwood GD, Javitch JA (2015) Evidence against dopamine D1/D2 receptor heteromers. *Mol Psychiatry* 20:1373-1385.
- Fuchs T, Ozelius LJ (2013) Genetics in dystonia: an update. *Curr Neurol Neurosci Rep* 13:410.
- Fuchs T, Gavarini S, Saunders-Pullman R, Raymond D, Ehrlich ME, Bressman SB, Ozelius LJ (2009) Mutations in the THAP1 gene are responsible for DYT6 primary torsion dystonia. *Nat Genet* 41:286-288.
- Gagnon D, Petryszyn S, Sanchez MG, Bories C, Beaulieu JM, De Koninck Y, Parent A, Parent M (2017) Striatal Neurons Expressing D1 and D2 Receptors are Morphologically Distinct and Differently Affected by Dopamine Denervation in Mice. *Sci Rep* 7:41432.
- Gangarossa G, Espallergues J, Mailly P, De Bundel D, de Kerchove d'Exaerde A, Herve D, Girault JA, Valjent E, Krieger P (2013) Spatial distribution of D1R- and D2R-expressing medium-sized spiny neurons differs along the rostro-caudal axis of the mouse dorsal striatum. *Frontiers in neural circuits* 7:124.
- Gantois I, Fang K, Jiang L, Babovic D, Lawrence AJ, Ferreri V, Teper Y, Jupp B, Ziebell J, Morganti-Kossmann CM, O'Brien TJ, Nally R, Schutz G, Waddington J, Egan GF, Drago J (2007) Ablation of D1 dopamine receptor-expressing cells generates mice with seizures, dystonia, hyperactivity, and impaired oral behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4182-4187.
- Gardoni F, Bellone C (2015) Modulation of the glutamatergic transmission by Dopamine: a focus on Parkinson, Huntington and Addiction diseases. *Frontiers in cellular neuroscience* 9:25.
- Gazi L, Nickolls SA, Strange PG (2003) 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* 138:775-786.
- Gerfen CR, Surmeier DJ (2011) Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annual review of neuroscience* 34:441-466.
- Germain P, Kammerer S, Perez E, Peluso-Iltis C, Tortolani D, Zusi FC, Starrett J, Lapointe P, Daris JP, Marinier A, de Lera AR, Rochel N, Gronemeyer H (2004) Rational design of RAR-selective ligands revealed by RARbeta crystal structure. *EMBO Rep* 5:877-882.

- Ghyselinck NB, Dupe V, Dierich A, Messaddeq N, Garnier JM, Rochette-Egly C, Chambon P, Mark M (1997) Role of the retinoic acid receptor beta (RARbeta) during mouse development. *Int J Dev Biol* 41:425-447.
- Glynn D, Bortnick RA, Morton AJ (2003) Complexin II is essential for normal neurological function in mice. *Human molecular genetics* 12:2431-2448.
- Glynn D, Drew CJ, Reim K, Brose N, Morton AJ (2005) Profound ataxia in complexin I knockout mice masks a complex phenotype that includes exploratory and habituation deficits. *Human molecular genetics* 14:2369-2385.
- Gong S, Zheng C, Doughty ML, Losos K, Didkovsky N, Schambra UB, Nowak NJ, Joyner A, Leblanc G, Hatten ME, Heintz N (2003) A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature* 425:917-925.
- Goto S, Lee LV, Munoz EL, Tooyama I, Tamiya G, Makino S, Ando S, Dantes MB, Yamada K, Matsumoto S, Shimazu H, Kuratsu J, Hirano A, Kaji R (2005) Functional anatomy of the basal ganglia in X-linked recessive dystonia-parkinsonism. *Annals of neurology* 58:7-17.
- Graveland GA, DiFiglia M (1985) The frequency and distribution of medium-sized neurons with indented nuclei in the primate and rodent neostriatum. *Brain Res* 327:307-311.
- Graveland GA, Williams RS, DiFiglia M (1985) A Golgi study of the human neostriatum: neurons and afferent fibers. *The Journal of comparative neurology* 234:317-333.
- Graybiel AM (1998) The basal ganglia and chunking of action repertoires. *Neurobiology of learning and memory* 70:119-136.
- Grove EA, Tole S, Limon J, Yip L, Ragsdale CW (1998) The hem of the embryonic cerebral cortex is defined by the expression of multiple Wnt genes and is compromised in Gli3-deficient mice. *Development* 125:2315-2325.
- Gurevich EV, Gainetdinov RR, Gurevich VV (2016) G protein-coupled receptor kinases as regulators of dopamine receptor functions. *Pharmacol Res* 111:1-16.
- Gutin G, Fernandes M, Palazzolo L, Paek H, Yu K, Ornitz DM, McConnell SK, Hebert JM (2006) FGF signalling generates ventral telencephalic cells independently of SHH. *Development* 133:2937-2946.
- Haber SN (2014) The place of dopamine in the cortico-basal ganglia circuit. *Neuroscience* 282:248-257.
- Hanashima C, Fernandes M, Hebert JM, Fishell G (2007) The role of Foxg1 and dorsal midline signaling in the generation of Cajal-Retzius subtypes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:11103-11111.
- Hebert JM, Fishell G (2008) The genetics of early telencephalon patterning: some assembly required. *Nature reviews Neuroscience* 9:678-685.
- Hikosaka O, Takikawa Y, Kawagoe R (2000) Role of the basal ganglia in the control of purposive saccadic eye movements. *Physiol Rev* 80:953-978.
- Hollerman JR, Tremblay L, Schultz W (1998) Influence of reward expectation on behavior-related neuronal activity in primate striatum. *Journal of neurophysiology* 80:947-963.
- Hunnicuttt BJ, Jongbloets BC, Birdsong WT, Gertz KJ, Zhong H, Mao T (2016) A comprehensive excitatory input map of the striatum reveals novel functional organization. *eLife* 5.
- Ikemoto S, Yang C, Tan A (2015) Basal ganglia circuit loops, dopamine and motivation: A review and enquiry. *Behavioural brain research* 290:17-31.
- Jacobs FM, Veenvliet JV, Almirza WH, Hoekstra EJ, von Oerthel L, van der Linden AJ, Neijts R, Koerkamp MG, van Leenen D, Holstege FC, Burbach JP, Smidt MP (2011) Retinoic

- acid-dependent and -independent gene-regulatory pathways of Pitx3 in meso-diencephalic dopaminergic neurons. *Development* 138:5213-5222.
- Jiang M, Spicher K, Boulay G, Wang Y, Birnbaumer L (2001) Most central nervous system D2 dopamine receptors are coupled to their effectors by Go. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3577-3582.
- Jinnah HA, Factor SA (2015) Diagnosis and treatment of dystonia. *Neurologic clinics* 33:77-100.
- Jones C, Busse M, Quinn L, Dawes H, Drew C, Kelson M, Hood K, Rosser A, Edwards RT (2016) The societal cost of Huntington's disease: are we underestimating the burden? *Eur J Neurol* 23:1588-1590.
- Kaji R, Bhatia K, Graybiel AM (2018) Pathogenesis of dystonia: is it of cerebellar or basal ganglia origin? *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 89:488-492.
- Karl T, Pabst R, von Horsten S (2003) Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie* 55:69-83.
- Kim JI, Ganesan S, Luo SX, Wu YW, Park E, Huang EJ, Chen L, Ding JB (2015) Aldehyde dehydrogenase 1a1 mediates a GABA synthesis pathway in midbrain dopaminergic neurons. *Science* 350:102-106.
- Kim S, Lim J, Bang Y, Moon J, Kwon MS, Hong JT, Jeon J, Seo H, Choi HJ (2018) Alpha-Synuclein Suppresses Retinoic Acid-Induced Neuronal Differentiation by Targeting the Glycogen Synthase Kinase-3beta/beta-Catenin Signaling Pathway. *Mol Neurobiol* 55:1607-1619.
- Kirkwood SC, Su JL, Conneally P, Foroud T (2001) Progression of symptoms in the early and middle stages of Huntington disease. *Arch Neurol* 58:273-278.
- Kitaoka K, Hattori A, Chikahisa S, Miyamoto K, Nakaya Y, Sei H (2007) Vitamin A deficiency induces a decrease in EEG delta power during sleep in mice. *Brain Res* 1150:121-130.
- Kitaoka K, Shimizu M, Shimizu N, Chikahisa S, Nakagomi M, Shudo K, Yoshizaki K, Sei H (2011) Retinoic acid receptor antagonist LE540 attenuates wakefulness via the dopamine D1 receptor in mice. *Brain Res* 1423:10-16.
- Klein C, Brin MF, Kramer P, Sena-Esteves M, de Leon D, Doheny D, Bressman S, Fahn S, Breakefield XO, Ozelius LJ (1999) Association of a missense change in the D2 dopamine receptor with myoclonus dystonia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5173-5176.
- Kowal SL, Dall TM, Chakrabarti R, Storm MV, Jain A (2013) The current and projected economic burden of Parkinson's disease in the United States. *Mov Disord* 28:311-318.
- Kreitzer AC, Malenka RC (2008) Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron* 60:543-554.
- Krezel W, Kastner P, Chambon P (1999) Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system. *Neuroscience* 89:1291-1300.
- Krezel W, Ghyselinck N, Samad TA, Dupe V, Kastner P, Borrelli E, Chambon P (1998) Impaired locomotion and dopamine signaling in retinoid receptor mutant mice. *Science* 279:863-867.
- Kudwa AE, Menalled LB, Oakeshott S, Murphy C, Mushlin R, Fitzpatrick J, Miller SF, McConnell K, Port R, Torello J, Howland D, Ramboz S, Brunner D (2013) Increased Body Weight of the BAC HD Transgenic Mouse Model of Huntington's Disease Accounts for Some but Not All of the Observed HD-like Motor Deficits. *PLoS Curr* 5.

- Kumar S, Sandell LL, Trainor PA, Koentgen F, Duester G (2012) Alcohol and aldehyde dehydrogenases: retinoid metabolic effects in mouse knockout models. *Biochim Biophys Acta* 1821:198-205.
- Kurlan R, Como PG, Miller B, Palumbo D, Deeley C, Andresen EM, Eapen S, McDermott MP (2002) The behavioral spectrum of tic disorders: a community-based study. *Neurology* 59:414-420.
- Kuyper DJ, Parra V, Aerts S, Okun MS, Kluger BM (2011) Nonmotor manifestations of dystonia: a systematic review. *Mov Disord* 26:1206-1217.
- Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, Curry CJ, Fernhoff PM, Grix AW, Jr., Lott IT, et al. (1985) Retinoic acid embryopathy. *The New England journal of medicine* 313:837-841.
- Lee K, Holley SM, Shobe JL, Chong NC, Cepeda C, Levine MS, Masmanidis SC (2017) Parvalbumin Interneurons Modulate Striatal Output and Enhance Performance during Associative Learning. *Neuron* 93:1451-1463.e1454.
- Lee SP, So CH, Rashid AJ, Varghese G, Cheng R, Lanca AJ, O'Dowd BF, George SR (2004) Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *The Journal of biological chemistry* 279:35671-35678.
- Levesque D, Diaz J, Pilon C, Martres MP, Giros B, Souil E, Schott D, Morgat JL, Schwartz JC, Sokoloff P (1992) Identification, characterization, and localization of the dopamine D3 receptor in rat brain using 7-[3H]hydroxy-N,N-di-n-propyl-2-aminotetralin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8155-8159.
- Li H, Wagner E, McCaffery P, Smith D, Andreadis A, Drager UC (2000) A retinoic acid synthesizing enzyme in ventral retina and telencephalon of the embryonic mouse. *Mech Dev* 95:283-289.
- Li Y, Hashimoto Y, Agadir A, Kagechika H, Zhang X (1999) Identification of a novel class of retinoic acid receptor beta-selective retinoid antagonists and their inhibitory effects on AP-1 activity and retinoic acid-induced apoptosis in human breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 274:15360-15366.
- Liao WL, Liu FC (2005) RARbeta isoform-specific regulation of DARPP-32 gene expression: an ectopic expression study in the developing rat telencephalon. *The European journal of neuroscience* 21:3262-3268.
- Liao WL, Wang HF, Tsai HC, Chambon P, Wagner M, Kakizuka A, Liu FC (2005) Retinoid signaling competence and RARbeta-mediated gene regulation in the developing mammalian telencephalon. *Dev Dyn* 232:887-900.
- Liao WL, Tsai HC, Wang HF, Chang J, Lu KM, Wu HL, Lee YC, Tsai TF, Takahashi H, Wagner M, Ghyselinck NB, Chambon P, Liu FC (2008) Modular patterning of structure and function of the striatum by retinoid receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:6765-6770.
- Maden M (2007) Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nature reviews Neuroscience* 8:755-765.
- Maden M, Gale E, Zile M (1998) The role of vitamin A in the development of the central nervous system. *J Nutr* 128:471s-475s.
- Mahajan SD, Aalinkeel R, Reynolds JL, Nair BB, Sykes DE, Hu Z, Bonoiu A, Ding H, Prasad PN, Schwartz SA (2009) Therapeutic targeting of "DARPP-32": a key signaling molecule in the dopaminergic pathway for the treatment of opiate addiction. *Int Rev Neurobiol* 88:199-222.

- Maret S, Franken P, Dauvilliers Y, Ghyselinck NB, Chambon P, Tafti M (2005) Retinoic acid signaling affects cortical synchrony during sleep. *Science* 310:111-113.
- Marklund M, Sjodal M, Beehler BC, Jessell TM, Edlund T, Gunhaga L (2004) Retinoic acid signalling specifies intermediate character in the developing telencephalon. *Development* 131:4323-4332.
- Marsden CD (1982) The mysterious motor function of the basal ganglia: the Robert Wartenberg Lecture. *Neurology* 32:514-539.
- Martynoga B, Morrison H, Price DJ, Mason JO (2005) Foxg1 is required for specification of ventral telencephalon and region-specific regulation of dorsal telencephalic precursor proliferation and apoptosis. *Dev Biol* 283:113-127.
- Matamales M, Bertran-Gonzalez J, Salomon L, Degos B, Deniau JM, Valjent E, Herve D, Girault JA (2009) Striatal medium-sized spiny neurons: identification by nuclear staining and study of neuronal subpopulations in BAC transgenic mice. *PLoS One* 4:e4770.
- Mazzoni P, Hristova A, Krakauer JW (2007) Why don't we move faster? Parkinson's disease, movement vigor, and implicit motivation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:7105-7116.
- McCaffery P, Drager UC (1994) High levels of a retinoic acid-generating dehydrogenase in the meso-telencephalic dopamine system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7772-7776.
- McIlwain KL, Merriweather MY, Yuva-Paylor LA, Paylor R (2001) The use of behavioral test batteries: effects of training history. *Physiol Behav* 73:705-717.
- Miyamoto Y, Katayama S, Shigematsu N, Nishi A, Fukuda T (2018) Striosome-based map of the mouse striatum that is conformable to both cortical afferent topography and uneven distributions of dopamine D1 and D2 receptor-expressing cells. *Brain structure & function* 223:4275-4291.
- Moisello C, Crupi D, Tunik E, Quartarone A, Bove M, Tononi G, Ghilardi MF (2009) The serial reaction time task revisited: a study on motor sequence learning with an arm-reaching task. *Experimental brain research* 194:143-155.
- Mollard R, Viville S, Ward SJ, Decimo D, Chambon P, Dolle P (2000) Tissue-specific expression of retinoic acid receptor isoform transcripts in the mouse embryo. *Mech Dev* 94:223-232.
- Molotkova N, Molotkov A, Duester G (2007) Role of retinoic acid during forebrain development begins late when Raldh3 generates retinoic acid in the ventral subventricular zone. *Dev Biol* 303:601-610.
- Moreno N, Gonzalez A, Retaux S (2009) Development and evolution of the subpallium. *Semin Cell Dev Biol* 20:735-743.
- Napolitano F, Pasqualetti M, Usiello A, Santini E, Pacini G, Sciamanna G, Errico F, Tassone A, Di Dato V, Martella G, Cuomo D, Fisone G, Bernardi G, Mandolesi G, Mercuri NB, Standaert DG, Pisani A (2010) Dopamine D2 receptor dysfunction is rescued by adenosine A2A receptor antagonism in a model of DYT1 dystonia. *Neurobiology of disease* 38:434-445.
- Narbona J, Obeso JA, Tuñon T, Martinez-Lage JM, Marsden CD (1984) Hemi-dystonia secondary to localised basal ganglia tumour. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 47:704.
- Naumann M, Pirker W, Reiners K, Lange KW, Becker G, Brucke T (1998) Imaging the pre- and postsynaptic side of striatal dopaminergic synapses in idiopathic cervical dystonia: a SPECT study using [123I] epidepride and [123I] beta-CIT. *Mov Disord* 13:319-323.

- Neckelmann D, Ursin R (1993) Sleep stages and EEG power spectrum in relation to acoustical stimulus arousal threshold in the rat. *Sleep* 16:467-477.
- Nery S, Fishell G, Corbin JG (2002) The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations. *Nature neuroscience* 5:1279-1287.
- Nestler EJ (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nature reviews Neuroscience* 2:119-128.
- Niederreither K, Fraulob V, Garnier JM, Chambon P, Dolle P (2002) Differential expression of retinoic acid-synthesizing (RALDH) enzymes during fetal development and organ differentiation in the mouse. *Mech Dev* 110:165-171.
- Niewiadomska-Cimicka A, Krzyzosiak A, Ye T, Podlesny-Drabiniok A, Dembele D, Dolle P, Krezel W (2017) Genome-wide Analysis of RARbeta Transcriptional Targets in Mouse Striatum Links Retinoic Acid Signaling with Huntington's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Mol Neurobiol* 54:3859-3878.
- O'Doherty J, Dayan P, Schultz J, Deichmann R, Friston K, Dolan RJ (2004) Dissociable roles of ventral and dorsal striatum in instrumental conditioning. *Science* 304:452-454.
- Ozelius LJ, Hewett JW, Page CE, Bressman SB, Kramer PL, Shalish C, de Leon D, Brin MF, Raymond D, Corey DP, Fahn S, Risch NJ, Buckler AJ, Gusella JF, Breakefield XO (1997) The early-onset torsion dystonia gene (DYT1) encodes an ATP-binding protein. *Nat Genet* 17:40-48.
- Packard MG, Knowlton BJ (2002) Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annual review of neuroscience* 25:563-593.
- Pallier PN, Drew CJ, Morton AJ (2009) The detection and measurement of locomotor deficits in a transgenic mouse model of Huntington's disease are task- and protocol-dependent: influence of non-motor factors on locomotor function. *Brain research bulletin* 78:347-355.
- Pan J, Yu J, Sun L, Xie C, Chang L, Wu J, Hawes S, Saez-Atienzar S, Zheng W, Kung J, Ding J, Le W, Chen S, Cai H (2019) ALDH1A1 regulates postsynaptic mu-opioid receptor expression in dorsal striatal projection neurons and mitigates dyskinesia through transsynaptic retinoic acid signaling. *Sci Rep* 9:3602.
- Pappas SS, Darr K, Holley SM, Cepeda C, Mabrouk OS, Wong JM, LeWitt TM, Paudel R, Houlden H, Kennedy RT, Levine MS, Dauer WT (2015) Forebrain deletion of the dystonia protein torsinA causes dystonic-like movements and loss of striatal cholinergic neurons. *eLife* 4:e08352.
- Paxinos G, Franklin KBJ (2004) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*: Elsevier Academic Press.
- Paylor R, Spencer CM, Yuva-Paylor LA, Pieke-Dahl S (2006) The use of behavioral test batteries, II: effect of test interval. *Physiol Behav* 87:95-102.
- Peirson SN, Brown LA, Potheary CA, Benson LA, Fisk AS (2018) Light and the laboratory mouse. *J Neurosci Methods* 300:26-36.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia A-S, McNamara JO, Williams SM (2001) Circuits within the basal ganglia system. In: *Neuroscience*. 2nd edition: Sinauer Associates.
- Rallu M, Machold R, Gaiano N, Corbin JG, McMahon AP, Fishell G (2002) Dorsoventral patterning is established in the telencephalon of mutants lacking both Gli3 and Hedgehog signaling. *Development* 129:4963-4974.

- Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 8:2281-2308.
- Rash BG, Grove EA (2011) Shh and Gli3 regulate formation of the telencephalic-diencephalic junction and suppress an isthmus-like signaling source in the forebrain. *Dev Biol* 359:242-250.
- Rashid AJ, So CH, Kong MM, Furtak T, El-Ghundi M, Cheng R, O'Dowd BF, George SR (2007) D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:654-659.
- Rataj-Baniowska M, Niewiadomska-Cimicka A, Paschaki M, Szyszka-Niagolov M, Carramolino L, Torres M, Dolle P, Krezel W (2015) Retinoic Acid Receptor beta Controls Development of Striatonigral Projection Neurons through FGF-Dependent and Meis1-Dependent Mechanisms. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35:14467-14475.
- Redgrave P, Rodriguez M, Smith Y, Rodriguez-Oroz MC, Lehericy S, Bergman H, Agid Y, DeLong MR, Obeso JA (2010) Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. *Nature reviews Neuroscience* 11:760-772.
- Ren K, Guo B, Dai C, Yao H, Sun T, Liu X, Bai Z, Wang W, Wu S (2017) Striatal Distribution and Cytoarchitecture of Dopamine Receptor Subtype 1 and 2: Evidence from Double-Labeling Transgenic Mice. *Frontiers in neural circuits* 11:57.
- Richter F, Richter A (2014) Genetic animal models of dystonia: common features and diversities. *Progress in neurobiology* 121:91-113.
- Roedel A, Storch C, Holsboer F, Ohl F (2006) Effects of light or dark phase testing on behavioural and cognitive performance in DBA mice. *Lab Anim* 40:371-381.
- Ruberte E, Dolle P, Chambon P, Morriss-Kay G (1991) Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. II. Their differential pattern of transcription during early morphogenesis in mouse embryos. *Development* 111:45-60.
- Ruberte E, Friederich V, Chambon P, Morriss-Kay G (1993) Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. III. Their differential transcript distribution during mouse nervous system development. *Development* 118:267-282.
- Rueda-Orozco PE, Robbe D (2015) The striatum multiplexes contextual and kinematic information to constrain motor habits execution. *Nature neuroscience* 18:453-460.
- Samad TA, Krezel W, Chambon P, Borrelli E (1997) Regulation of dopaminergic pathways by retinoids: activation of the D2 receptor promoter by members of the retinoic acid receptor-retinoid X receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14349-14354.
- Sato K, Sumi-Ichinose C, Kaji R, Ikemoto K, Nomura T, Nagatsu I, Ichinose H, Ito M, Sako W, Nagahiro S, Graybiel AM, Goto S (2008) Differential involvement of striosome and matrix dopamine systems in a transgenic model of dopa-responsive dystonia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:12551-12556.
- Schroll H, Hamker FH (2013) Computational models of basal-ganglia pathway functions: focus on functional neuroanatomy. *Front Syst Neurosci* 7:122.
- Sciamanna G, Bonsi P, Tassone A, Cuomo D, Tschertner A, Viscomi MT, Martella G, Sharma N, Bernardi G, Standaert DG, Pisani A (2009) Impaired striatal D2 receptor function leads to enhanced GABA transmission in a mouse model of DYT1 dystonia. *Neurobiology of disease* 34:133-145.

- Scullin MK, Bliwise DL (2015) Sleep, cognition, and normal aging: integrating a half century of multidisciplinary research. *Perspect Psychol Sci* 10:97-137.
- Sgobio C, Wu J, Zheng W, Chen X, Pan J, Salinas AG, Davis MI, Lovinger DM, Cai H (2017) Aldehyde dehydrogenase 1-positive nigrostriatal dopaminergic fibers exhibit distinct projection pattern and dopamine release dynamics at mouse dorsal striatum. *Sci Rep* 7:5283.
- Shashidharan P, Sandu D, Potla U, Armata IA, Walker RH, McNaught KS, Weisz D, Sreenath T, Brin MF, Olanow CW (2005) Transgenic mouse model of early-onset DYT1 dystonia. *Human molecular genetics* 14:125-133.
- Shen S, van der Saag PT, Kruijer W (1993) Dominant negative retinoic acid receptor beta. *Mech Dev* 40:177-189.
- Shinya M, Koshida S, Sawada A, Kuroiwa A, Takeda H (2001) Fgf signalling through MAPK cascade is required for development of the subpallial telencephalon in zebrafish embryos. *Development* 128:4153-4164.
- Shuen JA, Chen M, Gloss B, Calakos N (2008) *Drd1a*-tdTomato BAC transgenic mice for simultaneous visualization of medium spiny neurons in the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:2681-2685.
- Simeone A, Avantaggiato V, Moroni MC, Mavilio F, Arra C, Cotelli F, Nigro V, Acampora D (1995) Retinoic acid induces stage-specific antero-posterior transformation of rostral central nervous system. *Mech Dev* 51:83-98.
- Simonyan K, Cho H, Hamzehei Sichani A, Rubien-Thomas E, Hallett M (2017) The direct basal ganglia pathway is hyperfunctional in focal dystonia. *Brain : a journal of neurology* 140:3179-3190.
- Smith D, Wagner E, Koul O, McCaffery P, Drager UC (2001) Retinoic acid synthesis for the developing telencephalon. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991)* 11:894-905.
- Smith RS, Roderick TH, Sundberg JP (1994) Microphthalmia and associated abnormalities in inbred black mice. *Lab Anim Sci* 44:551-560.
- Srour M, Chitayat D, Caron V, Chassaing N, Bitoun P, Patry L, Cordier MP, Capo-Chichi JM, Francannet C, Calvas P, Ragge N, Dobrzeniecka S, Hamdan FF, Rouleau GA, Tremblay A, Michaud JL (2013) Recessive and dominant mutations in retinoic acid receptor beta in cases with microphthalmia and diaphragmatic hernia. *American journal of human genetics* 93:765-772.
- Srour M et al. (2016) Gain-of-Function Mutations in RARB Cause Intellectual Disability with Progressive Motor Impairment. *Hum Mutat* 37:786-793.
- Stanley JL, Lincoln RJ, Brown TA, McDonald LM, Dawson GR, Reynolds DS (2005) The mouse beam walking assay offers improved sensitivity over the mouse rotarod in determining motor coordination deficits induced by benzodiazepines. *J Psychopharmacol* 19:221-227.
- Starr PA, Rau GM, Davis V, Marks WJ, Jr., Ostrem JL, Simmons D, Lindsey N, Turner RS (2005) Spontaneous pallidal neuronal activity in human dystonia: comparison with Parkinson's disease and normal macaque. *Journal of neurophysiology* 93:3165-3176.
- Steriade M, McCormick DA, Sejnowski TJ (1993) Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science* 262:679-685.

- Storm EE, Garel S, Borello U, Hebert JM, Martinez S, McConnell SK, Martin GR, Rubenstein JL (2006) Dose-dependent functions of Fgf8 in regulating telencephalic patterning centers. *Development* 133:1831-1844.
- Studholme KM, Gompf HS, Morin LP (2013) Brief light stimulation during the mouse nocturnal activity phase simultaneously induces a decline in core temperature and locomotor activity followed by EEG-determined sleep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 304:R459-471.
- Surmeier DJ (2018) Determinants of dopaminergic neuron loss in Parkinson's disease. *Febs j* 285:3657-3668.
- Surmeier DJ, Shen W, Day M, Gertler T, Chan S, Tian X, Plotkin JL (2010) The role of dopamine in modulating the structure and function of striatal circuits. *Progress in brain research* 183:149-167.
- Sussel L, Marin O, Kimura S, Rubenstein JL (1999) Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* 126:3359-3370.
- Tecuapetla F, Jin X, Lima SQ, Costa RM (2016) Complementary Contributions of Striatal Projection Pathways to Action Initiation and Execution. *Cell* 166:703-715.
- Tepper JM, Koos T, Ibanez-Sandoval O, Tecuapetla F, Faust TW, Assous M (2018) Heterogeneity and Diversity of Striatal GABAergic Interneurons: Update 2018. *Front Neuroanat* 12:91.
- Theil T, Alvarez-Bolado G, Walter A, Ruther U (1999) Gli3 is required for Emx gene expression during dorsal telencephalon development. *Development* 126:3561-3571.
- Thibault D, Loustalot F, Fortin GM, Bourque MJ, Trudeau LE (2013) Evaluation of D1 and D2 dopamine receptor segregation in the developing striatum using BAC transgenic mice. *PLoS One* 8:e67219.
- Thompson VB, Jinnah HA, Hess EJ (2011) Convergent mechanisms in etiologically-diverse dystonias. *Expert Opin Ther Targets* 15:1387-1403.
- Toresson H, Campbell K (2001) A role for Gsh1 in the developing striatum and olfactory bulb of Gsh2 mutant mice. *Development* 128:4769-4780.
- Toresson H, Mata de Urquiza A, Fagerstrom C, Perlmann T, Campbell K (1999) Retinoids are produced by glia in the lateral ganglionic eminence and regulate striatal neuron differentiation. *Development* 126:1317-1326.
- Valdenaire O, Maus-Moatti M, Vincent JD, Mallet J, Vernier P (1998) Retinoic acid regulates the developmental expression of dopamine D2 receptor in rat striatal primary cultures. *J Neurochem* 71:929-936.
- van Egmond ME, Kuiper A, Eggink H, Sinke RJ, Brouwer OF, Verschuuren-Bemelmans CC, Sival DA, Tijssen MA, de Koning TJ (2015) Dystonia in children and adolescents: a systematic review and a new diagnostic algorithm. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 86:774-781.
- van Putten M, Kumar D, Hulsker M, Hoogaars WM, Plomp JJ, van Opstal A, van Iterson M, Admiraal P, van Ommen GJ, t Hoen PA, Aartsma-Rus A (2012) Comparison of skeletal muscle pathology and motor function of dystrophin and utrophin deficient mouse strains. *Neuromuscul Disord* 22:406-417.
- Verma AS, Fitzpatrick DR (2007) Anophthalmia and microphthalmia. *Orphanet J Rare Dis* 2:47.
- Vitek JL (2002) Pathophysiology of dystonia: a neuronal model. *Mov Disord* 17 Suppl 3:S49-62.

- Voller J, Potuzakova B, Simecek V, Vozech F (2014) The role of whiskers in compensation of visual deficit in a mouse model of retinal degeneration. *Neurosci Lett* 558:149-153.
- Wagner JM, Sichler ME, Schleicher EM, Franke TN, Irwin C, Low MJ, Beindorff N, Bouter C, Bayer TA, Bouter Y (2019) Analysis of Motor Function in the Tg4-42 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Frontiers in behavioral neuroscience* 13:107.
- Walker MP, Brakefield T, Morgan A, Hobson JA, Stickgold R (2002) Practice with sleep makes perfect: sleep-dependent motor skill learning. *Neuron* 35:205-211.
- Wallen A, Zetterstrom RH, Solomin L, Arvidsson M, Olson L, Perlmann T (1999) Fate of mesencephalic AHD2-expressing dopamine progenitor cells in NURR1 mutant mice. *Exp Cell Res* 253:737-746.
- Walter U, Kleinschmidt S, Rimmele F, Wunderlich C, Gemende I, Benecke R, Busse K (2013) Potential impact of self-perceived prodromal symptoms on the early diagnosis of Parkinson's disease. *J Neurol* 260:3077-3085.
- Wenning GK, Kiechl S, Seppi K, Muller J, Hogg B, Saletu M, Rungger G, Gasperi A, Willeit J, Poewe W (2005) Prevalence of movement disorders in men and women aged 50-89 years (Bruneck Study cohort): a population-based study. *The Lancet Neurology* 4:815-820.
- Wey MC, Fernandez E, Martinez PA, Sullivan P, Goldstein DS, Strong R (2012) Neurodegeneration and motor dysfunction in mice lacking cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases: implications for Parkinson's disease. *PLoS One* 7:e31522.
- White NM (1997) Mnemonic functions of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol* 7:164-169.
- Wolf G (1998) Vitamin A functions in the regulation of the dopaminergic system in the brain and pituitary gland. *Nutr Rev* 56:354-355.
- Wong AL, Lindquist MA, Haith AM, Krakauer JW (2015) Explicit knowledge enhances motor vigor and performance: motivation versus practice in sequence tasks. *Journal of neurophysiology* 114:219-232.
- Yhnell E, Dunnett SB, Brooks SP (2016) A Longitudinal Motor Characterisation of the HdhQ111 Mouse Model of Huntington's Disease. *J Huntingtons Dis* 5:149-161.
- Yin HH, Knowlton BJ (2006) The role of the basal ganglia in habit formation. *Nature reviews Neuroscience* 7:464-476.
- Yin LH, Shen H, Diaz-Ruiz O, Backman CM, Bae E, Yu SJ, Wang Y (2012) Early post-treatment with 9-cis retinoic acid reduces neurodegeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *BMC Neurosci* 13:120.
- Yokoi F, Dang MT, Li J, Li Y (2006) Myoclonus, motor deficits, alterations in emotional responses and monoamine metabolism in epsilon-sarcoglycan deficient mice. *J Biochem* 140:141-146.
- Yokoi F, Dang MT, Liu J, Gandre JR, Kwon K, Yuen R, Li Y (2015) Decreased dopamine receptor 1 activity and impaired motor-skill transfer in Dyt1 DeltaGAG heterozygous knock-in mice. *Behavioural brain research* 279:202-210.
- Yun K, Garel S, Fischman S, Rubenstein JL (2003) Patterning of the lateral ganglionic eminence by the Gsh1 and Gsh2 homeobox genes regulates striatal and olfactory bulb histogenesis and the growth of axons through the basal ganglia. *The Journal of comparative neurology* 461:151-165.
- Zhang JT, Ma SS, Yip SW, Wang LJ, Chen C, Yan CG, Liu L, Liu B, Deng LY, Liu QX, Fang XY (2015a) Decreased functional connectivity between ventral tegmental area and nucleus accumbens in Internet gaming disorder: evidence from resting state functional magnetic resonance imaging. *Behav Brain Funct* 11:37.

- Zhang L, McCarthy DM, Sharma N, Bhide PG (2015b) Dopamine receptor and Galpha(olf) expression in DYT1 dystonia mouse models during postnatal development. PLoS One 10:e0123104.
- Zhuang P, Li Y, Hallett M (2004) Neuronal activity in the basal ganglia and thalamus in patients with dystonia. Clin Neurophysiol 115:2542-2557.
- Zhuang X, Belluscio L, Hen R (2000) G(olf)alpha mediates dopamine D1 receptor signaling. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 20:Rc91.
- Zieger E, Schubert M (2017) New Insights Into the Roles of Retinoic Acid Signaling in Nervous System Development and the Establishment of Neurotransmitter Systems. Int Rev Cell Mol Biol 330:1-84.