

Université de Montréal

Implication du récepteur nucléaire orphelin Nur77 (Nr4a1) dans les effets des antipsychotiques par une approche de transcriptomique chez des rats déficients en Nur77

par Simon Majeur

Département de Pharmacie, Université de Montréal

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.) en Sciences Pharmaceutiques, option Pharmacologie

Novembre 2022

© Simon Majeur, 2022

Résumé

Malgré l'usage de médicaments antipsychotiques depuis plusieurs décennies, leur mécanisme d'action précis, autre que leur interaction avec les récepteurs dopaminergiques et sérotoninergiques, demeure peu connu. Nur77 (Nr4a1 ou NGFI-B) est un facteur de transcription de la famille des récepteurs nucléaires associé aux effets des antipsychotiques. Ceci étant dit, le mécanisme d'action de Nur77 est également peu connu. Afin de mieux comprendre les éléments impliqués avec les antipsychotiques et l'activité de Nur77, nous avons comparé les niveaux de transcrits dans le striatum suite à un traitement avec l'halopéridol chez des rats sauvages et déficients en Nur77 à l'aide de la technique de séquençage à haut débit (RNAseq) et d'une analyse bio-informatique. L'halopéridol et Nur77 ont modulé d'importants groupes de gènes associés avec la signalisation des récepteurs dopaminergiques et la synapse glutamatergique. L'analyse a révélé des modulations de gènes clés reliés à la signalisation des protéines G. Parmi les transcrits modulés significativement chez les rats traités avec halopéridol et ceux déficients en Nur77, la *dual specificity phosphatase 5* (Dusp5) représente un nouveau candidat d'intérêt. En effet, nous avons confirmé que les niveaux d'ARNm et protéiques de Dusp5 dans le striatum sont associés aux mouvements involontaires anormaux (dyskinésie) dans un modèle de primates non-humains traités chroniquement avec halopéridol. Cette analyse transcriptomique a démontré des altérations rapides et importantes d'éléments impliqués dans la signalisation des protéines G par l'halopéridol, et a permis d'identifier, pour la première fois, une expression de Dusp5 dépendante de Nur77 en tant que nouvelle composante reliée avec la dyskinésie tardive.

Mots-clés : Séquençage à haut débit (RNAseq), Halopéridol, Nur77, Dyskinésie, Dusp5, Striatum

Abstract

Despite antipsychotic drugs being used for several decades, their precise mechanism of action remains elusive. Nur77 (Nr4a1 or NGFI-B) is a transcription factor of the nuclear receptor family associated with antipsychotic drug effects. However, the mechanism of action of Nur77 is also not well understood. To better understand the signaling components implicated with antipsychotic drug use and Nur77 activity, we compared striatal gene transcripts following haloperidol in wild-type and Nur77-deficient rats using Next Generation RNA Sequencing (RNAseq) and a bioinformatics analysis. Haloperidol and Nur77 modulated important subsets of striatal genes associated with dopamine receptor signaling and glutamate synapses. The analysis revealed modulations of key components of G protein signaling that are consistent with a rapid adaptation of striatal cells that may partially explain long-term haloperidol-induced dopamine D₂ receptor upregulation. Amongst significantly modulated transcripts in rats treated with haloperidol and rats deficient in Nur77, *dual specificity phosphatase 5* (Dusp5) represents a new and very interesting candidate. Indeed, we confirmed that striatal Dusp5 mRNA and protein levels were associated with abnormal involuntary movements (dyskinesia) in non-human primates chronically exposed to haloperidol. This transcriptomic analysis showed important haloperidol-induced G protein-coupled receptor signaling alterations that may support a regulatory role of Nur77 in dopamine D₂ receptor signaling pathways and identified, for the first time, a putative Nur77-dependent expression of Dusp5 as a new signaling component for antipsychotic drug-induced tardive dyskinesia.

Keywords: Next-generation sequencing (RNAseq), Haloperidol, Nur77, Dyskinesia, Dusp5, Striatum

Table des matières

Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	viii
Liste des sigles.....	ix
Liste des abréviations.....	xiv
Remerciements.....	xvi
Avant-propos.....	xvii
Chapitre 1: Introduction.....	1
1.1 Historique et impacts de la schizophrénie.....	2
1.2 Physiopathologie de la schizophrénie et mécanismes impliqués.....	3
1.2.1 Rôle de la dopamine et des récepteurs dopaminergiques.....	4
1.2.2 Rôle du glutamate et des récepteurs glutamatergiques.....	7
1.2.3 Rôle de la sérotonine et des récepteurs sérotoninergiques.....	10
1.3 Arsenal thérapeutique.....	12
1.3.1 Antipsychotiques de première génération/antipsychotiques typiques.....	13
1.3.2 Antipsychotiques de deuxième génération/antipsychotiques atypiques.....	14
1.3.3 Antipsychotiques de troisième génération/antipsychotiques atypiques.....	15
1.4 Dyskinésies tardives et usage d'antipsychotiques.....	15
1.4.1 La dyskinésie tardive.....	16
1.4.2 Facteur de transcription Nur77.....	17
1.4.3 Lien entre Nur77 et les antipsychotiques.....	18
1.5 Méthodes de transcriptomique.....	20
Objectif de l'étude.....	20
Chapitre 2: Article.....	24
Chapitre 3: Discussion.....	97
3.1 Résumé des résultats et discussion générale.....	98
3.2 La modulation de gènes liés à la neurotransmission dopaminergique et la signalisation dépendante des protéines G.....	101
3.3 La modulation de gènes liés à la neurotransmission glutamatergique et dopaminergique... 	104
3.4 La modulation différentielle de gènes par Nur77.....	107
3.5 La modulation des Dusp et leur rôle dans les mouvements involontaires anormaux (dyskinésie).....	109
3.6 Autres études de transcriptomique dans la littérature.....	110
3.7 Limites de l'étude et perspectives d'avenir.....	113
3.8 Conclusion.....	116

Références	118
Annexe.....	137

Liste des tableaux

Tableau 1. Top 20 transcrits les plus fortement modulés dans la comparaison des groupes WT-Sal vs. WT-HAL	62
Tableau 2. Top 20 transcrits les plus fortement modulés dans la comparaison des groupes WT-Sal vs. KO-SAL	66
Tableau 3. Top 20 transcrits les plus fortement modulés dans la comparaison des groupes KO-Sal vs. KO-HAL	70
Tableau 4. Top 20 transcrits les plus fortement modulés dans la comparaison des groupes WT-HAL vs. KO-HAL	74
Tableau 5. Effet de l’halopéridol sur les transcrits des isoformes <i>Dual specificity phosphatase</i> (Dusp) dans le striatum de rats sauvages	78
Tableau S1. Liste d’amorces pour les transcrits validés par RT-qPCR	79
Tableau S2. Transcrits significativement modulés dans les groupes de comparaison WT-Sal vs. WT-HAL, WT-Sal vs. KO-Sal, KO-Sal vs. KO-HAL et WT-HAL vs. KO-HAL	Annexe
Tableau S3. Résultats de l’analyse bio-informatique GeneCards GeneAnalytics pour le groupe de comparaison WT-Sal vs. WT-HAL	Annexe
Tableau S4. Résultats de l’analyse bio-informatique GeneCards GeneAnalytics pour le groupe de comparaison WT-Sal vs. KO-Sal	Annexe

Tableau S5. Résultats de l'analyse bio-informatique GeneCards GeneAnalytics pour le groupe de comparaison KO-Sal vs. KO-HALAnnexe

Tableau S6. Résumé des transcrits associés avec les voies de signalisation des protéines G modulés par halopéridol81

Liste des figures

Figure 1. Présentation des analyses (termes GO) des données transcriptomiques	51
Figure 2. Analyses des voies de signalisation modulées à partir des données du séquençage à haut débit (RNAseq)	53
Figure 3. Validation de la modulation de certains gènes avec l'analyse RT-qPCR	54
Figure 4. Modulation des niveaux d'ARNm et protéiques du <i>dual specificity phosphatase 5</i> (Dusp5) dans un modèle de dyskinésie tardive chez des primates	55
Figure S1. Modulation de transcrits individuels à partir des données de l'analyse RNAseq	56
Figure S2. Présentation des analyses additionnelles des données transcriptomiques	57
Figure S3. Analyses additionnelles des voies de signalisation modulées à partir des données du séquençage à haut débit (RNAseq).....	59
Figure S4. Graphique illustrant des voies de signalisation et transcrits modulés selon l'analyse RNAseq	60
Figure S5. Illustration des immunobuvardages de Dusp5 à partir de putamens d'animaux contrôles et traités avec halopéridol	61

Liste des sigles

6-OHDA: *6-hydroxydopamine*

Adora2a: *Adenosine A2a Receptor*

AHV: *Homovanillic acid*, Acide homovanillique

AIMS: *Abnormal Involuntary Movement Scale*, Échelle de mouvements involontaires anormaux

Akt3: *AKT Serine/Threonine Kinase 3*

ARNm: *Messenger RNA*, ARN messenger

Arrdc2: *Arrestin Domain Containing 2*

Cacna1c: *Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha 1C*

Cacna1e: *Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha 1E*

Cacna2d1: *Calcium Voltage-Gated Channel Auxiliary Subunit Alpha 2 delta 1*

Cacna2d3: *Calcium Voltage-Gated Channel Auxiliary Subunit Alpha 2 delta 3*

Cacnb4 : *Calcium Voltage-Gated Channel Auxiliary Subunit Beta 4*

Calm2: *Calmodulin 2*

Camk2a: *Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase II Alpha*

Camk2d: *Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase II Delta*

Camk4: *Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase IV*

Cdkn1a: *Cyclin dependent kinase inhibitor 1A*

Cdkn1a: *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A*

DALY: *Disability adjusted life years, Années de vie perdues pour cause d'invalidité*

DAT: *Dopamine transporter, Transporteur de la dopamine*

DSM-V: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*

DT: *Tardive dyskinesia, Dyskinésie tardive*

Dusp5: *Dual specificity phosphatase 5*

FDA: *Food and Drug Administration*

Fosb: *FosB Proto-Oncogene*

GABA: *γ -Aminobutyric acid*

Gpr12: *G protein-coupled receptor 12*

Gpr155: *G-Protein-Coupled Receptor 155*

Gpr3: *G Protein-Coupled Receptor 3*

Gpr34: *G Protein-Coupled Receptor 34*

Gpr88: *G Protein-Coupled Receptor 88*

Grasp: *Trafficking Regulator And Scaffold Protein Tamalin*

Gria2: *Glutamate Ionotropic Receptor AMPA Type Subunit 2*

GRIN1: *Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 1*

GRIN2A: *Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 2A*

GRIN2C: *Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 2C*

Grm4: *Glutamate Metabotropic Receptor 4*

Grm5: *Glutamate Metabotropic Receptor 5*

Gsk-3 β : *Glycogen Synthase Kinase 3 Beta*

Gucy1a3: *Guanylate cyclase 1 soluble subunit alpha 3*

GWAS: *Genome-wide association study, Étude d'association pangénomique*

Homer1: *Homer scaffold protein 1*

iMSN: *Indirect pathway medium spiny neuron, Neurone épineux moyen de la voie indirecte*

KO: *Knock-out*

LCS: *Cerebrospinal fluid, Liquide cérebrospinal*

LSD: *d-lysergic acid diethylamid*

MAPK: *Mitogen-activated protein kinases*

NBRE: *NGFI-B response element*

NMDA: *N-methyl-D-aspartate*

Nr4a1 (Nur77): *Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 1*

Nts: *Neurotensin*, Neurotensine

NurRE: *Nur77 response element*

Pde10a: *Phosphodiesterase 10a*

Pde1b: *Phosphodiesterase 1b*

Pde4d: *Phosphodiesterase 4d*

Pdpk1: *3-Phosphoinositide Dependent Protein Kinase 1*

PET : *Positron emission tomography*, Tomographie par émission de positrons

Pla2g3: *Phospholipase A2 group III*

Plag1: *PLAG1 like Zinc finger 1*

PPP1R9A: *Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 9A*

PPP2R2A: *Protein Phosphatase 2 Regulatory Subunit B alpha*

PPP2R5C: *Protein Phosphatase 2 Regulatory Subunit B Gamma*

PPP3CB: *Protein Phosphatase 3 Catalytic Subunit Beta*

Rapgef3: *Rap Guanine Nucleotide Exchange Factor 3*

Rgs4: *Regulator of G-protein signaling 4*

Rgs9: *Regulator of G-protein signaling 9*

RNAseq: *Next-Generation RNA sequencing*, séquençage à haut débit

RXR: *Retinoid X receptor*, Récepteur X des rétinoïdes

Serpine1: *Serpin Family E Member 1*

Sgk1: *Serum/Glucocorticoid regulated kinase 1*

Sgsm1: *Small G Protein Signaling Modulator 1*

Shank3: *SH3 And Multiple Ankyrin Repeat Domains 3*

SNP: *Single nucleotide polymorphism*, polymorphisme nucléotidique simple

Strn: *Striatin (Protein phosphatase 2 regulatory subunit 6 alpha)*

VCM: *Vacuous chewing movements*

VMAT2: *Vesicular monoamine transporter type II*, Transporteur des monoamines vésiculaire de type II

Vwa5b1: *Von Willebrand Factor A Domain Containing 5B1*

WT: *Wild-type*, Sauvage

Liste des abréviations

Etc.: Et cætera

Vs.: Versus

À ma famille et mes amis.

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Dr. Daniel Lévesque, de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir soutenu et guidé tout au long de ma formation de maîtrise. Je lui remercie pour tout l'effort et le temps qu'il a investis en moi.

J'aimerais également remercier l'agente de recherche du laboratoire, Catherine Lévesque, pour tout son aide et soutien durant mon parcours de maîtrise. J'aimerais la remercier pour son assistance lors de difficultés rencontrées durant mes études et de m'avoir guidé au cours des différentes expériences scientifiques.

J'aimerais ensuite remercier Giovanni Hernandez pour son aide durant mon initiation à la recherche et au laboratoire. Je souhaite aussi le remercier pour ses conseils précieux lors de ma formation.

Par la suite, j'aimerais remercier la Plateforme de Génomique de l'Institut de recherche en immunologie et en oncologie de l'Université de Montréal (IRIC) pour leurs services et contribution aux données de recherche, plus précisément aux données de transcriptomique chez le rat et aux données de RT-qPCR.

Je souhaite également souligner la contribution des Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC) ainsi que des Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQS) pour leur soutien financier lors de mes études, ainsi que pour leur soutien financier aux projets du laboratoire.

Finalement, je souhaite remercier ma famille et mes amis pour leur support continu durant mes études.

Avant-propos

C'est au cours de mes études en pharmacie au Doctorat professionnel en pharmacie (Pharm.D.) que j'ai découvert mon intérêt pour la pharmacologie et les mécanismes d'action des médicaments. De plus, plusieurs stages d'été effectués dans le laboratoire du Dr. Daniel Lévesque ont servi à renforcer mon intérêt pour la recherche et les neurosciences.

C'est durant les stages que je me suis intéressé à un projet financé dans le laboratoire, soit un projet de transcriptomique portant sur les antipsychotiques et la dyskinésie tardive. Ce sujet m'a intrigué puisqu'il m'a permis de travailler sur les mécanismes d'action précis en lien avec les antipsychotiques. Il m'a également permis de ressentir une contribution réelle dont je pourrais apporter au domaine de la santé, soit élucider les cascades intracellulaires impliquées avec l'activité de ces drogues, en vue de développer des thérapies ciblées et engendrant moins d'effets secondaires, précisément de type moteur.

Concernant l'approche utilisée pour la réalisation du projet de recherche, celle-ci fut en fonction des données obtenus de l'analyse transcriptomique et des pistes d'intérêt à explorer à partir de ces résultats. L'approche fut aussi déterminée en fonction de la formation et de l'apprentissage pouvant être acquis. Notamment, le projet de recherche a permis la réalisation de plusieurs expériences scientifiques, la recherche de la littérature et la rédaction d'un article scientifique. Finalement, ce choix de projet de recherche fut motivé par le potentiel de combler un manquement dans la littérature scientifique quant au mécanisme précis des dyskinésies tardives induites par la prise d'antipsychotiques et étant modulés par Nur77.

Chapitre 1: Introduction

1.1 Historique et impacts de la schizophrénie

La schizophrénie est un désordre psychotique majeur pouvant perturber l'état émotionnel ainsi que la fonction cognitive d'un individu, entraînant souvent des répercussions sur leur capacité à interagir et former des liens avec leur entourage (1). Elle se manifeste sous différents symptômes, soit des symptômes positifs, négatifs, et/ou cognitifs. Les symptômes positifs sont souvent associés aux comportements de type « psychotique » et sont cliniquement caractérisés par des hallucinations auditives, du délire et de l'agitation (1). Les symptômes négatifs, quant à eux, ont plutôt un impact sur le comportement et les émotions de l'individu affecté (1). Notamment, les individus ayant la schizophrénie présentent fréquemment une perte de motivation pour poursuivre des objectifs réalistes, ainsi qu'une perte de la capacité à ressentir le plaisir, dénommé anhédonie. Les symptômes cognitifs sont caractérisés par des problèmes d'attention, de discours incohérent et de pensées inappropriées, et un déficit au niveau des fonctions exécutives (capacités à planifier, organiser et exécuter ses activités), tous affectant la capacité à l'individu à communiquer avec leur entourage (1).

La schizophrénie a initialement été identifiée par Emil Kraepelin au cours du 19^{ème} siècle qui, suite à des observations, a regroupé une série de présentations cliniques semblables sous le même terme « *dementia praecox* » (2). Kraepelin a stipulé sur l'existence de neuf différentes formes de *dementia praecox*, avec deux critères étant fondamentaux dans le diagnostic de la pathologie, soit un déficit cognitif et des dysfonctions exécutives. Ce n'est qu'au 20^{ème} siècle que Eulen Bleuler a considérablement modifié le modèle de *dementia praecox*, le renommant sous le terme schizophrénie (2). Bleuler a annoncé que la schizophrénie n'était pas qu'une seule pathologie, mais plutôt un regroupement de plusieurs symptômes (syndrome), avec une distinction entre des symptômes de base et des symptômes accessoires du désordre (2). Par

symptômes de base, l'on parle de perte de contact avec la réalité, de perte d'associations dans les pensées et d'incongruence affective. Les symptômes accessoires, qui ne sont pas nécessairement présents, s'agissent des délires et hallucinations souvent observées chez les individus affectés (2).

La schizophrénie est un désordre ayant une faible prévalence de 3,3 sur 1000 personnes, affectant autant les hommes que les femmes (3,4). Le moment d'apparition typique de la schizophrénie se situe vers la fin de l'adolescence et elle se classe comme un désordre neurodéveloppemental (4). Celle-ci est associée à une espérance de vie significativement réduite et a été liée à des hauts taux de comorbidités, telles la maladie coronarienne, l'accident vasculaire cérébrale, la dépendance aux drogues et le diabète de type II (4). En effet, la schizophrénie a été rapportée comme ayant un fardeau important chez les individus atteints. Une revue systématique par Charlson et coll. a exprimé ceci en fonction d'années de vie perdues pour cause d'invalidité (disability adjusted life year, DALY), où 1 DALY est équivalent à 1 année de vie en santé perdue dû à une maladie. La schizophrénie contribue à 13,4 (9,9 – 16,7; 95% IC) millions de DALY (4). En dépit de sa faible prévalence, la schizophrénie a été classée en 2016 au 12^{ème} rang sur 310 en termes de pathologie la plus incapacitante et ayant le fardeau le plus élevé (4). Ces données font ressortir les impacts négatifs importants de la schizophrénie ainsi que la nécessité à développer des approches thérapeutiques efficaces contre celle-ci.

1.2 Physiopathologie de la schizophrénie et mécanismes impliqués

La schizophrénie est tout d'abord une pathologie d'origine neurodéveloppementale. Des facteurs génétiques et environnementaux périnataux et durant l'enfance sont responsables de l'initiation de la pathologie (5). En effet, des anomalies dans le développement cérébral structurelles ont été

observées dans des études de neuroimagerie et ont été démontrées comme étant présents lors de l'initiation des symptômes de la pathologie (5). Des évidences présentes chez des cas familiaux et de jumeaux de schizophrénie ont également permis d'établir une contribution génétique non négligeable dans l'étiologie de la pathologie, même si aucun gène spécifique ne peut être associé à la cause de la pathologie (5). Une étude observationnelle rétrospective chez plus de 2 millions de familles d'origine Suède a permis d'associer un risque génétique important à la schizophrénie (6). En effet, Lichtenstein et coll. ont observé un risque relatif de 9,0 (IC = 8,5 – 11,6) de développer la schizophrénie chez des frères et sœurs de patients atteints de la maladie (6). Ce risque augmenté de développer la schizophrénie était également présent chez des demi-frères et demi-sœurs de patients atteints de la maladie (risque relatif de 3,6 et IC = 2,3 – 5,5)(6). Le taux d'héritabilité de la schizophrénie a d'ailleurs été estimé entre 60 à 85%, suggérant un fort lien génétique pour cette pathologie (7). Plusieurs études d'association pangénomique (*genome-wide association study*, GWAS) ont été publiées, permettant d'identifier nombreux loci génétique de susceptibilité, avec une étude ayant identifié 128 loci associés avec la schizophrénie (8). Les données actuelles démontrent donc que la génétique constitue un facteur de risque important au développement de la schizophrénie.

Les symptômes positifs, négatifs et cognitifs de la schizophrénie sont associés à une altération de l'activité de plusieurs systèmes neurotransmetteurs, soit la neurotransmission dopaminergique, qui a été dénommée l'hypothèse dopaminergique, ainsi que la neurotransmission glutamatergique et sérotoninergique.

1.2.1 Rôle de la dopamine et des récepteurs dopaminergiques

L'hypothèse dopaminergique a initialement été proposée en 1952 lors de la découverte du premier antipsychotique, la chlorpromazine, par Paul Charpentier (9). C'est en 1963 que Arvid Carlsson et Margit Lindqvist ont davantage élaboré sur cette théorie, identifiant un rôle de ces antipsychotiques sur l'augmentation du métabolisme de la dopamine lorsqu'administrés chez des souris (10). D'autres évidences par Carlsson et Lindqvist ont démontré que la réserpine, un agent ayant une efficacité dans le traitement des psychoses, a mené à la déplétion au niveau vésiculaire de la dopamine, renforçant ainsi un lien entre ce neurotransmetteur et la pathologie (11). En effet, ces observations qui établissent un rôle de la dopamine ont été davantage supportées par des études démontrant une augmentation d'épisodes psychotiques avec l'usage d'amphétamine, un inhibiteur du recaptage de la dopamine agissant principalement sur le transporteur de la dopamine (DAT) au niveau de la fente synaptique (12). En tout, ces nombreuses évidences ont fait ressortir la simple transmission dopaminergique excessive comme cause de la schizophrénie, sans même avoir établi de lien spécifique avec les dimensions des troubles (symptômes positifs, négatifs ou cognitifs) ou l'aspect génétique de la pathologie (13).

Ce n'est qu'en 1991, suite à un article publié par Davis et coll., qu'une version alternative de l'hypothèse dopaminergique a été proposée (14). En effet, leur revue a mis de l'avant, à l'aide d'études d'imagerie, d'études in vivo et d'études sur le métabolisme neuronal effectuées antérieurement, l'idée d'une spécificité spatiale de l'activité dopaminergique lors de la schizophrénie. Plus précisément, les études post-mortem d'un métabolite de la dopamine, l'acide homovanillique (AHV) au niveau du liquide cébrospinal (LCS), n'a pas rapporté de distribution et d'augmentation uniforme à travers le cerveau, mais plutôt une augmentation de dopamine, de AHV et de récepteurs dopaminergiques région-spécifique au niveau sous-cortical, alors qu'une réduction de l'activité dopaminergique au niveau du cortex préfrontal a plutôt été

observée (14). Une autre critique de l'hypothèse dopaminergique classique a été l'obtention de données contradictoires sur l'importance du récepteur dopaminergique D₂ dans la pathologie, notamment suite à des données portant sur l'antipsychotique clozapine. En effet, les récepteurs D₂ ne possèdent qu'une faible affinité pour cet antipsychotique comparativement aux autres antipsychotiques (13). Or, celui-ci a démontré une efficacité supérieure chez des patients réfractaires aux autres antipsychotiques (13). Des études animales ont également été effectuées et celles-ci ont pu supporter cette hypothèse d'hypodopaminergie préfrontale et d'hyperdopaminergie sous-corticale. Des lésions de neurones dopaminergiques au niveau de l'aire tegmentale ventrale ayant des projections au cortex préfrontal ont mené à des niveaux élevés de dopamine et de AHV, une augmentation de densité des récepteurs D₂ au niveau du striatum et une augmentation de la réponse à l'amphétamine chez le rat (15). De façon intéressante, une lésion au niveau des voies dopaminergiques sous-corticales, incluant celles projetant vers le striatum, a mené à l'effet inverse chez le rat traité avec amphétamine (15). Pycock et coll. ont également observé une potentialisation des mécanismes pré- et post-synaptiques dans les voies mésolimbique et nigrostriée 1 mois suite à la destruction d'axones de neurones dopaminergiques projetant vers le cortex préfrontal, suggérant un lien entre l'activité dopaminergique réduite au niveau préfrontal et augmentée au niveau sous-cortical (15). Encore plus convaincant, une étude de tomographie par émission monophotonique a été effectuée par Laruelle et coll. chez des patients schizophrènes (16). Les auteurs ont démontré dans le striatum de patients schizophrènes, une augmentation de l'effet de l'amphétamine sur le potentiel de liaison du radiomarqueur D₂ spécifique *(S)-(-)-3-iodo-2-hydroxy-6-methoxy-N-[(1-ethyl-2-pyrrolidinyl)methyl]benzamide ([123I]IBZM)*, qui a démontré une association avec l'émergence et l'aggravation des symptômes positifs (16). En tout, les données pointent vers une dysfonction

dopaminergique striatale en tant que voie commune finale pour le développement de psychose dans le contexte de la schizophrénie. Ceci étant dit, malgré une meilleure caractérisation du rôle de la dopamine avec l'hypothèse dopaminergique modifiée, plusieurs manquements demeuraient toujours présents à ce moment, soit un manque d'évidences quant au lien entre les anormalités dopaminergiques et la présentation clinique (surtout au niveau des symptômes négatifs et cognitifs) ainsi que l'étiologie. De plus, bien que la présence d'hypo- et d'hyperdopaminergie furent élaborées, l'hypothèse révisée de la dopamine ne précisait pas quels éléments en particulier étaient dérégulés au niveau de la neurotransmission dopaminergique (13).

Depuis l'hypothèse modifiée de la dopamine proposée par Davis et coll., plusieurs avancées concernant le rôle de la dopamine dans la pathologie ont été mises de l'avant. Une nouvelle hypothèse de saillance aberrante a fait surface tentant d'élaborer davantage sur la schizophrénie. Brièvement, la saillance est décrite comme la capacité d'un individu à capter son attention sur un objet par rapport au reste de son environnement (17). Cette hypothèse est basée sur le concept que la dopamine joue un rôle dans la régulation de la saillance associée à des facteurs environnementaux et internes (17). Elle stipule donc qu'en présence de schizophrénie, la dysfonction dopaminergique méso-striée mènerait à une sur-attribution de la valeur motivationnelle associée à des stimuli environnementaux non pertinents (17). Une étude par Fletcher et coll. a démontré la présence de réponse anormale de saillance dans des régions du mésencéphale de patients schizophrènes à l'aide d'imageries par résonance magnétique (18). Les 14 participants ainsi que leurs contrôles ont effectué des tâches portant sur la saillance et l'activité neuronale en fonction des niveaux d'oxygène sanguins furent mesurés. Les résultats ont fait ressortir une réponse exagérée et positive à des stimuli non-saillants chez des individus atteints de schizophrénie, pouvant refléter sur des changements maladaptatifs au niveau de la

perception chez ces individus (18). En somme, les études effectuées depuis la moitié du 20^{ème} siècle ont permis de découvrir un rôle intégral de la dopamine dans la physiopathologie de la schizophrénie, ce sur quoi l'arsenal thérapeutique actuelle est basée.

1.2.2 Rôle du glutamate et des récepteurs glutamatergiques

Tel que décrit précédemment, des évidences importantes existent démontrant le rôle d'une dysfonction de la neurotransmission dopaminergique dans la schizophrénie. Cependant, il se pourrait que les mécanismes de dérégulation dopaminergique se produisent en aval de d'autres processus physiologiques. Notamment, une quantité croissante d'évidences supportent un rôle impliquant le système glutamatergique dans la pathogénèse de la schizophrénie. Tout d'abord, une étude effectuée par Kornhuber et coll. chez vingt patients schizophrènes et quarante-quatre patients contrôles ayant reçu une ponction lombaire et un prélèvement de LCS, a démontré des niveaux réduits de glutamate dans le LCS de patients schizophrènes comparativement aux contrôles (19). Une étude post-mortem de patients schizophrènes a également noté des changements morphologiques et structurels des neurones glutamatergiques au niveau du cortex cérébral, soit des réductions dans l'arborisation dendritique, dans la densité des épines dendritiques de ces neurones et une réduction dans la concentration de synaptophysine, un marqueur de l'activité axonale (20).

Plusieurs études décrivent une altération du récepteur *N-methyl-D-aspartate* (NMDA), plus précisément une hypofonction de celui-ci, en présence de schizophrénie. Ces études ont rapporté des profils d'expression d'ARN messenger (ARNm) du récepteur NMDA et de ses sous-unités, avec une réduction de l'expression des sous-unités *Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 1* (GRIN1), *Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 2A* (GRIN2A), et

Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 2C (GRIN2C) du récepteur NMDA de façon non-uniforme dans le cerveau, avec des évidences davantage robustes d'une diminution de l'expression de GRIN1 dans l'hippocampe (20,21). L'hypofonction des récepteurs NMDA a été décrite comme un point convergeant pour la progression des symptômes cognitifs de la schizophrénie, en raison de son rôle bien établi sur la mémoire, l'apprentissage et la plasticité synaptique (22–24). Par ailleurs, les récepteurs métabotropiques au glutamate couplés aux protéines G mGluR₂ et mGluR₃ ont été associés à la schizophrénie. En effet, plusieurs études ont réussi à établir un rôle significatif de ces récepteurs dans la pathologie (25–27). Premièrement, Rorick-Kehn et coll. ont effectué une série de tests comportementaux chez des rongeurs en utilisant du *LY404039*, un agoniste sélectif des récepteurs mGluR_{2/3}. Ils ont mesuré chez des rats et souris recevant de l'amphétamine et de la phencyclidine, la réponse d'évitement conditionnée, l'hyperlocomotion, la réponse de peur potentialisée et la coordination par test rotarod, ainsi que les niveaux des monoamines à l'aide de microdialyse. Les auteurs ont tiré comme conclusion une efficacité du *LY404039* dans ces modèles d'efficacité d'antipsychotiques et ont observé une modulation de la neurotransmission mésocorticale, suggérant une avenue potentielle comme traitement des désordres psychiatriques (25). Deuxièmement, une étude clinique de phase 2 effectuée chez des patients schizophrènes a démontré un effet significatif de l'activation des récepteurs mGluR_{2/3} sur le traitement de la schizophrénie. Les participants étaient traités avec soit l'antipsychotique olanzapine à dose thérapeutique, le pro-médicament du *LR404039* surnommé *LY2140023* ou un placebo. Les auteurs ont pu démontrer une amélioration statistiquement significative au niveau des symptômes positifs et négatifs de la schizophrénie avec le *LY2140023* par rapport au placebo, et une efficacité comparable à l'olanzapine (26). Ces données sont aussi supportées par une étude chez des souris transgéniques où il y a eu délétion

des récepteurs mGluR₂ et mGluR₃ menant à une perte de l'effet antipsychotique du *LY404039*, plus particulièrement chez les souris déficientes en mGluR₂ (27).

Un autre récepteur glutamatergique d'intérêt en schizophrénie est le récepteur post-synaptique mGluR₅. Ce récepteur se retrouve couplé aux récepteurs NMDA par l'entremise de protéines d'échafaudage de la famille *Homer* au niveau de sites synaptiques (28). Une étude menée sur des cultures neuronales a pu démontrer une localisation au niveau dendritique du mGluR₅ lors de co-transfections avec *Homer scaffold protein 1* (Homer1), comparativement à une transfection unique du mGluR₅ où celui-ci se retrouvait seulement au niveau du corps cellulaire, illustrant ainsi un rôle de Homer1 dans l'activité du mGluR₅ (29). Des modulateurs allostériques positifs du mGluR₅ ont démontré des résultats prometteurs quant au traitement des dysfonctions cognitives en facilitant notamment la potentialisation et la dépression à long terme au niveau de l'hippocampe de rats (30).

Considérant le rôle important que jouent la dopamine et le glutamate en tant que neurotransmetteurs dans la physiopathologie de la schizophrénie, plusieurs études ont tenté d'explorer les interactions entre les voies dopaminergiques et glutamatergiques. Une méta-analyse a regroupé l'ensemble des études ayant mesuré les impacts d'un traitement à la kétamine (un antagoniste non-compétitif des récepteurs NMDA) sur la fonction dopaminergique (31). En conclusion, l'administration aïgue de kétamine chez des rongeurs a été associée à des niveaux significativement augmentés de dopamine dans le cortex cérébral, le striatum, ainsi que le noyau accumbens, suggérant qu'une dysfonction de la voie glutamatergique pourrait provoquer une désinhibition de la voie dopaminergique (31). Ceci dit, une étude effectuée par Krystal et coll. a évalué les effets d'un pré-traitement à l'antipsychotique halopéridol chez vingt participants ayant reçu la kétamine. L'halopéridol n'a pas empêché la kétamine d'induire de la psychose, des

changements dans la perception et de l'euphorie (32). Gleich et coll. ont rapporté chez des humains une corrélation négative entre les concentrations de glutamate dans le cortex préfrontal latéral et la synthèse de dopamine dans le striatum ventral (33). Or, ils ont observé une corrélation positive entre les concentrations de glutamate striatale et la synthèse de dopamine dans le striatum ventral, suggérant un rôle différentiel de la dopamine sur le glutamate au niveau du cortex et du striatum (33). Le mécanisme en question proposé serait une dysfonction des récepteurs NMDA sur les interneurons *γ-Aminobutyric acid* (GABA) corticaux menant à une diminution de l'inhibition des projections glutamatergiques sur les neurones dopaminergiques du striatum, sur-activant ces derniers. Parallèlement, une sur-activation des projections glutamatergiques mèneraient à une sur-activation des interneurons GABAergiques dans l'aire tegmentale ventrale et donc une sur-inhibition des neurones de projection mésocorticales (34).

1.2.3 Rôle de la sérotonine et des récepteurs sérotoninergiques

La sérotonine a été proposée comme neurotransmetteur impliqué dans la schizophrénie depuis nombreuses décennies. Les premières évidences illustrant son rôle potentiel proviennent de l'utilisation de l'hallucinogène mescaline en tant que modèle de psychose au début du 20^{ème} siècle (35). En effet, la mescaline a été identifiée comme un agoniste sélectif des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2A}. Par la suite, c'est en 1947 que Albert Hofmann a découvert les propriétés psychomimétiques du *d-lysergic acid diethylamid* (LSD), un agoniste partiel du récepteur 5-HT_{2A} (35). Suite à ces observations, plusieurs études ont tenté d'identifier les modifications précises au niveau des voies sérotoninergiques en présence de schizophrénie.

Une étude post-mortem de longue date chez des patients schizophrènes a révélé une augmentation des niveaux de sérotonine dans le putamen, noyau accumbens et globus pallidus

(36). Des études post-mortem ont également identifié à l'aide d'essais de liaison du ligand radioactif *8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralinone* ($[^3H]8-OH-DPAT$), une augmentation de la densité des récepteurs 5-HT_{1A} dans le cortex préfrontal chez des patients schizophrènes comparativement aux contrôles (37). Contrairement aux données obtenues en post-mortem, les études de liaison du 5-HT_{1A} en tomographie par émission de positrons (PET) sont contradictoires. En effet, une étude par Tauscher et coll. a démontré une augmentation de la liaison du 5-HT_{1A} au niveau du lobe temporal médial, alors qu'une étude a plutôt démontré une diminution de la liaison (38,39).

Les données en post-mortem chez le 5-HT_{2A} en schizophrénie sont semblables aux résultats obtenus chez le 5-HT_{1A}. De façon générale, les études ont rapporté des diminutions de la liaison du récepteur 5-HT_{2A} dans le cortex frontal des patients schizophrènes (35). Comme il est le cas avec les récepteurs 5-HT_{1A}, les études PET avec le 5-HT_{2A} ont démontré des résultats contradictoires. Des études effectuées avec des radioligands pour le 5-HT_{2A}, le $[^{18}F]$ sepioperone et $[^{11}C]$ N-methylspiperone, ont démontré aucune différence significative dans les densités des récepteurs 5-HT_{2A} chez des patients schizophrènes comparativement à des patients contrôles (40,41). Au contraire, une étude par Ngan et coll. a plutôt démontré une diminution de la densité des récepteurs 5-HT_{2A} au niveau du cortex frontal (42).

Des études ont également exploré le rôle de d'autres sous-types de récepteurs sérotoninergiques dans la physiopathologie de la schizophrénie, soit les récepteurs 5-HT_{1F} et 5-HT₇. Les récepteurs 5-HT_{1F} ont été rapportés comme étant diminués au niveau de l'hippocampe, alors que les récepteurs 5-HT₇ ont été rapportés comme étant diminués au niveau du cortex préfrontal dorsolatéral à l'aide de la technique d'autoradiographie au $[^3H]GR113808$ (43,44). Ceci étant dit,

davantage d'études sont nécessaires avant de pouvoir clairement élaborer un rôle de ces sous-types de récepteurs dans la pathologie.

L'élément essentiel qui relie les récepteurs de la sérotonine et les symptômes de la schizophrénie est le fait que l'ajout d'une composante pharmacologique 5-HT_{1A} et/ou 5-HT_{2A} aux antipsychotiques conventionnels (antagonistes des récepteurs D₂) améliore le profil clinique (meilleure efficacité sur les symptômes dits négatifs et moins d'effets moteurs) des molécules antipsychotiques qui possèdent une composante 5-HT (atypique, voir plus loin).

1.3 Arsenal thérapeutique

Le traitement de la schizophrénie repose actuellement sur le blocage pharmacologique des récepteurs D₂ post-synaptiques, élaboré en fonction de la panoplie de résultats obtenus antérieurement sur l'hypothèse de la dopamine en schizophrénie. Ce blocage se fait par l'entremise d'une classe de médicaments surnommés antipsychotiques. Les antipsychotiques varient entre eux en termes de propriétés pharmacologiques, mais sont divisés en trois grandes classes selon leur mécanisme d'action, soit les antipsychotiques de première, deuxième ou troisième génération (aussi classifiés en termes d'antipsychotique typique ou atypique). Cependant, encore aujourd'hui, tous les composés qui ont une activité clinique interagissent d'une façon ou d'une autre, et avec une puissance variable, sur le récepteur D₂ de la dopamine.

1.3.1 Antipsychotiques de première génération/antipsychotiques typiques

C'est en 1952 que le premier antipsychotique, la chlorpromazine, a été synthétisée par Paul Charpentier. Suite à la découverte des effets neuroleptiques de la chlorpromazine, d'autres analogues de la phénothiazine tels que la fluphénazine et la thioridazine, ainsi qu'un analogue de

la butyrophénone, l'halopéridol, ont été synthétisés (45). Ces composés agissent tous en tant qu'antagonistes des récepteurs dopaminergiques D₂ au niveau de la voie mésolimbique, mais présentent également un antagonisme des récepteurs D₂ au niveau du striatum et du cortex cérébral (45). Ils possèdent également des effets anticholinergiques et antihistaminiques, contribuant en partie à leur profil d'effets indésirables. Par leur puissant antagonisme sur les récepteurs D₂ post-synaptiques du système mésolimbique, les antipsychotiques de première génération, ou antipsychotiques typiques, ont été démontrés efficaces dans le traitement et la gestion des symptômes positifs en lien avec la schizophrénie comme les délires et les hallucinations (46,47). Ceci étant dit, ceux-ci n'ont qu'une efficacité limitée quant aux symptômes négatifs et cognitifs de la schizophrénie et même parfois des effets délétères, tel que détaillé dans une méta-analyse par Leucht et coll. (48). De plus, ces agents sont responsables de certains effets indésirables à court terme mais également à long terme avec un usage prolongé. En effet, par leur blocage des récepteurs D₂, les antipsychotiques de première génération peuvent induire des effets moteurs de type extrapyramidaux, tels que du parkinsonisme, de l'akathisie, et de la dystonie, ainsi que des problèmes hormonaux tel que l'hyperprolactinémie. Avec un usage chronique, ces agents peuvent également induire de la dyskinésie tardive, un trouble caractérisé par des mouvements anormaux involontaires (49).

1.3.2 Antipsychotiques de deuxième génération/antipsychotiques atypiques

En raison des limites associées avec les antipsychotiques de première génération, tant au niveau de l'efficacité des symptômes négatifs et cognitifs mais aussi au niveau des troubles moteurs dont ils engendrent, une nouvelle classe d'antipsychotiques a été développée. Ces agents sont les antipsychotiques de deuxième génération, aussi nommé les antipsychotiques atypiques. Ces antipsychotiques incluent notamment la quétiapine, l'olanzapine, la rispéridone, la clozapine

ainsi que d'autres agents. Ils sont de moins puissants antagonistes des récepteurs D₂ (50). Une propriété pharmacodynamique importante de ces drogues s'agit de leur antagonisme des récepteurs 5-HT_{2A}, une cible potentielle en schizophrénie tel que décrit antérieurement (51). Compte tenu de leurs effets moindres sur les récepteurs D₂ et de leurs effets prononcés sur les récepteurs 5-HT_{2A}, les antipsychotiques de deuxième génération présentent un profil d'effets indésirables unique et différent comparativement aux antipsychotiques de première génération. Ils ont tout d'abord une incidence moindre mais toujours présente de provoquer des symptômes extrapyramidaux comparativement aux antipsychotiques de première génération (49). Cependant, ces drogues sont associées à une hausse des problèmes cardiométaboliques, incluant une augmentation du risque de syndrome métabolique. En effet, une étude populationnelle canadienne a rapporté une association significative de l'usage d'antipsychotiques de deuxième génération et l'hypertension (*Odds ratio* 1,94, 95% IC 1,07 – 3,55) ainsi que l'obésité abdominale (*Odds ratio* 2,62, 95% IC 1,45 – 4,71) et une élévation de l'onde QTc (52).

Parmi les antipsychotiques de deuxième génération, la clozapine possède de nombreuses caractéristiques qui la distinguent des autres drogues de la même classe. Tout d'abord, elle ne possède qu'une faible affinité pour les récepteurs D₂ et 5-HT_{2A} et agit également sur les récepteurs H₁ de l'histamine, les récepteurs muscariniques et les récepteurs α -adrénergiques (53). La clozapine a été associée à une efficacité supérieure comparativement aux autres antipsychotiques et est utilisée dans le cas de résistance aux autres traitements (54). Cependant, elle possède un profil d'effets indésirables important incluant mais non limité à l'agranulocytose, l'hypotension, l'hypersalivation, un gain de poids et de la sédation limitant son usage (49).

1.3.3 Antipsychotiques de troisième génération/antipsychotiques atypiques

Une nouvelle catégorie d'antipsychotiques, les antipsychotiques de troisième génération, a fait surface dans la dernière décennie. Ces médicaments, qui incluent l'aripiprazole et le brexpiprazole, sont caractérisés comme étant des agonistes partiels au niveau du récepteur D₂ (55). En effet, le mécanisme d'action proposé de ces drogues inclut une compétition de ces antipsychotiques avec la dopamine au niveau des récepteurs D₂ dans les endroits ayant une haute concentration extracellulaire de dopamine tel que la voie mésolimbique lors des symptômes positifs en schizophrénie (55). Au contraire, ces antipsychotiques possèderaient plutôt un effet activateur dans les régions ayant une faible concentration extracellulaire de dopamine, tel que la voie mésocorticale responsable des symptômes négatifs en schizophrénie (55). Ainsi, ces drogues agiraient en tant que stabilisateurs des effets de la dopamine. Ces drogues possèdent tout de même un profil d'effets indésirables semblable aux antipsychotiques de deuxième génération.

1.4 Dyskinésies tardives et usage d'antipsychotiques

1.4.1 La dyskinésie tardive

Tel que discuté brièvement ci-haut, l'un des effets indésirables principaux suite à un traitement à long terme avec les antipsychotiques est la dyskinésie tardive (DT). La DT est caractérisée par des mouvements involontaires anormaux souvent localisés au niveau du visage et du tronc, mesuré à l'aide du *Abnormal Involuntary Movement Scale* (AIMS) (56). Cette condition est dans la plupart des cas irréversible et ce, même suite à l'arrêt de l'agent causal (56). En effet, Vinuela et coll. ont rapporté dans leur revue des taux de rémission de la DT suite à l'arrêt de l'antipsychotique étant en moyenne inférieures à 25% (57). Selon la cinquième édition du *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-V), une exposition à un antipsychotique pendant au moins 3 mois et une durée des symptômes pendant plus de 1 mois

sont les critères diagnostiques de la DT induite par les antipsychotiques (58). L'incidence de la DT est estimée entre 2 à 5% annuellement, avec une prévalence qui varie entre 15 et 30% pour les antipsychotiques typiques (59). En dépit de leur antagonisme moins prononcé au niveau des récepteurs dopaminergiques, les antipsychotiques atypiques ont tout de même été rapportés comme pouvant engendrer de la DT, avec une prévalence à 13,1% (60).

L'étiologie exacte de la DT demeure peu connue mais il semblerait y avoir un lien avec le blocage persistant des récepteurs dopaminergiques post-synaptiques et une hypersensibilisation subséquente de ceux-ci (61). Plus précisément, cette hypersensibilité des récepteurs D₂ au niveau des neurones épineux moyens qui projettent dans la voie indirecte (iMSN) mène à une désinhibition du globus pallidus interne et des noyaux sous-thalamiques, produisant ainsi des mouvements excessifs involontaires (61). D'autres théories existent pour décrire l'étiologie de la DT, notamment une théorie de déficience cholinergique ainsi qu'une théorie de stress oxydatif avec production de radicaux libres. Cependant, la théorie d'hypersensibilité des récepteurs D₂ demeure la théorie principale. Ceci étant dit, les travaux du laboratoire ont démontré qu'un traitement prolongé avec l'halopéridol produit une régulation à la hausse du récepteur D₃ et non du récepteur D₂ chez un modèle de primates non-humains (62). Donc, l'hypersensibilisation des récepteurs D₂/D₃ pourrait être liée à la DT.

Il n'y existe présentement pas de traitement permettant la résolution complète de la DT, dû au fait que l'étiologie de cette condition demeure peu connue. Les thérapies disponibles agissent en support et servent à améliorer les symptômes de la DT. Un agent ayant démontré certains bénéfices pour améliorer les symptômes de la DT est le donépézil, un inhibiteur de l'acétylcholinestérase (63). Un autre agent ayant démontré une diminution de la sévérité des symptômes de la DT est la tétrabénazine, un inhibiteur du transporteur des monoamines

vésiculaire de type II (VMAT2) (64). Plus récemment, en 2017, un analogue de la tétrabénazine est apparu sur le marché, la valbénazine, et représente le premier médicament approuvé spécifiquement par la *Food and Drug Administration* (FDA) pour cette indication. En somme, un manque de connaissances quant à l'étiologie précise de la DT rend difficile l'utilisation d'un traitement ciblé et davantage efficace pour cette condition.

1.4.2 Facteur de transcription Nur77

Le récepteur nucléaire orphelin et facteur de transcription *Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 1* (Nur77; aussi connu sous le nom de Nr4a1, NGFI-B) fait partie de la famille des Nurs, incluant Nurr1 et Nor-1. Ceux-ci sont classifiés en tant que gènes immédiats-précoces et sont donc activés de façon rapide et transiente suite à de nombreux stimuli, tels que des facteurs de croissance, des cytokines, le stress et des neurotransmetteurs (65). Ils possèdent la capacité à répondre rapidement aux changements dans leur environnement cellulaire et sont impliqués dans nombreux processus physiologiques comme l'apoptose et le cycle cellulaire, l'inflammation, la stéroïdogenèse ainsi que des processus neurologiques (65). Le rôle de Nur77, à la fois dans la prolifération cellulaire, l'apoptose et le cancer est bien documenté. En effet, lorsque Nur77 se retrouve au niveau de la mitochondrie, il exercerait un effet pro-apoptotique, alors que sa localisation au niveau du noyau serait plutôt associée à une augmentation de la survie cellulaire (66–68). Il a d'ailleurs été observé que Nur77 est nécessaire à la prolifération des cellules cancéreuses du poumon médiée par le facteur de croissance épidermique (67). Nur77 peut interagir avec le facteur de transcription p53 et peut soit induire sa transcription et favoriser l'apoptose, ou plutôt inhiber celle-ci et promouvoir la prolifération de cellules cancéreuses, en fonction des conditions physiologiques (68). Des interactions entre Nur77 et le NF- κ B ont aussi été observées, suggérant un rôle de Nur77 dans les processus inflammatoires et des pathologies

telles que l'athérosclérose. Un mécanisme potentiel proposé par Harant et coll. pour expliquer l'interaction entre Nur77 et NF- κ B serait une inhibition de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B au niveau du promoteur de l'interleukine-2 par Nur77 (69). Pour terminer, Nur77 est également impliqué dans le métabolisme du glucose où, au niveau du muscle squelettique, il induit l'absorption du glucose par la synthèse de transporteurs, ainsi qu'au niveau du foie, où il stimule la néoglucogénèse (70).

Étant un récepteur nucléaire orphelin, Nur77 peut activer l'expression génétique de façon ligand-indépendante. Nur77 peut soit agir en tant que monomère ou homodimère en se liant à son élément de réponse *NGFI-B response element* (NBRE) ou *Nur77 response element* (NurRE), respectivement (71). Nur77 peut également se lier aux récepteurs X des rétinoïdes (RXRs) et former des hétérodimères pour réguler la transcription via un élément de réponse aux rétinoïdes (*direct repeat 5, DR5*) (72). Il est exprimé à travers tout le système nerveux central mais est principalement exprimé dans le cortex, le striatum, le noyau accumbens, l'hippocampe, l'hypothalamus et l'amygdale (73). Ce profil d'expression suggère un rôle de Nur77 dans la mémoire, les comportements motivés, la cognition et la locomotion. Ceci dit, certains de ces rôles restent à être validés.

1.4.3 Lien entre Nur77 et les antipsychotiques

Considérant une expression du Nur77 au niveau du striatum, il est raisonnable de soupçonner une implication de celui-ci dans la motricité et la neurotransmission dopaminergique. En effet, une étude effectuée par Beaudry et coll. dans un modèle de rats traités avec halopéridol ou clozapine, a démontré une rapide (pic en 1 à 3 heures) et forte augmentation de l'expression de Nur77 dans le striatum dorsolatéral suite à un traitement aigu et chronique avec l'antagoniste D₂

halopéridol (74). Ces résultats illustrent une modulation de Nur77 par les antipsychotiques. Cette régulation à la hausse de Nur77 par les antipsychotiques typiques est maintenue, même suite à un traitement chronique avec ces drogues sans désensibilisation apparente (73). Or, Ethier et coll. ont pu démontrer dans leur modèle de souris déficientes (*knock-out* (KO)) pour Nur77 une réduction importante de la catalepsie induite par l'halopéridol et le raclopride, un antagoniste spécifique des récepteurs D₂/D₃ (75). Cette réduction de la catalepsie n'était pas présente avec le SCH23390, un antagoniste sélectif D₁. De plus, l'augmentation par l'halopéridol de l'ARNm de l'enképhaline au striatum était absente en présence de souris Nur77 KO, et l'augmentation de l'ARNm de la neurotensine (Nts) était réduite de 50% (75). Ces résultats associent davantage Nur77 avec les effets des antipsychotiques, particulièrement l'halopéridol et renforcent un rôle potentiel de celui-ci dans la cascade intracellulaire induite par ces drogues. Une autre étude par Ethier et coll. a pu démontrer chez des souris Nur77 KO, une induction des mouvements de mastication de la mâchoire (*vacuous chewing movements* (VCM)), des mouvements utilisés dans des modèles de DT, ainsi qu'une exacerbation de ceux-ci par l'halopéridol (76).

De façon intéressante, Maheux et coll. ont mesuré les effets de plusieurs antipsychotiques typiques et atypiques sur les niveaux d'expression de Nur77. Ils ont démontré une corrélation entre l'induction de Nur77 par les antipsychotiques et le récepteur D₂ du striatum (77). Ils ont également démontré que la modulation de Nur77 peut être utilisée pour calculer un index prédictif du profil typique ou atypique de l'antipsychotique et que parallèlement, les ratios d'affinité du 5-HT_{2A}/D₂ peuvent prédire l'expression de Nur77 (77). Pour faire suite aux résultats obtenus chez les rongeurs, Mahmoudi et coll. ont exploré le rôle de Nur77 chez un modèle de primates traités chroniquement avec halopéridol ou clozapine. Ils ont constaté à l'aide d'analyses post-mortem, une forte régulation à la hausse de l'expression de Nur77 dans le striatum

d'animaux traités avec halopéridol, alors qu'ils n'ont pas constaté de différence chez les animaux traités avec la clozapine (78). Parmi les animaux traités avec halopéridol, ceux n'ayant pas exprimé de DT avaient des niveaux d'expression de Nur77 significativement augmentés dans le putamen comparativement aux animaux ayant développé de la DT, suggérant une association entre l'expression de Nur77 et le risque de DT (78). De plus, une étude par Novak et coll. a pu démontrer chez des patients schizophrènes qu'un polymorphisme nucléotidique simple (SNP) situé dans la région non-codante (3'-UTR) de l'ARNm de Nur77 est associé à un risque élevé de développer de la DT ainsi qu'à une sévérité élevée de la DT (79). Les données actuelles dans la littérature démontrent donc un lien robuste entre Nur77 et la DT induite par l'halopéridol.

1.5 Méthodes de transcriptomique

Plusieurs études ont évalué la modulation de gènes suite à un traitement aigu ou chronique aux antipsychotiques à l'aide de la technique par microarray, avec des résultats variables entre les études (80–82). Cette technique consiste notamment à déterminer le profil d'expression de gènes connus d'un groupe expérimental comparativement à un groupe contrôle à l'aide d'une plaque ayant des sondes fluorescentes. Bien que cette technique soit un puissant outil dans le contexte de la transcriptomique, elle possède certaines limites telles qu'une sensibilité et spécificité limitée ainsi qu'une restriction à des séquences d'ADN connues (83). Une technique davantage récente, nommée le séquençage à haut débit (Next-generation RNA sequencing, RNAseq), permet une identification et caractérisation de l'expression complète du génome, incluant les transcrits rares ou non identifiés auparavant (84). Une étude récemment publiée par Abrantes et coll. a exploré les changements dans l'expression génétique dans les différentes populations cellulaires du striatum chez des souris C57BL/6J traités chroniquement avec halopéridol ou la clozapine. Ils ont rapporté une modulation de gènes impliqués dans le développement du

neurone/synapse, dans l'épissage alternatif ainsi que dans la fonction mitochondriale par les antipsychotiques (85).

Objectif de l'étude

Notre étude avait comme objectif, à partir des résultats d'une analyse RNAseq, d'identifier des voies de signalisation et gènes impliqués dans les effets des antipsychotiques ainsi que dans l'activité de Nur77. Plus précisément, l'étude visait à élucider les gènes significativement modulés par un traitement aigu à l'halopéridol et différentiellement modulés par Nur77 en vue de déterminer des gènes d'intérêt dans la DT induite par les antipsychotiques. Pour atteindre cet objectif, nous avons comparé l'effet de l'antipsychotique halopéridol chez les rats sauvages et déficients (KO) en Nur77. Brièvement, nous avons utilisé un modèle de rats utilisé précédemment par Rouillard et coll. en 2018 (86). Des rats transgéniques possédant une mutation dans la séquence codante pour Nur77 générant une protéine non-fonctionnelle, furent utilisés (rats *Fawn-hooded*, dénommés FHH-Nr4a1^{m1M^{cwi}}). Ces rats Nur77 KO et des rats sauvages (WT) furent traités avec une injection intrapéritonéale d'halopéridol 0.5 mg/kg ou par de la saline (NaCl 0.9%), produisant ainsi 4 groupes expérimentaux : des rats Nur77 WT traités avec saline (WT-Sal), des rats Nur77-WT traités avec halopéridol (WT-HAL), des rats Nur77 KO traités avec saline (KO-Sal), et des rats Nur77 KO traités avec halopéridol (KO-HAL). Cinq heures après l'injection, les rats furent sacrifiés et le striatum total homogénéisé pour analyse transcriptomique subséquente. Nous avons choisi un sacrifice à ce moment précis afin de pouvoir identifier les transcrits modulés directement par Nur77, considérant que Nur77 est un gène immédiat-précoce rapidement induit en 1 à 3 heures par la prise d'halopéridol, tel que décrit précédemment. Le striatum fut sélectionné en raison de l'association entre l'expression du Nur77 dans le striatum et les mouvements involontaires anormaux dans des modèles animaux (78,86).

À partir du tissu homogénéisé, nous avons extrait l'ARN et identifié les transcrits différentiellement modulés par RNAseq pour les différents groupes expérimentaux comparés. Des analyses bio-informatiques subséquentes (par le logiciel *GeneCards™ GeneAnalytics*) furent effectuées à partir de nos gènes significativement modulés afin de déterminer des voies de signalisation d'intérêt. En somme, selon notre objectif, nous voulions mieux caractériser le mécanisme d'action intracellulaire précis des antipsychotiques modulé par Nur77, en vue d'ultimement contribuer au développement des thérapies davantage ciblées des DT et ayant un risque moindre d'effets indésirables.

Chapitre 2: Article

Transcriptomic analysis suggests an important role of Nur77 (Nr4a1) in striatal neuroadaptation after haloperidol treatment and a contribution of dual-specificity phosphatases in the development of dyskinesia

Simon Majeur¹, Giovanni Hernandez¹, Catherine Lévesque¹, Pierre J. Blanchet², Claude Rouillard³ and Daniel Lévesque^{1}*

¹ *Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada*

² *Faculté de Médecine Dentaire, Département de Stomatologie, Université de Montréal, Canada*

³ *Axe Neurosciences, Centre de recherche du CHU de Québec and Faculté de Médecine, Département de Psychiatrie et Neurosciences, Université Laval, Québec, Canada and CRCHUL*

* Correspondence should be addressed to: Daniel Lévesque, Faculté de pharmacie, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Succursale Centre-ville, Montréal (QC), H3C 3J7, Canada.

Phone: (514) 343-6339

E-mail: daniel.levesque.1@umontreal.ca

Key words:

Antipsychotic drug, RNAseq, Dusp, striatum, G protein-coupled receptor signaling, Nur77 deficient rat.

Abstract

Despite more than 60 years of research, the precise intracellular mechanism of action of antipsychotic drugs remains elusive. The orphan nuclear receptor Nur77 (also known as Nr4a1 or NGFI-B) has been proposed to be involved in antipsychotic drug effects, but its role is not fully understood. To fully understand the relationships between the signaling components induced by antipsychotic drugs and the activity of Nur77, we compared striatal gene transcripts following acute haloperidol treatment in wild-type and Nur77-deficient rats using Next Generation RNA Sequencing (RNAseq) and a bioinformatics analysis. Genes involved in G $\beta\gamma$ protein, glutamate, DARPP-32/cAMP/PKA and calcium-dependent (DAG/IP₃) signaling pathways were significantly enriched in haloperidol-treated animals. Comparison of wild-type and Nur77 deficient rats (in saline condition) also identified calcium-dependent glutamate neurotransmission, G α_q protein and DARPP-32/cAMP/PKA signaling pathways enrichments. Further analysis indicated that a subset of genes was differentially modulated by haloperidol in wild type vs. Nur77 deficient rats (e.g., Nts, Rgs4, Fosb, Dusp5, Gucyl1a3, Sgsm1, Camk1g, Gpr3). The transcriptomics analysis also showed important and rapid haloperidol-induced G protein-coupled receptor signaling alterations and Nur77-associated modifications of the dopamine D₂ receptor signaling pathway. Amongst significantly modulated transcripts, dual specificity phosphatase 5 (Dusp5) represents a new and very interesting candidate. Indeed, we confirmed that putamen Dusp5 levels were associated with abnormal involuntary movements in non-human primates chronically exposed to haloperidol. Thus, the present study identified a putative Nur77-dependent expression of Dusp5 as a new signaling component associated with antipsychotic drug-induced tardive dyskinesia and supports an important regulatory role of Nur77 in dopamine D₂ receptor signaling pathways.

Introduction

Schizophrenia is a complex and debilitating mental disorder characterized by positive (delusion, auditory hallucinations), negative (social isolation, anhedonia) as well as cognitive symptoms (executive function deficits) (Patel et al., 2014; McCutcheon et al., 2020). Antipsychotic drugs represent the current gold standard for the treatment of schizophrenia symptoms. First-generation antipsychotics, also referred to as typical antipsychotic drugs, act mainly as dopamine D₂ receptor antagonists and contribute to the inhibition of dopamine neurotransmission in the mesolimbic dopaminergic pathway, which has been shown to be hyperactive during psychotic episodes (delusion, hallucination). A newer class of antipsychotic drugs, referred to as second-generation antipsychotics or atypical antipsychotic drugs, display a more heterogeneous profile in terms of receptor affinity, but generally act on D₂ dopamine and serotonin neurotransmission, with the most commonly involved receptor subtype affected being the 5-HT_{2A} receptor (Seeman, 2002; Meltzer, 2013; Solmi et al., 2017).

Owing to their different mechanisms of action and receptors involved in their effects, typical and atypical antipsychotic drugs display different side effect profiles. Notably, due to potent D₂ receptor blockade, typical antipsychotic drugs often cause extrapyramidal side effects including but not limited to akinesia, akathisia, parkinsonism, and tardive dyskinesia (Woods et al., 2010; Carbon et al., 2018). Conversely, atypical antipsychotic drugs have been associated with a decreased risk of extrapyramidal side effects in comparison to typical antipsychotics but are associated with an increased risk of metabolic disorders (Solmi et al., 2017). Despite showing less propensity for the development of extrapyramidal side effects, it was reported in a prospective cohort study that one-third of patients chronically treated by atypical antipsychotic drugs such as risperidone and olanzapine presented tardive dyskinesia (Woods et al., 2010).

Atypical antipsychotic drugs therefore pose a non-negligible risk of tardive dyskinesia, highlighting the interest of pursuing research in the treatment and management of tardive dyskinesia in individuals requiring a long-term treatment with antipsychotic drugs. Thus, a better understanding of cellular and molecular pathways associated with clinical benefit and motor side effects could help to develop more efficient antipsychotic drugs.

Modulation of multiple elements of different signaling pathways have been described following antipsychotic drug administration (Beaulieu et al., 2009). These pathways include G protein dependent and independent signaling cascades that can be directly or indirectly ascribed to dopamine D₂ receptor blockade (Beaulieu et al., 2009). Although interaction with the dopamine D₂ receptor represents a common target of all clinically active antipsychotic drugs, the precise mechanism leading to their antipsychotic activity or unwanted side effects remains elusive. Distinct signaling pathways has been proposed to sustain these effects, suggesting that biased activities at the dopamine D₂ receptor may represent an interesting avenue for new generations of antipsychotic drugs (Masri et al., 2008; Urs et al., 2017). Many of these signaling cascades converge to modulate the activity of cytoplasmic protein kinases/phosphatases. Some of these targets can be translocated to the nucleus to regulate transcription and to alter gene expression for more sustained and prolonged effects (Rampino et al., 2019).

The nuclear receptor subfamily 4 group A member 1 (Nr4a1, also known as Nur77 or NGFI-B) gene is a member of the orphan nuclear receptor family encoded as an immediate early gene that has been associated with dopamine-related behaviors (Lévesque and Rouillard, 2007; Campos-Melo et al., 2013). Nur77 is highly expressed in areas involved with dopamine activity such as the striatum. Treatment with the D₂ receptor antagonist haloperidol selectively induced Nur77 in striatal enkephalin/neurotensin-positive cells and the genetic deletion of Nur77 altered motor

behaviors associated with typical antipsychotic drug treatment, such as catalepsy and experimental tardive dyskinesia-like movements in mice (Beaudry et al., 2000; Werme et al., 2000; Ethier et al., 2004a; Ethier et al., 2004b; Gilbert et al., 2006; Sanchez et al., 2014). Modulation of Nur77 expression after haloperidol treatment therefore suggests a role of Nur77 in intracellular pathways associated with D₂ receptor blockade in striatal neurons (Lévesque and Rouillard, 2007). However, the mechanism of action that links Nur77 with dopamine-mediated effects under antipsychotic drug treatment remains elusive.

In the present study, some of the signaling pathways possibly associated with antipsychotic drug effects and the contribution of Nur77 were examined with a Next generation RNA sequencing (RNAseq) technology approach. We performed a transcriptomic analysis on total RNA extracted from the striatum of wild type (WT) Fawn-hooded hypertensive (FHH) rats and mutant FHH rats deficient in Nur77 (FHH-NR4A1^{m1Mcwi}) (Rouillard et al., 2018), treated with a single saline or haloperidol injection. The results provide new insights on potential signaling pathways and transcripts implicated in antipsychotic drug effects, some of them under the regulation of Nur77 activity. Amongst significantly modulated genes, we identified a new class of phosphatases in tardive dyskinesia called Dual-specificity phosphatases (also known as mitogen-activated protein kinase phosphatases (MPK), which represent a large and heterogenous subgroup of protein tyrosine phosphatases (PTP) that can dephosphorylate multiple substrates of the c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 and Mitogen-activated protein kinases (MAPK) like ERK1/2 families, with various specificities (Patterson et al., 2009).

Methods

Animals and treatments

The rat strain used in the present study was previously described (Rouillard et al., 2018). Briefly, male FHH rats were injected with ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) and harem bred to females, with the pups genetically screened using a tiling assay and DNA sequencing to identify the genes possessing the ENU-induced mutations. Rats possessing a mutation in the amino acid residue 130 were selected as they produce a mutation in the TCA codon (TAA) in the Nur77 coding sequence, producing a truncated non-functional protein. This rat strain is denominated FHH-Nr4a1^{m1Mcwi} and was provided by Transposagen Biopharmaceutical Inc. (Lexington, KY, USA) and the NIH Rat Knockout Consortium Program.

The objective of the present study is to identify transcripts putatively altered by Nur77 activity. Thus, we performed the RNAseq analysis shortly after an acute drug administration. Since Nur77 is an immediate early gene with peak mRNA expression between 0.5-3 hours after administration of antipsychotic drugs (Beaudry et al., 2000; Maheux et al., 2005), we evaluated the modulation of transcript levels by RNAseq analysis 5 hours following haloperidol injection to maximize our chances to identify transcripts directly modulated by Nur77 activity. We have selected the striatum because local expression of Nur77, restricted to D₂-containing/enkephalin expressing medium spiny neurons (D₂-MSN) (Beaudry et al., 2000) has been associated with abnormal involuntary movements in multiple animal models (Ethier et al., 2004a; Ethier et al., 2004b; Mahmoudi et al., 2013; Rouillard et al., 2018). The dose of haloperidol used here (0.5 mg/kg, i.p.) is associated with the generation of motor side effects in rodents (Ethier et al., 2004a). Four experimental groups (N = 3/group) included WT FHH rats and Nur77 deficient

(KO) FHH rats FHH-Nr4a1^{m1Mcwi} exposed to a single dose of haloperidol (0.5 mg/kg, i.p.) or saline.

For non-human primate experiments, we used brain sections from experimental groups previously described in (Hernandez et al., 2019). Briefly, ovariectomized adult female capuchin monkeys were divided in control untreated subjects and those who received a chronic dose of haloperidol decanoate intramuscularly for 36 months (0.1-0.9 mg/kg/week titrated as a function of side effects present). For the sacrifices, animals were euthanized with pentobarbital 15 mg/kg i.v. and ketamine 10 mg/kg i.m. prior to perfusion with ice-cold saline. Brains were removed and submerged into isopentane (2-methylbutane) for 15 seconds at -50°C and were then stored at -80°C. All procedures were approved by the animal care committee of the University of Montreal.

RNA extraction and sequencing

Rats were sacrificed under deep CO₂ anesthesia. Brains were rapidly extracted and left and right striata were dissected out, pooled, and immediately homogenized in RNA extraction reagent Trizol (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) and frozen in dry ice until further manipulations. Total RNAs were extracted using the chloroform/isopropanol method and purified on RNeasy columns (Qiagen Mini Kit #74106). The quality of RNAs was determined with an RNA Nano bioanalyzer (Institute for Research in Immunology and Cancer's (IRIC) genomics platform).

Striatal gene transcript levels were measured and compared with the use of RNAseq with a coverage of approximately 33 million paired end reads per sample (HiSeq2000). Mapping protocol was based on sequences that were trimmed for sequencing adapters and low quality 3'

bases using Trimmomatic version 0.35 (Bolger et al., 2014) and aligned to the reference rat genome version Rnor_6.0 (gene annotation from Ensembl version 84) using STAR version 2.5.1b (Dobin et al., 2013). Gene expressions were obtained both as read count directly from STAR as well as computed using RSEM (RNA-Seq by Expectation Maximization) (Li and Dewey, 2011). Transcript expression levels were expressed either in TPM (Transcripts Per Kilobase Million) or FPKM (Fragments Per Kilobase Million) values (read counts) and moderated estimation of fold change and dispersion for RNAseq data using DESeq2 version 1.16.1 was used to identify differentially expressed genes (Love et al., 2014). Statistical analysis was performed on the RNAseq data with the use of the DESeq2 method, as previously described (Love et al., 2014). Briefly, a generalized linear model of read counts following a negative binomial distribution of expressions was used. This was scaled by normalization factors to account for differences in sequencing depth, GC content and gene length between samples. The Wald test was used to obtain p-values indicative of the significance of variation between samples. A correction for large sample size was performed with the Benjamini & Hochberg method, thus producing adjusted P-values (P-adj.). In all comparisons, a log₂ Fold-change ± 15% with P-adj. value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

RT-qPCR experiments

Validation of transcripts expression (Dusp5, Fosb, Gpr3, Sgk1, Arrdc2, Scg2, Rgs4, Gucyl1a3, Arhgef3, Rapgef3, Camk1g, Sgsm1) was performed using reverse transcribed quantitative PCR (RT-qPCR) as previously described (Rouillard et al, 2018). In brief, reverse transcriptase reactions of 2 µg of total RNA from striatal tissues were performed in a final volume of 20 µl

using the high-capacity cDNA Reverse Transcription Kit with random primers (Applied Biosystems, Streetsville, ON, Canada). Complementary DNA samples (1.5 μ l) were used for SYBR green qPCR amplification of selected genes (see suppl. Table S1, for primer sequences) using Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Streetsville, ON, Canada). Gene expression level for endogenous controls was determined using pre-validated Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Streetsville, ON, Canada). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and β -actin transcripts were used as endogenous controls. The ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Streetsville, ON, Canada) was used to detect amplification levels. All reactions were run in triplicate and average values of cycle thresholds (CTs) were used for quantification. The relative quantification of target transcripts was determined using the $\Delta\Delta$ CT method. Data are represented as relative mRNA levels compared to GAPDH and β -actin housekeeping transcript levels.

In situ hybridization of Dusp5 mRNA

Probe preparation. A cDNA fragment of the human Dusp5 mRNA sequence (GenBank accession No. NM_004419) was subcloned into a pBSK+ plasmid and linearized with HindIII (sense) or XhoI (antisense). The probe was synthesized with [³⁵S]-dUTP (1250 Ci/mmol, PerkinElmer, Woodbridge, ON, Canada) using a riboprobe combination systems enzyme kit (Promega, Madison, WI, USA). The reaction was carried out at 37°C for 2 hours and labeled oligonucleotide was purified on a miniQuick spin RNA probe purification column (Roche, Mississauga, ON, Canada).

Hybridization. *In situ* hybridization procedure was performed as previously described (Lévesque et al., 2017). In brief, brain sections of 12 μm were fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde. After pre-hybridization steps, [^{35}S]-labeled oligonucleotide sense or antisense probe was added in the hybridization buffer to reach a concentration of 4×10^6 cpm/slide. Sections were incubated in a humid chamber overnight at 58°C , with the hybridization buffer composed of 50% formamide, 10% dextran sulfate, 1X Denhardt's solution, 0.3 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, 0.25 mg/ml yeast tRNA and 10 mM Tris-HCl, pH8. After several washes, the slide-mounted tissue sections were exposed to BioMax MR films (Kodak, New Haven, CT) for 28 days at room temperature. The films were developed, and autoradiograms analyzed by densitometry (Lévesque et al., 2017).

Quantification of the autoradiograms was performed using computerized analysis (ImageJ 1.53v software, Wayne Rasband, NIH). Digital brain images were taken using a Grayscale Digital Camera (Model CFW-1612M, Scion Corporation, Maryland, USA). Optical gray densities (OD) were transformed into $\mu\text{Ci/g}$ of tissue equivalent using standard curves generated with ^{14}C -microscales strips for ^{35}S -radiolabeled ligands (ARC 146A- ^{14}C standards, American Radiolabeled Chemicals Inc., St-Louis, MO, USA). The brain areas under examination included posterior parts of the caudate nucleus and putamen corresponding to Bregma -6.30 to -8.10 (Paxinos, 2009). Putamen regions were analyzed into dorsolateral putamen (PDL), dorsomedial putamen (PDM), ventrolateral putamen (PVL) and ventromedial putamen (PVM) subdivision areas. Average levels of labeling for each area were calculated from two to three adjacent brain sections of the same animal. Non-specific binding intensities obtained from the sense probe were subtracted from every measurement.

Western Blot of Dusp5 protein levels

The method used has been described previously (Lévesque et al., 2017; Hernandez et al., 2019). Briefly, the monkey putamen was dissected from 50 µm coronal sections at -20°C and stored in eppendorfs. Samples were homogenized with the use of a lysis buffer containing 10 mM Tris-HCl, 2% SDS and a protease inhibitor at pH 6.8 (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). With the use of the Bicinchoninic Assay (BCA) (Thermo Fisher Scientific, Mississauga, ON, Canada) and an established standard curve, protein concentrations of the samples were determined. Samples were incubated at 95°C for 5 minutes and 20 µg of denatured protein was then loaded into the well of a 10% Bis-Tris pre-cast gel along with a protein standard (Precision Plus Protein Kaleidoscope pre-stained protein standard; Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, ON, Canada). The gel was run for 60 minutes at 200 V and was then transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, ON, Canada) for 2h at 70 V at 4°C. The PVDF membrane was then blocked for 1h in 5% bovine serum albumin (BSA) in Tris-buffered saline containing Tween 20 (TBST). Afterwards, the membrane was cut in two and incubated overnight with a rabbit monoclonal anti-Dusp5 primary antibody (Abcam Inc, Toronto, ON, Canada, product no. ab200708) at a dilution of 1:1000 in 5% BSA in TBST and a 1:10,000 mouse monoclonal anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) primary antibody (Abcam Inc, Toronto, ON, Canada, product no. 9484). The following day, the membranes were washed 3 times in TBST for 5 minutes and incubated for 1 hour at room temperature in either 1:10,000 Horseradish peroxidase (HRP)-linked goat anti-rabbit secondary antibody (Abcam Inc, Toronto, ON, Canada, product no. 6721) or 1:50,000 HRP-linked rabbit anti-mouse secondary antibody (Abcam Inc, Toronto, ON, Canada, product no. 6728). After

three 5-minute washes in TBST, membranes were submerged in Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, ON, Canada) for 5 minutes and fluorescence was measured using the ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, ON, Canada).

Bioinformatics analysis

Transcripts clustering, function-based and pathway analysis were performed by bioinformatics analysis with the Genecards™ GeneAnalytics software suite (Lifemap Sciences Inc., Alameda, CA). Differentially modulated genes between each condition compared (WT vs. KO and/or Sal vs. HAL) was analyzed by the software, subsequently providing information on potential diseases, signaling pathways and compounds associated with the gene set. Each disease or pathway was allotted a matching score representative of the strength of the correlation, based on the number of matched genes for that specific disease or pathway identified by the GeneAnalytics software. Specifically, the GeneAnalytics software utilizes the binomial distribution to test the null hypothesis that the inputted genes are not over-represented within a SuperPath, gene ontology (GO) term or compound. The score is a transformation ($-\log_2$) of the p-value, wherein high scores are associated with a p-value corrected for multiple comparisons lesser than or equal to 0.0001 and where moderate scores are associated with a corrected p-value higher than 0.0001 but lesser than or equal to 0.05. Diseases, signaling pathways and compounds with a low or moderate matching score or with only one or two matched genes were excluded/filtered from the results as they were less pertinent and likely to constitute pathways significantly modulated by haloperidol or Nur77 deficiency.

Statistical analysis

Quantitative RT-qPCR was performed as previously reported (Rouillard et al., 2018), and data was expressed as mRNA levels adjusted to housekeeping transcripts β -actin and GAPDH. A one-way ANOVA was performed to compare the relative gene transcript expressions between the four different rat treatment groups (WT-Sal, WT-HAL, KO-Sal, KO-HAL).

For Western Blot and *in situ* hybridization experiments, ImageJ software version 1.5.1 (National Institutes of Health, Maryland, USA) was used to process blots and measure relative band intensities and for image acquisitions. Prism software version 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) was used to analyze the data in the non-human primate experiments. All data was expressed as a group mean \pm SEM. A 2-tailed t-test was performed to compare the relative Dusp5/GAPDH protein levels or mRNA levels in the putamen of control untreated monkeys compared to monkeys chronically exposed to haloperidol. A 2-tailed t-test was performed as well to compare Dusp5/GAPDH protein levels and mRNA levels between dyskinetic and non-dyskinetic animals treated with haloperidol. Statistical significance was set at $P \leq 0.05$ for all experiments.

Results

After analysis of sample clustering based on normalized log read counts, one outlier sample (a WT-saline replicate) was discarded. Of the 32,663 identified transcripts, RNAseq data revealed 414 genes with significant ($p\text{-adj.} \leq 0.05$) differential expression between the WT-Sal and WT-HAL groups. The majority (275) of significantly modulated genes were downregulated in comparison to upregulated transcripts (139) in haloperidol-treated WT animals. Haloperidol

administration in Nur77 deficient rats (comparison KO-Sal vs KO-HAL) significantly modulated a restricted set of 66 genes only, including 63 upregulated genes in comparison to 3 downregulated genes. The main explanation of this difference between WT and Nur77-deficient rats following haloperidol treatment is that multiple transcripts were also modulated in the same direction (especially with down-regulated transcripts) in Nur77-deficient animals in the saline condition. Seventy-one (71) genes were significantly modulated in the statistical comparison between WT-Sal vs. KO-Sal. Amongst these genes, 61 were significantly downregulated, whereas 10 genes were upregulated. A list of the most highly (fold changes) up- and down-regulated genes (first 20) in the 4 comparisons analyses can be found in Tables 1-4. The totality of transcripts significantly ($p\text{-adj.} \leq 0.05$) modulated in the different group comparisons can be found in supplementary Table S2.

Figure 1 illustrates some of the most highly regulated genes (Volcano plots, Heat maps) as well as the main enriched signaling pathways from the bioinformatics analysis of gene ontology (GO) terms (function-based analysis and pathways) after haloperidol administration in WT animals (comparison WT-Sal vs WT-HAL) (Fig. 1A-C) and in Nur77 deficient rats (comparison WT-Sal vs KO-Sal) (Fig. 1D-F). We found the highest fold changes for Nts (FC = 9.67, $P\text{-adj.} = 4.65 \times 10^{-18}$) and Fosb (FC = 4.90, $P\text{-adj.} = 3.88 \times 10^{-9}$) in WT-HAL (Fig. 1A,B, Table 1), consistent with previous studies, which showed similar results in the striatum after haloperidol administration using *in situ* hybridization measurements (Zahm et al., 1996; Beaudry et al., 2000; Rodriguez et al., 2001; Gruber et al., 2002; Ethier et al., 2004a). Acute haloperidol exposure also led to upregulation of certain genes of interest, such as Dusp5 (FC = 4.16, $P\text{-adj.} = 2.81 \times 10^{-11}$), Cdkn1a (FC = 3.58, $P\text{-adj.} = 1.22 \times 10^{-8}$), Pdk4 (FC = 2.73, $P\text{-Adj.} = 1.06 \times 10^{-8}$) and Sgk1 (FC = 2.39, $P\text{-adj.} = 7.94 \times 10^{-21}$), as well as downregulation of Gucy1a3 (FC = 0.57, $P\text{-adj.} = 7.42 \times 10^{-}$

¹²), Rgs4 (FC = 0.52, P-adj. = 3.88×10^{-9}) and Strn (Striatin, protein phosphatase 2 regulatory subunit 6 alpha (Ppp2r6a), FC = 0.58, P-adj. = 3.31×10^{-7}) (Fig. 1A,B, Table 1 and S2). Comparison of the effect of haloperidol in Nur77 deficient rats (KO-Sal vs KO-HAL) led to modulations of much less genes (66 compared to 414) (Table 3 and suppl. Table S2). Some transcripts significantly modulated in WT-Sal vs WT-HAL comparison are also upregulated in KO-Sal vs KO-HAL, including for example, Nts (FC = 5.37, P-adj. = 2.60×10^{-16}), Dusp5 (FC = 3.21, P-Adj. = 9.92×10^{-12}), Cdkn1a (FC = 2.14, Adj. = 1.79×10^{-6}), Sgk1 (F = 1.54, P-Adj. = 7.76×10^{-7}) and Pdk4 (FC = 2.29, P-adj. = 1.79×10^{-6}), but with somewhat lower fold changes, suggesting differential modulations by haloperidol between WT and KO groups.

For the comparison of WT and Nur77 deficient animals treated with saline (WT-Sal vs KO-Sal) (Fig. 1D,E, Table 2 and suppl. Table S2), Sgk1 (FC = 1.52, P-adj. = 0.00087) and Camk2d (FC = 1.50, P-adj. = 0.01109) were noticeable upregulated genes, whereas Pik3cd (FC = 0.65, P-adj. = 0.00557), Strn (FC = 0.67, P-adj. = 0.00303), Rgs4 (FC = 0.71, P-adj. = 0.03042) and Rgs9 (FC = 0.71, P-adj. = 0.03042) were noticeable downregulated genes (Fig. 1D,E, Table 2 and suppl. Table S2). Comparison of WT-HAL vs KO-HAL generated only one modulated transcript with a significant P-adj. value, Kansl2 (FC = 8.84, P-adj. = 3.49×10^{-8}) (Table 4 and suppl. Table S2). Upregulation of Gipc2 (FC = 1.56, P-value = 0.05), a protein previously identified as a regulator of dopamine receptor G protein signaling (Jeanneteau et al., 2004) and Grin2a (FC = 1.41, P-value = 0.0014), the NMDA receptor 2A subunit, and downregulation of Dusp5 (FC = 0.58, P-value = 0.00024) are also noticeable (Table 4).

The GeneAnalytics tool from Genecards was used to analyze RNAseq data for biological pathways, gene ontology (GO) terms, phenotype and diseases associated with the differentially modulated genes for each comparison group. The comparisons of saline and haloperidol treatments in WT animals, and between saline groups in WT and Nur77 deficient rats, are presented in Fig. 1C and 1F. The functional-based analysis revealed that transcripts from glutamate- and dopamine-related intracellular signaling pathways were enriched in both the set of modulated genes after haloperidol treatment in WT animals and in the comparison between WT and Nur77 deficient groups (DARPP-32 feedback onto cAMP pathway, G β γ signaling, cAMP-dependent PKC activity) (Fig. 1C-F). The phenotype (HPO and MGI) results are related to abnormal locomotor activity, which is consistent with the role of the striatum. The analysis revealed that enriched pathways of modulated gene sets can be associated with impaired coordination, hyperactivity, and involuntary movements in both comparisons (WT-Sal vs WT-HAL, Fig. 2A and WT-Sal vs KO-Sal, Fig. 2B). The WT-Sal vs KO-Sal comparison revealed genes associated with calcium-dependent pathway (calmodulin binding, glutamate synapse, G α q signaling, DARPP-32 feedback onto cAMP pathway) and phenotypes like the first analysis (involuntary movements, orofacial dyskinesia, impaired coordination, hyperactivity) (Fig. 2). Complete GeneAnalytics reports can be found in supplementary Tables S3, S4 and S5.

RT-qPCR was performed on a series of transcripts to validate the modulation in their expression (Fig. 3). All transcript modulations observed in the RNAseq analysis were confirmed in the RT-qPCR experiments (for a comparison of RT-qPCR data in Fig. 3 with individual read counts of these genes, see suppl. Fig. S1). RT-qPCR data for these genes revealed similar modulations (up- or down-regulation and magnitudes) in gene expression in comparison to the RNAseq data, thus validating the modulation of these genes in the transcriptomics analysis. Interestingly, individual

analysis of the modulation of transcripts also revealed significant differential upregulations of *Dusp5*, *Fosb*, *Gpr3*, *Arrdc2* and *Sgsm1* transcripts between comparisons of WT-Sal vs WT-HAL and KO-Sal vs KO-HAL (Fig. 3), supporting differential fold changes between WT-Sal vs WT-HAL and KO-Sal vs KO-HAL presented in Tables 1 and 3, respectively. This also suggests a contribution of *Nur77* activity in the modulation of those transcripts by haloperidol. A more thorough examination of GPCR signaling pathways indicates that numerous transcripts related to G protein components, second messengers, and kinases/phosphatases, are modulated by haloperidol (suppl. Table S6).

Since the modulation of phosphatases of the *Dusp* class by haloperidol was never reported previously, we looked at all *Dusp* isoforms significantly expressed in the striatum to see if other phosphatases representative of this class were also modulated by haloperidol (Table 5). We found that 9 *Dusp* protein isoforms were significantly expressed in the striatum (non-adjusted p-values). Six of them were modulated by haloperidol (5 upregulated and 1 downregulated) (Table 5). This analysis indicates that striatal expression of multiple isoforms of *Dusp* are regulated by this antipsychotic drug. Interestingly, upregulated *Dusp* isoforms 1, 4, 5, 10 and 26 correspond to isoforms that have been identified as early response genes and expressed mainly in the nucleus, whereas downregulated *Dusp6* and non-regulated isoforms 3, 7 and 14 are mostly found in cytoplasmic compartments (Patterson et al., 2009), suggesting that *Dusp* modulation might convey (or is associated with) haloperidol-induced intracellular signaling events into the nucleus.

Amongst the *Dusp* isoforms expressed in the striatum, only *Dusp5* was found to be significantly modulated by haloperidol once adjustments for multiple comparisons were accounted for (P-adj. results, refer to suppl. Table S2 in the Annex). Thus, we opted to further explore the role of *Dusp5* in antipsychotic drug effects. As such, *in situ* hybridization and Western blot experiments

of Dusp5 were conducted in capuchin monkey putamen chronically exposed to haloperidol (Fig. 4). The description of these animals and treatment was previously reported (Levesque et al., 2017; Hernandez et al., 2019). In monkeys chronically exposed to haloperidol, a strong induction of Dusp5 mRNA levels was observed (Fig. 4A). This is consistent with our RNAseq data after an acute treatment. Comparison of Dusp5 levels between haloperidol-treated animals with or without dyskinesia indicates that, in dyskinetic animals, Dusp5 upregulation is significantly lower than in non-dyskinetic animals (Fig. 4A, inset). There is no significant modulation in the relative protein expression of Dusp5 (two-tailed t-test: mean of relative intensity in control (untreated) group (1.086 ± 0.151 , N=4)) vs. mean of relative intensity in haloperidol group = 0.782 ± 0.151 , P-value = 0.2368, N=9) (Fig. 4B). However, we observed a significant reduction in the relative protein expression of Dusp5 in monkeys that display tardive dyskinesia (two-tailed t-test: mean of relative intensity of non-dyskinetic group = 0.9828 ± 0.1384 , mean of relative intensity of dyskinetic group = 0.4384 ± 0.0737 , P-value = 0.0078) (Fig. 4B, inset). This suggests that the capacity of maintaining elevated Dusp5 levels can be associated with a lower risk of developing tardive dyskinesia.

Discussion

Several transcriptomic studies have used gene microarrays, or more recently RNAseq, to explore intracellular responses of antipsychotic drugs (Chong et al., 2002; Konradi, 2005; Ko et al., 2006; Girgenti et al., 2010; Iancu et al., 2012; Rizig et al., 2012; Kumarasinghe et al., 2013; Kim et al., 2018). RNAseq technology has the benefit of covering all transcripts, thereby providing an unbiased ability to identify and quantify rare and previously unidentified genes with high

sensitivity (Wu et al., 2011). Despite the accumulation of transcriptomic data, there is still no consensus on the precise mechanism of action of antipsychotic drugs. One of the explanations of the discrepancy between studies resides in the difficulty to compare them because of multiple differences in experimental paradigms used. It is expected that important differences should be observed between antipsychotic drug treatment regimens (acute vs. chronic treatments, dosages, striatum vs. nucleus accumbens, type of analysis (whole tissue vs. cell type specific), animal species, etc.). Given our focus on Nur77 in the transcriptional program associated with haloperidol administration, we chose a specific window (5 hours after single dosing) to preferentially highlight the regulation of direct Nur77 target transcripts free from additional neuroadaptation events observed after a more prolonged exposure. Accordingly, our study might not be comparable with previous reports.

Indeed, in studies where chronic treatments with haloperidol in mice were used, only few regulations are shared with the present experiment, including an upregulation of neurotensin (Nts) (Girgenti et al., 2010; Kim et al., 2018), a neuropeptide implicated in the regulation of striatal neuron activity, and a downregulation of a voltage-gated L-type calcium channel subunit (Cacna1c) transcript (Kim et al., 2018). Other well-characterized transcripts previously associated with antipsychotic drug effects or abnormal involuntary movements were also enriched after haloperidol dosing in the present study, including, for example, Fosb (Andersson et al., 1999).

The RNAseq results show modulations of several genes of interest in WT or Nur77 deficient rats treated with haloperidol. Serum/glucocorticoid regulated kinase 1 (Sgk1) transcript was revealed to be upregulated in Nur77-deficient rats compared to WT animals in saline condition. This suggests a negative regulation of Sgk1 expression by Nur77, which is consistent with previously

documented regulation of *Nurr1* over this transcript (Kwon et al., 2021). This upregulation of *Sgk1* transcript levels in *Nur77*-deficient animals resulted in a distinct upregulation by haloperidol in WT (2.39-fold) vs. *Nur77*-deficient rats (1.54-fold). Interestingly, in a transcriptomic study performed on human induced pluripotent stem cell-derived neurons from 6 schizophrenic patients, phosphoinositide 3-kinase/glycogen synthase kinase 3 (PI3K/GSK3) signaling pathway, including *Sgk1*, was enriched (Stertz et al., 2021). *Gsk3b* transcript, an important member of this signaling pathway, was previously shown to be associated to tardive dyskinesia in non-human primates (Hernandez et al., 2019). In addition, *Sgk1* was previously shown to be involved in neuroinflammation and the release of pro-inflammatory factors in glia (Kwon et al., 2021). Our results therefore put forward a potential role of the PI3K/GSK3 β signaling pathway in short-term antipsychotic effects that could potentially implicate striatal glial cells in antipsychotic drug effects.

Dual-specificity phosphatases (*Dusp*) are negative regulators of MAPK/ERK1/2 signaling (Patterson et al., 2009). Complex modulations of multiple *Dusp* isoforms have been previously reported after denervation and L-dopa treatments in the striatum of hemi-parkinsonian mice using cell-type specific (dMSN and iMSN) translating ribosome affinity purification (TRAP) profiling (Heiman et al., 2014) or by RNAseq (Smith et al., 2016), as well as after psychostimulant-induced repetitive motor patterns (stereotypies) (Crittenden et al., 2021), suggesting a contribution of this class of phosphatases in striatal cell neuroadaptations. To the best of our knowledge, our study is the first reporting a modulation of *Dusps* by antipsychotic drugs (see Table 5). Complex regulations of multiple *Dusp* transcript isoforms were observed after an acute dopamine D₂ receptor blockade, including a differential regulation between WT and *Nur77*-deficient rats exposed to haloperidol. To further explore the role of *Dusp* in abnormal

movement disorders, we measured *Dusp5* mRNA and protein levels in non-human primates exposed to a prolonged treatment with haloperidol. Interestingly, our data in monkeys revealed that higher striatal *Dusp5* levels are present in non-dyskinetic monkeys relative to animals having developed dyskinesia, thus suggesting a protective role of this gene in antipsychotic drug-induced abnormal involuntary movements (tardive dyskinesia). Altogether, the present data and previous observations point toward a relationship with *Dusp5* levels and the development of dyskinesia. These observations also suggest that an adaptation following acute modulation of *Dusp5* might occur even after repeated administrations. One cannot reject a contribution of other *Dusp* isoforms or the difference attributed to the species used between various experimental paradigms.

Genes involved in glutamate signaling were revealed to be modulated in our RNAseq analysis. Notably, in WT rats treated with haloperidol, there was a downregulation of *Shank3* (scaffold protein of the postsynaptic density of synapses), *Grin2a* (NR2A subunit of glutamate NMDA receptor), and *Grasp* (Tamalin, a molecular scaffold involved in cellular trafficking of the group 1 metabotropic glutamate receptor), and in *Nur77* deficient rats treated with haloperidol, an upregulation of *Homer1*. *Homer1* and *Shank3* can act as scaffolding proteins to physically connect dopaminergic and glutamatergic receptors (Tomasetti et al., 2017). It has been proposed that *Homer1* may participate in the rearrangements induced by antipsychotic drugs in the dopamine-glutamate calcium-dependent interplaying network (de Bartolomeis and Tomasetti, 2012). Striatal *Homer1* has been previously shown to be upregulated by haloperidol (Iasevoli et al., 2010). This suggests that haloperidol rapidly alters dopamine-glutamate signaling interplay and that *Nur77* may contribute to this phenomenon along with the modulations of calcium-dependent signaling pathways previously described.

In response to the acute blockade of the D₂ receptor, changes in multiple signaling pathways were observed (see suppl. Table S6). Although it is not possible to summarize all changes into a specific signaling event, G protein subunit gamma (Gng4) upregulation, as well as decreased Gno1, Rgs4, phosphodiesterases (Pde10a, Pde1b, Pde4d), diacylglycerol kinases and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 (Itpr1) are possibly involved in the direct reaction from the global decrease of D₂ receptor intracellular signaling. However, we cannot include all the changes observed here within this explanation, suggesting that additional regulatory events were also involved. Also, it is possible that all D₂ receptor coupling pathways may not be altered to the same extent. Except for Dusp isoforms, all other phosphatases modulated by haloperidol are downregulated, whereas many kinases were upregulated, except for Gsk3b and protein kinases C and D. Downregulation of subunits related to phosphatase PP2A activity (Strn, Strip2, Ppp2r5c, Pp2r2a) and Akt3 is interesting since this may reduce the formation of the β -arrestin/PP2A/AKT complex involved in the desensitization of multiple GPCRs, including the D₂ receptor (Beaulieu et al., 2005). This is consistent with a reduction of receptor desensitization and internalization shortly after D₂ receptor blockade (Beaulieu et al., 2005). This might lead to an increase of receptor binding capacity, a well-documented phenomenon observed after a prolonged exposure to haloperidol in rodents (Laruelle et al., 1992; Lévesque et al., 1995; Vasconcelos et al., 2003). Differential modulations of many of these transcripts in Nur77 deficient rats suggests that Nur77 activity might contribute to this neuroadaptive process.

Another interesting modulation includes members of Regulator of G protein Signaling (Rgs) proteins along with multiple G protein subunits and G protein modulator components. Rgs proteins act as GTPase activating proteins and can deactivate G protein subunits of the G α i, G α s and G α q subtypes (Ahlers-Dannen et al., 2020). Rgs4 was downregulated in haloperidol-treated

rats, whereas, both Rgs4 and Rgs9 were downregulated in Nur77 deficient rats in saline condition. Transient downregulation of Rgs4 mRNA by haloperidol has been previously reported (Taymans et al., 2004). Previous reports also showed that Rgs4 plays an important role in the regulation of dopamine D₂ receptor activities, including in response to antipsychotic drugs (D₂ antagonists) in both humans and animal models (Geurts et al., 2002; Taymans et al., 2004; Schwendt et al., 2006; Campbell et al., 2008; Min et al., 2012). Through D₂ receptor antagonism, antipsychotic drugs allow the removal of the tonic inhibition imposed by Gi/o on adenylate cyclase activity (Bowling and Santini, 2016). Downregulation of Rgs4 following acute haloperidol treatment may represent an adaptation to reduced Gi activity following D₂ receptor blockade. Rgs4 has been associated with movement disorders and the development of dyskinesia in the context of Parkinson's disease (Lerner and Kreitzer, 2012; Ko et al., 2014), whereas Rgs9 was associated with D₂ receptor internalization (Cerver et al., 2010). The G protein gamma 7 subunit (Gng7) is also modulated by haloperidol and Nur77 deficient rats. Interestingly, a recent report, using a selective knockout of the Gng7 subunit in striatal D₂ medium spiny neurons (Gng7^{fl/fl}D₂Cre⁺), showed an association between this G protein component and an increased locomotor activity (Brunori et al., 2021). This is consistent with the regulation of locomotor activity by D₂ antagonists. These results combined with modulations of other important components of G protein signaling suggest that a Nur77-dependent transcriptional program can regulate membrane receptors, including D₂ receptors, and coupling with G proteins.

Following analysis by Genecards GeneAnalytics, we have identified DARPP-32/cAMP and calcium-dependent signaling pathways as significant pathways modulated by haloperidol and Nur77. Amongst the important genes of these pathways, we found that soluble guanylate cyclase (Gucy) subunits were significantly modulated following haloperidol single dosing (see suppl.

Table S6). For example, Gucy1a3 mediates the postsynaptic effects of nitric oxide signaling and causes an increased phosphorylation of DARPP-32 at threonine residue 34 via cyclic guanosine monophosphate (cGMP) formation (Greengard et al., 1999; Meurers et al., 2009). Additionally, it has been previously reported that DARPP-32 phosphorylation is increased after treatment with haloperidol and risperidone (Wang et al., 2017). This suggests that modulations of the cGMP pathway by haloperidol may contribute to alter the state of phosphorylation of DARPP-32 in D2-MSN cells.

Additional transcript regulations may also participate in the adaptive events after dopamine D₂ receptor blockade. These modulations include alterations of transcripts from phosphodiesterases (Pde10a, Pde1b, Pde4d), which are involved in the regulation of cAMP levels, and diacylglycerol kinase, phospholipase A₂ and IP₃ receptor (Iptr1), which are associated with calcium-dependent signaling pathways, and various kinases (MAPK components, Cdk, Camk, Gsk3b, Prkc, Prkd, Akt) and phosphatase subunits (calcineurin Ppp3 subunit, and Ppp2, including Strn and Strip2) that have been associated with dopamine and/or glutamate signaling pathways (see table S6).

Although most of the transcripts modulated in the present paradigm (shortly after acute D₂ antagonist treatment) are consistent with cellular components associated with dopamine D₂ receptor or other GPCR expressed in D₂ MSN neurons, we cannot exclude the contribution of some transcripts that are also expressed or associated with other cell types. However, Adora2a, Gng7, Pde10a, Rgs4, Grp88 and Fosb transcript regulations have been specifically associated with the activity of the striatal D₂ receptor using mutant mice with a selective ablation of D₂ receptors in the medium spiny neurons of the indirect striatal output pathway (D2-iMSN) (Florio et al., 2022). Rapid adaptation of GPCR expressed in the striatum were also observed, like the

abundant striatal orphan GPCR 88 (Gpr88) and the cannabinoid CB₁ receptor (Cnr1), which is associated with both dopamine and glutamate modulation of synaptic plasticity (Gerdeman et al., 2002).

Modulations of multiple subunits of voltage-gated calcium channel transcripts were observed, including *Cacna1c*, *Cacna2d3*, *Cacna1e*, *Cacna2d1* and *Cacna2d3*, as well as potassium channels (Kcn), such as the inwardly rectifying potassium channel (Kcnj) subunits (GIRK), after haloperidol treatment in WT animals (see suppl. Table S6). This is consistent with previous reports showing coupling of D₂ receptors with these types of channels (Yan et al., 1997; Surmeier et al., 2009) and rapid changes in synaptic plasticity associated with dopamine D₂ receptor blockade (Tian et al., 2010). None of the calcium and potassium channels modulated by haloperidol in WT animals are significantly modulated in *Nur77*-deficient rats, whereas additional ion channels (downregulation of *Cacnb3*, *Kcnab1* and upregulation of *Kcnd3*) were modulated in *Nur77* deficient rats in saline condition. These differential modulations of ion channels may contribute to the blunted effect of rapid haloperidol-induced catalepsy previously observed in *Nur77* knockout mice (Ethier et al., 2004a). Of course, we cannot rule out the contribution of other signaling pathways, as previously observed in DARPP-32 mutant mice (Fienberg et al., 1998).

In conclusion, the present transcriptomic analysis revealed an underestimated effect of D₂ receptor antagonist treatment on the modulation of multiple components of GPCR-related intracellular signaling pathways, including regulatory components associated with receptor G protein signaling, receptor desensitization, protein kinases/phosphatases, that are consistent with the well-documented effect of D₂ receptor antagonists. Many haloperidol-induced modulations are absent, or decreased in *Nur77* deficient rats, suggesting that *Nur77* might, through the

regulation of a complex transcriptional program, modulate D₂ receptor coupling efficiency and responsiveness. Upregulation of Nur77 after an antipsychotic drug administration induces a complex transcriptional program that has a global impact on D₂ receptor signaling pathways. The present study also suggests that haloperidol may promote coupling with G protein-dependent pathways over G protein-independent pathways and that Nur77 deficiency may bias D₂ receptor signaling in favor of G protein-dependent signaling pathways. It also supports the contribution of elevated Dusp5 levels in the putamen in lowering the risk of developing tardive dyskinesia, which warrants further studies.

Acknowledgements

RNAseq and RT-qPCR experiments were performed in collaboration with the genomics platform of the Institute for Research on Immunology and Cancer (IRIC). We would like to thank Raphaëlle Lambert and Patrick Gendron from the IRIC platform for their assistance in the understanding of the statistical methods/techniques employed in the DESeq2 analysis.

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR, MOP-130407). S.M. held a Masters student fellowship from “Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQ-S)” and CIHR.

Figures

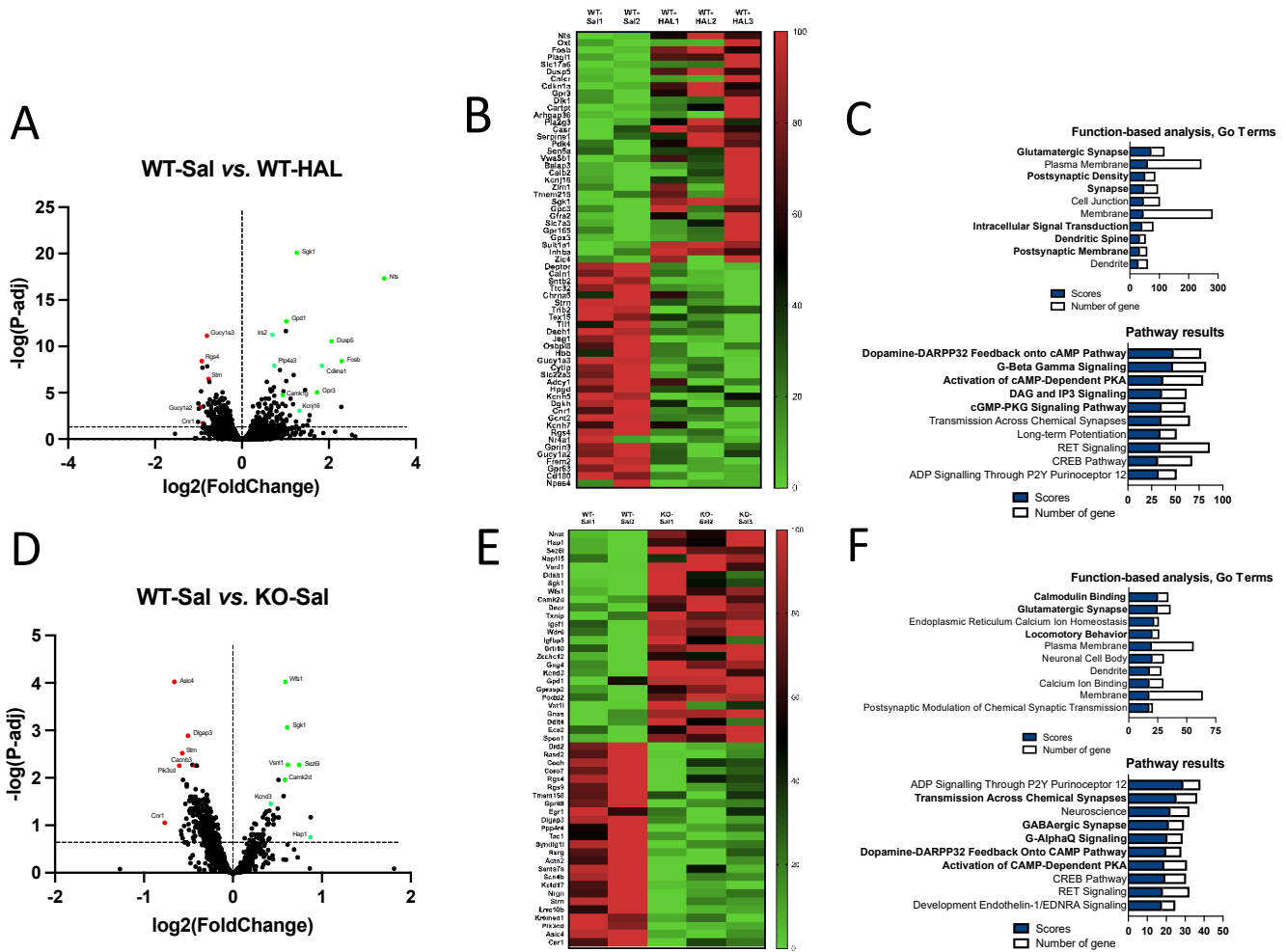
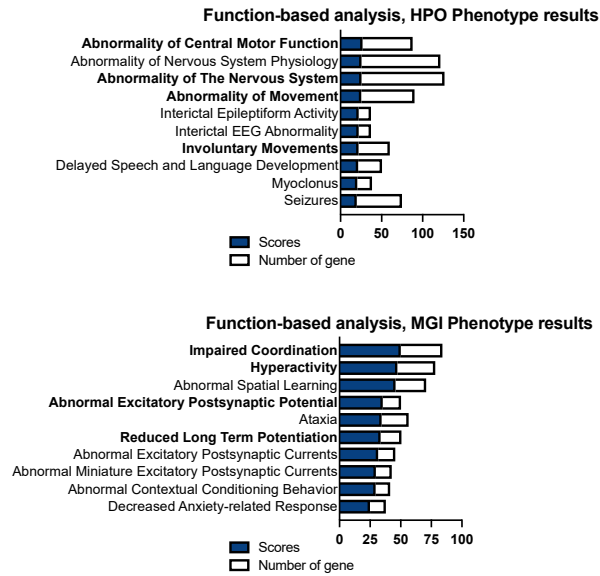
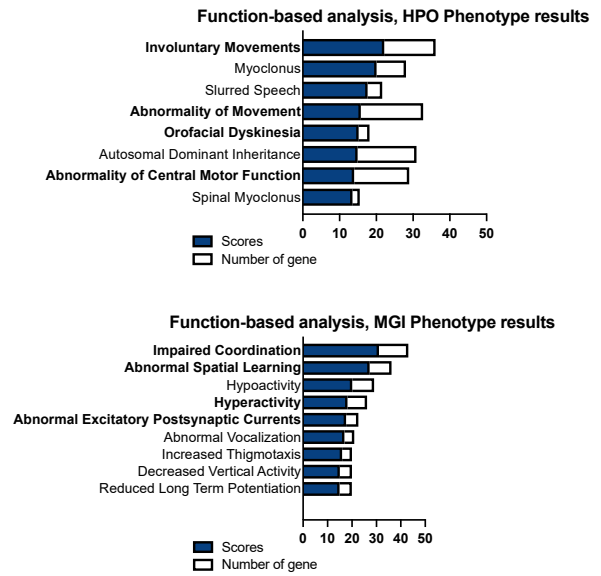


Figure 1. Transcriptomic data presentation and analysis.

(A,D) Volcano plots illustrating the modulated genes identified by RNAseq statistical analysis showing modulated transcripts as a function of their fold changes (Log₂) and statistical significance (-Log P-adj. values) for (A) the effect of haloperidol in wild type rats (WT-Sal vs. WT-HAL), and (D) in the comparison between wild type and Nur77 deficient rats treated with saline (WT-Sal vs. KO-Sal). Green dots represent some upregulated transcripts, whereas red dots represent some mRNAs that are downregulated (see Tables 1 and 2, and suppl. Table S2, for

more details). All modulated genes above the significance threshold (dot line) are statistically significant ($P\text{-adj.} \leq 0.05$). **(B, E)** Heatmaps of significantly modulated transcripts with the highest and lowest fold-changes (FC) normalized as a function of the percentage of the largest and smallest mean of read counts (0 to 100%) for each sample group. **(B)** Representation of the most up- and down-regulated transcripts ($P\text{-adj.} \leq 0.05$ and fold change ≥ 2.25 and ≤ 0.6) in each rat striatum following haloperidol administration in wild type rats (WT-Sal vs. WT-HAL). **(E)** Normalized transcript expression for the most up- and down-regulated transcripts ($P\text{-adj.} \leq 0.05$ and fold change ≥ 1.5 and ≤ 0.6) in wild type (WT) and Nur77 deficient rats following saline treatment (WT-Sal vs. KO-Sal). Similar transcriptomic data for the effect of haloperidol in Nur77 deficient rats (KO-Sal vs. KO-HAL) can be found in suppl. Figure S2. **(C, F)** Functional-based pathway analysis (GO Terms) and pathway results for **(C)** transcripts modulated by haloperidol in wild type animals (WT-Sal vs. WT-HAL) (gene set = 414) and **(F)** WT-Sal vs. KO-Sal (gene set = 71) comparisons. Histogram bars represent the top 10 results that are classified according to their scores of significances (blue portion) and the number of genes significantly regulated (white portion) from the GeneAnalytics tool (LifeMap Sciences) software. Additional details and a complete analysis can be found in suppl. Tables S3 and S4.

A**WT-Sal vs. WT-HAL**
(gene set = 414)**B****WT-Sal vs. KO-Sal**
(gene set = 71)**Figure 2. Functional-based analysis of RNAseq data sets.**

(A) Functional-based pathway analyses of the transcripts modulated by haloperidol in wild type animals (WT-Sal vs. WT-HAL) and (B) comparison of genotypes in saline conditions (WT-Sal vs. KO-Sal)($P\text{-adj.} \leq 0.05$), respectively. The analyses included Human phenotype ontology (HPO) classification results and mouse genome informatics (MGI) international database results. Histogram bars represent the top 10 results that are classified according to their scores of significances (blue portion) and the number of genes significantly regulated (white portion) from the GeneAnalytics tool (LifeMap Sciences) software. Additional information can be found in suppl. Tables S3 and S4.

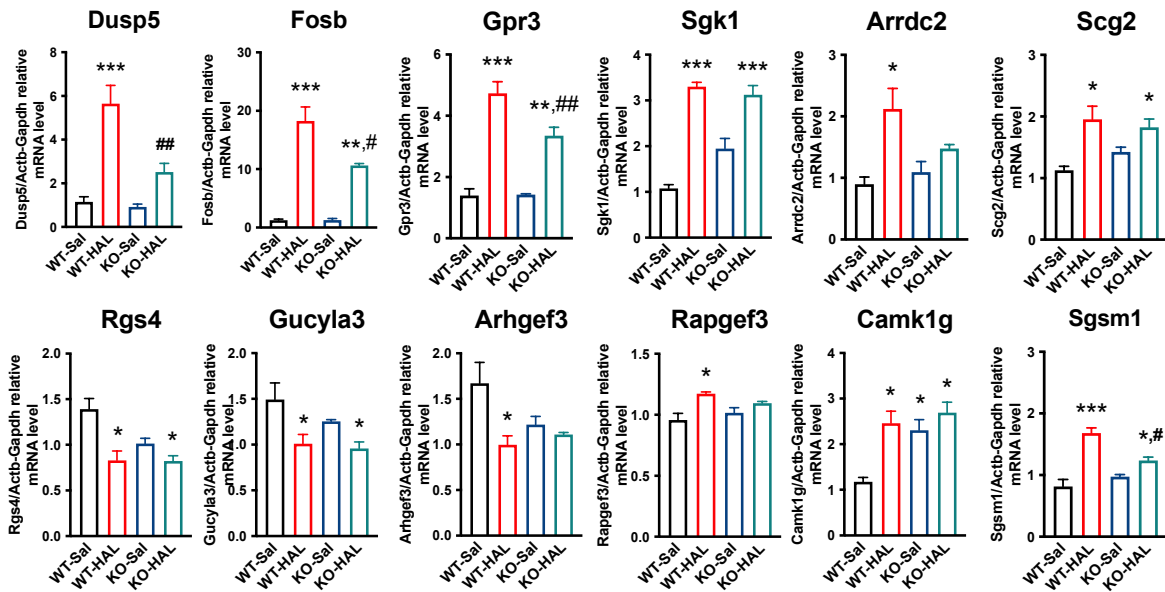


Figure 3. Validation of some dysregulated genes using quantitative RT-PCR analysis.

The histogram bars represent relative mRNA levels compared to housekeeping transcripts β -actin (Actb) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in samples from wild type rats treated with saline (WT-Sal) or haloperidol (WT-HAL) and Nur77 deficient rats treated with saline (KO-Sal) or haloperidol (KO-HAL) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. WT-Sal, and # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. WT-HAL).

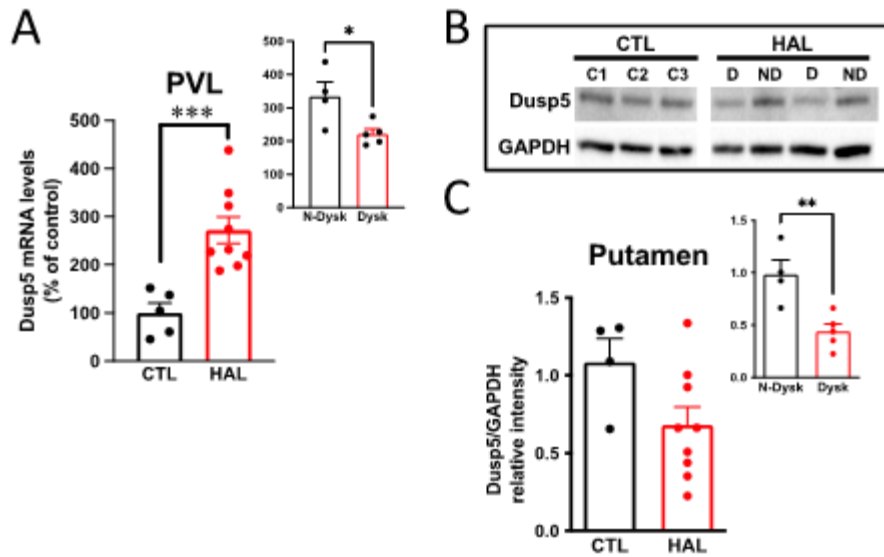


Figure 4. Modulation of Dual specificity phosphatase 5 (Dusp5) protein in a non-human primate model of tardive dyskinesia.

(A) Comparison of Dusp5 mRNA levels in the ventrolateral putamen (PVL) of control untreated monkeys (N=4) and monkeys chronically exposed to haloperidol (N=9). Histogram bars represent mean \pm SEM. **Inset.** Comparison of Dusp5 mRNA levels in the PVL of monkeys exposed to haloperidol displaying tardive dyskinesia (Dysk, N=5) or not (N-Dysk, N=4) (* $p < 0.05$ vs N-Dysk). Note that similar results were obtained in other putamen regions analyzed (PVM, PDL, PDM) (data not shown). **(B)** Example Western blot of Dusp5 protein signals, with the corresponding GAPDH housekeeping control. The letter “D” corresponds to dyskinetic animals, while the letters “ND” corresponds to non-dyskinetic animals. **(C)** Comparison of normalized Dusp5 protein levels relative to GAPDH housekeeping protein in the putamen of control untreated monkeys (N=4) and monkeys chronically exposed to haloperidol (N=9). Histogram bars represent mean \pm SEM. **Inset.** Comparison of Dusp5 relative protein levels in the putamen of monkeys exposed to haloperidol displaying tardive dyskinesia (Dysk, N=5) or not (N-Dysk, N=4) (** $p < 0.01$ vs. N-Dysk).

Supplementary Figures

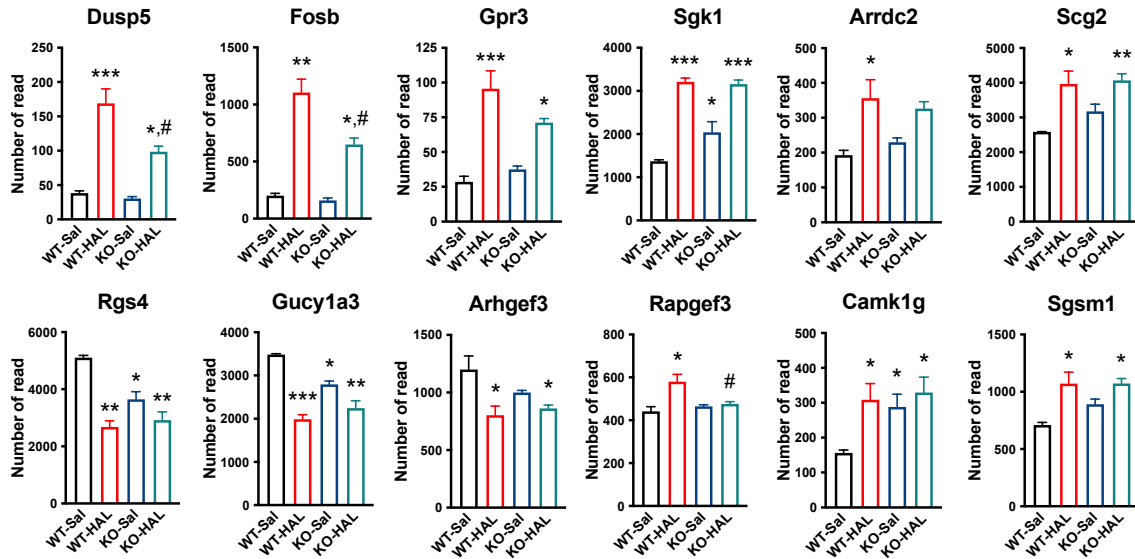


Figure S1. Individual transcript modulation of genes of interest from the RNAseq analysis.

The histogram bars represent number of reads of transcripts in samples from wild type rats treated with saline (WT-Sal) or haloperidol (WT-HAL) and Nur77 deficient rats treated with saline (KO-Sal) or haloperidol (KO-HAL). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. WT-Sal, and # $p < 0.05$ vs. WT-HAL) extracted from RNAseq data (see suppl. Table S2).

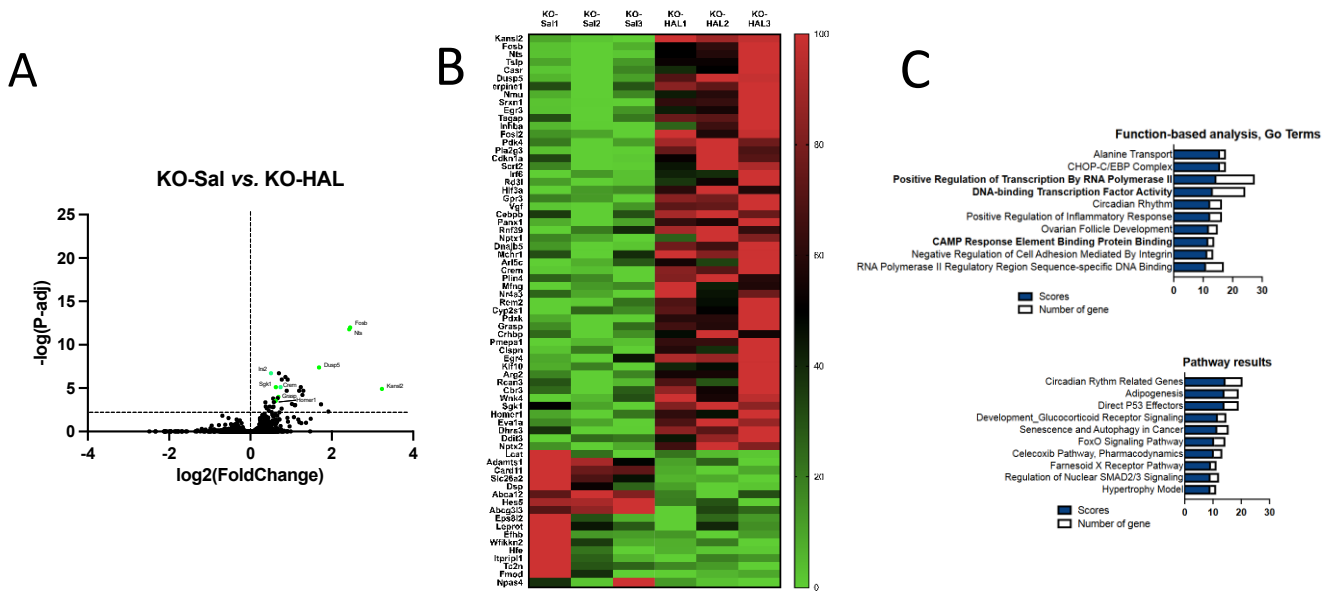


Figure S2. Transcriptomic data presentation and analysis (continued).

(A) Volcano plots illustrating the modulated genes identified by RNAseq statistical analysis showing modulated transcripts as a function of their fold changes (Log₂) and statistical significance (-Log P-adj. values) for the effect of haloperidol in Nur77 deficient rats (KO-Sal vs. KO-HAL). Green dots represent some upregulated transcripts, whereas red dots represent some mRNAs that are downregulated (see Table 3, and suppl. Table S2, for more details). All modulated genes above the significance threshold (dot line) are statistically significant (P-adj. ≤ 0.05). (B) Heatmaps of significantly modulated transcripts with the highest and lowest fold-changes (FC) normalized as a function of the percentage of the largest and smallest mean of read counts for each sample group. Representation of the most up- and down-regulated transcripts (P-adj. ≤ 0.05 and fold change ≥ 2.25 and ≤ 0.6) in each rat striatum following haloperidol administration in Nur77 deficient rats (KO-Sal vs. KO-HAL). (C) Functional-based pathway analysis (GO Terms) and pathway results for transcripts modulated by haloperidol in Nur77 deficient animals (KO-Sal vs. KO-HAL) comparisons (gene set = 66). Histogram bars represent

the top 10 results that are classified according to their scores of significances (blue portion) and the number of genes significantly regulated (white portion) from the GeneAnalytics tool (LifeMap Sciences) software. Additional details and complete analysis can be found in suppl. Table S5.

KO-Sal vs. KO-HAL
(gene set = 66)

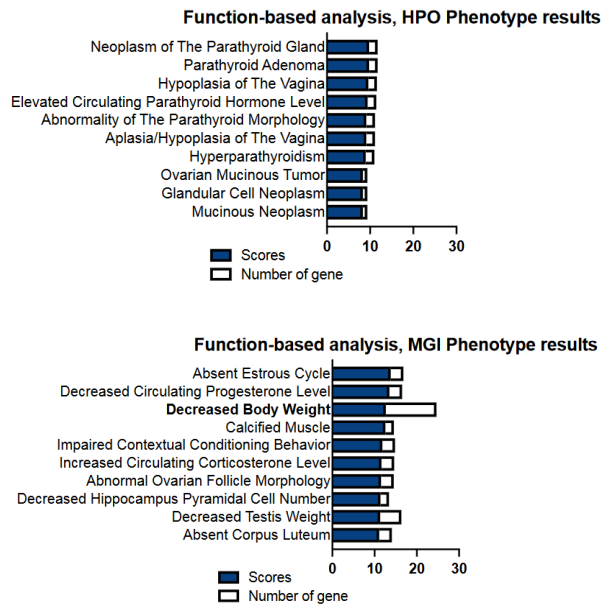
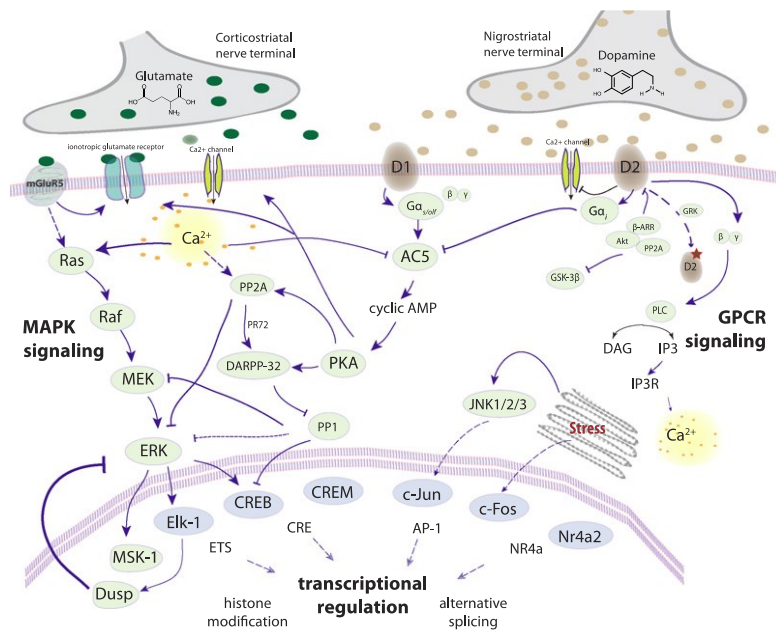


Figure S3. Functional-based analysis of RNA seq data set (continued).

Functional-based pathway analyses of the transcripts modulated by haloperidol in Nur77 deficient animals (KO-Sal vs. KO-HAL) ($P\text{-adj.} \leq 0.05$). The analyses included Human phenotype ontology (HPO) classification results and mouse genome informatics (MGI) international database results. Histogram bars represent the top 10 results that are classified according to their scores of significances (blue portion) and the number of genes significantly regulated (white portion) from the GeneAnalytics tool (LifeMap Sciences) software. Additional information can be found in suppl. Table S5.



Heiman et al., *PNAS*, 111: 4578-4583, 2014

8

Figure S4. Schematic illustration of signaling pathways and transcript components modulated in the present RNAseq analysis. (From Heiman et al., 2014)

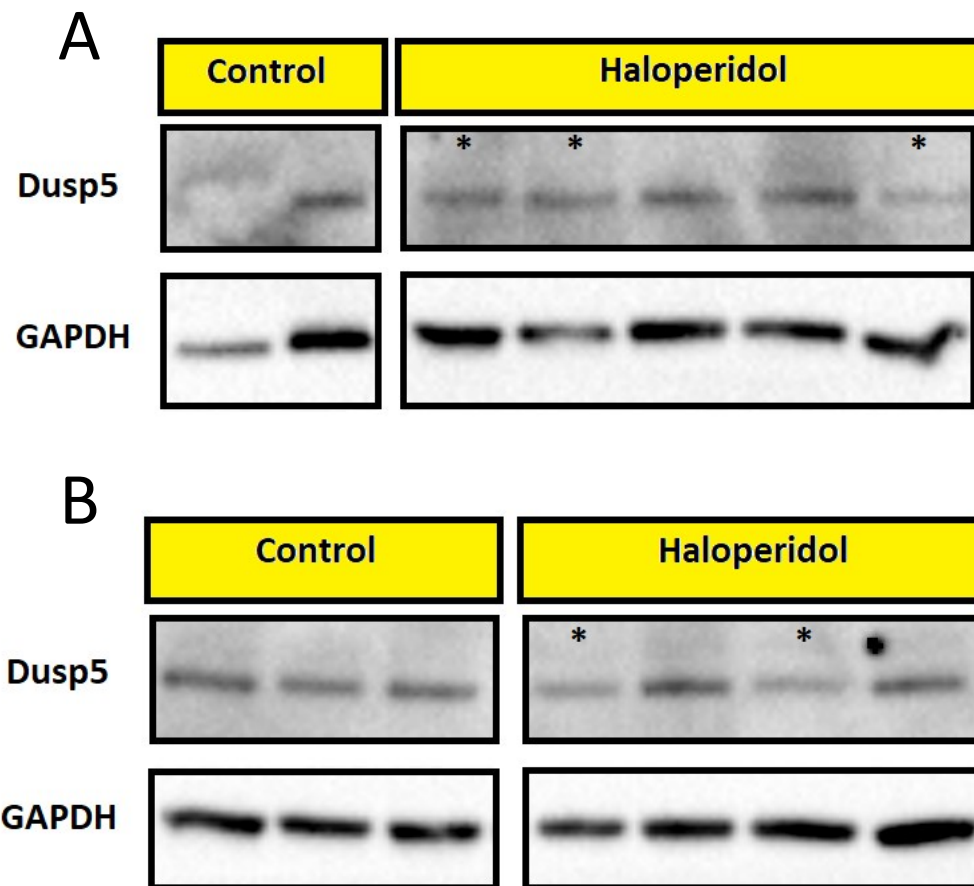


Figure S5. Western blot illustrations of Dusp5 signals from the putamen of control animals and animals treated with Haloperidol.

(A) Illustration of the Western blot signals for the first series of samples tested. GAPDH control bands were measured at the exposure time of 10 seconds and Dusp5 protein signals at the exposure time of 150 seconds. The first sample on the gel was excluded from the subsequent analysis due to the presence of an air bubble. Samples marked by an asterisk represent monkeys having developed dyskinesia. (B) Illustration of the Western blot signals for the second series of samples tested. GAPDH control bands were measured at the exposure time of 10 seconds and Dusp5 protein signals at the exposure time of 150 seconds. Samples marked by an asterisk represent monkeys having developed dyskinesia.

Tables

Table 1. Top 20 regulated transcripts in the comparison of WT-Sal vs. WT-HAL.

Gene Symbol	Fold Change	P-value	P-adj.	Gene Name
Up-regulated transcripts				
Nts*	9.67	7.99E-22	4.65E-18	Neurotensin
Fosb*	4.90	2.81E-12	3.88E-09	FosB Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit
Plagl1*	4.87	2.39E-06	0.000343402	PLAG1 Like Zinc Finger 1
Dusp5*	4.16	1.69E-14	2.81E-11	Dual Specificity Phosphatase 5
Cdkn1a*	3.58	1.05E-11	1.22E-08	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A
Gpr3*	3.31	2.53E-08	8.92E-06	G Protein-Coupled Receptor 3
Pla2g3*	2.94	3.37E-05	0.002705738	Phospholipase A2 Group III
Casr*	2.89	0.000189404	0.009807433	Calcium Sensing Receptor
Serpine1*	2.82	0.000899895	0.030207441	Serpin Family E Member 1
Pdk4*	2.73	1.06E-08	4.94E-06	Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4
Vwa5b1*	2.65	0.001121447	0.035592941	Von Willebrand Factor A Domain Containing 5B1
Kcnj16*	2.49	7.77E-06	0.000905391	Potassium Inwardly Rectifying

				Channel Subfamily J Member 16
Sgk1*	2.39	6.82E-25	7.94E-21	Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase 1
Gpc3*	2.38	0.001350994	0.040453411	Glypican 3
Gfra2*	2.36	0.000271427	0.012748328	GDNF Family Receptor Alpha 2
Sult1a1*	2.27	1.81E-10	1.24E-07	Sulfotransferase Family 1A Member 1
Inhba*	2.25	9.59E-07	0.000171846	Inhibin Subunit Beta A
Dhrs3*	2.17	1.56E-07	4.34E-05	Dehydrogenase/Reductase 3
Cebpb*	2.14	3.59E-05	0.002825078	CCAAT Enhancer Binding Protein Beta
Gpd1*	2.03	5.08E-17	1.97E-13	Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1
Down-regulated transcripts				
Cd180*	0.49	0.000307709	0.013732554	CD180 Molecule
Gpr63*	0.49	7.40E-07	0.00014605	G Protein-Coupled Receptor 63
Frem2*	0.50	3.84E-06	0.000514495	FRAS1 Related Extracellular Matrix 2
Gucy1a2*	0.51	2.50E-06	0.000355736	Guanylate Cyclase 1 Soluble Subunit Alpha 2
Gprin3*	0.52	1.79E-08	6.96E-06	G protein-regulated inducer of neurite

				outgrowth (GPRIN) Family Member 3
Rgs4*	0.52	3.00E-12	3.88E-09	Regulator of G Protein Signaling 4
Gcnt2*	0.53	2.27E-11	2.03E-08	Glucosaminyl (N-Acetyl) Transferase 2 (I Blood Group)
Cnr1*	0.53	0.000466323	0.018730104	Cannabinoid Receptor 1
Dgkh*	0.54	2.14E-06	0.000315056	Diacylglycerol Kinase Eta
Slc22a3*	0.56	1.12E-05	0.001187567	Solute Carrier Family 22 Member 3
Gucy1a3*	0.57	3.82E-15	7.42E-12	Guanylate Cyclase 1 Soluble Subunit Alpha 3
Osbpl8*	0.57	1.46E-11	1.42E-08	Oxysterol Binding Protein Like 8
Jag1*	0.57	1.12E-05	0.001187567	Jagged Canonical Notch Ligand 1
Dach1*	0.58	6.48E-07	0.000134876	Dachshund Family Transcription Factor 1
Tex15*	0.58	3.52E-05	0.00279081	Testis Expressed 15, Meiosis and Synapsis Associated
Trib2*	0.58	1.10E-06	0.000194888	Tribbles Pseudokinase 2
Strn*	0.58	5.40E-10	3.31E-07	Striatin (Protein Phosphatase 2 Regulatory Subunit 6 alpha, PPP2R6A, calmodulin binding protein)

Caln1*	0.59	1.25E-09	6.62E-07	Calneuron 1 (calcium binding protein 8)
Deptor*	0.59	2.04E-07	5.25E-05	DEP Domain Containing MTOR Interacting Protein
Acvr1c*	0.60	1.25E-05	0.001269958	Activin A Receptor Type 1C

Transcripts in bold and with an asterisk (*) represent statistically significantly modulated genes once adjustments for multiples comparisons were performed (P-adj.). A complete list of significantly regulated (P-adj.) transcripts can be found in supplementary Table S2.

Table 2. Top 20 regulated transcripts in the comparison of WT-Sal vs. KO-Sal.

Gene Symbol	Fold Change	P-value	P-adj.	Gene Name
Up-regulated transcripts				
Sez6l*	1.67	8.08E-06	0.00532665	Seizure Related 6 Homolog Like
Vsnl1*	1.53	1.06E-05	0.00532665	Visinin Like 1
Sgk1*	1.52	6.44E-07	0.000866407	Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase 1
Wfs1*	1.50	4.70E-08	9.49E-05	Wolframin ER Transmembrane Glycoprotein
Camk2d*	1.50	3.50E-05	0.011093323	Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase II Delta
Dner*	1.48	0.000126744	0.024364937	Delta/Notch Like EGF Repeat Containing
Igsf1*	1.42	3.72E-05	0.011093323	Immunoglobulin Superfamily Member 1
Wdr6*	1.41	0.00067478	0.044657154	WD Repeat Domain 6
Kcnd3*	1.34	0.000437138	0.035456541	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily D Member 3
Gpd1*	1.32	0.00081732	0.04943677	Glycerol-3-Phosphate

				Dehydrogenase 1
Nnat	1.83	0.001622232	0.067741158	Neuronatin
Hap1	1.83	0.010663135	0.177880484	Huntingtin Associated Protein 1
Nap15	1.60	0.038847938	0.322693675	Nucleosome Assembly Protein 1 Like 5
Ddah1	1.53	0.024927061	0.254478481	Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase 1
Txnip	1.42	0.001700736	0.068658699	Thioredoxin Interacting Protein
Igfbp5	1.38	0.001718674	0.068695925	Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 5
Grb10	1.37	0.003275604	0.096009914	Growth Factor Receptor Bound Protein 10
Zcchc12	1.36	0.002168524	0.075916365	Zinc Finger CCHC-Type Containing 12
Gng4	1.36	0.001288251	0.061184348	G Protein Subunit Gamma 4
Gprasp2	1.32	0.002939212	0.091660485	G Protein-Coupled Receptor Associated Sorting Protein 2
Down-regulated transcripts				
Asic4*	0.63	2.54E-08	9.49E-05	Acid Sensing Ion Channel Subunit Family Member 4

Pik3cd*	0.65	1.27E-05	0.005568542	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Delta
Strn*	0.67	3.75E-06	0.00303128	Striatin (Protein Phosphatase 2 Regulatory Subunit 6 alpha, PPP2R6A, calmodulin binding protein)
Kctd17*	0.67	3.85E-05	0.011093323	Potassium Channel Tetramerization Domain Containing 17
Actn2*	0.69	0.000409229	0.035150193	Actinin Alpha 2
Syndig1*	0.69	5.08E-05	0.013665636	Synapse Differentiation Inducing 1 Like
Ppp4r4*	0.69	6.02E-05	0.01517705	Protein Phosphatase 4 Regulatory Subunit 4
Dlgap3*	0.70	1.29E-06	0.001305392	DLG Associated Protein 3
Tmem158*	0.71	0.000788491	0.048971367	Transmembrane Protein 158
Rgs9*	0.71	0.000286126	0.030415189	Regulator of G Protein Signaling 9
Rgs4*	0.71	0.000263959	0.030415189	Regulator of G Protein Signaling 4
Coro7*	0.71	0.000305375	0.030415189	Coronin 7
Rasd2*	0.71	0.000146955	0.025011931	RASD Family Member 2

Drd2*	0.71	0.000608918	0.044657154	Dopamine Receptor D2
Mtcl1*	0.72	0.000754906	0.048373924	Microtubule Crosslinking Factor 1
Syt12*	0.72	0.000148696	0.025011931	Synaptotagmin 12
Zfp365*	0.72	1.00E-05	0.00532665	Zinc Finger Protein 365
Pde10a*	0.73	0.00063549	0.044657154	Phosphodiesterase 10A
Smpd3*	0.73	0.000776977	0.048971367	Sphingomyelin Phosphodiesterase 3
Pcp4*	0.73	0.000316432	0.030415189	Purkinje Cell Protein 4

Transcripts in bold and with an asterisk (*) represent statistically significantly modulated genes once adjustments for multiples comparisons were performed (P-adj.). A complete list of significantly regulated (P-adj.) transcripts can be found in supplementary Table S2.

Table 3. Top 20 regulated transcripts in the comparison of KO-Sal vs. KO-HAL.

Gene Symbol	Fold Change	P-value	P-adj.	Gene Name
Up-regulated transcripts				
Kansl2*	9.41	1.19E-08	1.23E-05	KAT8 Regulatory NSL Complex Subunit 2
Fosb*	5.47	8.20E-17	1.02E-12	FosB Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit
Nts*	5.37	2.60E-16	1.62E-12	Neurotensin
Tslp*	3.78	1.34E-05	0.004895713	Thymic Stromal Lymphopoietin
Casr*	3.33	1.41E-06	0.000731318	Calcium Sensing Receptor
Dusp5*	3.21	9.92E-12	4.12E-08	Dual Specificity Phosphatase 5
Serpine1*	2.79	0.000155691	0.034613383	Serpin Family E Member 1
Srxn1*	2.46	2.44E-08	2.02E-05	Sulfiredoxin 1
Egr3*	2.42	7.87E-08	6.12E-05	Early Growth Response 3
Inhba*	2.35	6.57E-09	7.76E-06	Inhibin Subunit Beta A
Pdk4*	2.29	2.39E-08	2.02E-05	Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4
Pla2g3*	2.25	0.000194666	0.040393127	Phospholipase A2 Group III
Cdkn1a*	2.14	1.79E-06	0.000890204	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A

Scrt2*	2.13	1.97E-06	0.000942947	Scratch Family Transcriptional Repressor 2
Irf6*	2.10	8.36E-05	0.02167297	Interferon Regulatory Factor 6
Rd3l*	2.02	1.22E-06	0.000658937	RD3 Like
Vgf*	1.88	6.66E-10	1.04E-06	VGF Nerve Growth Factor Inducible
Cebpb*	1.87	0.000107799	0.026315709	CCAAT Enhancer Binding Protein Beta
Panx1*	1.85	2.15E-08	2.02E-05	Pannexin 1
Dnajb5*	1.70	6.01E-10	1.04E-06	DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member B5
Down-regulated transcripts				
Trib2*	0.68	0.000119588	0.028091824	Tribbles Pseudokinase 2
Armcx2*	0.79	0.000207533	0.040898602	Armadillo Repeat Containing X-Linked 2
Npas4	0.39	0.031079688	0.871491238	Neuronal PAS Domain Protein 4
Fmod	0.40	0.019993601	0.727837217	Fibromodulin
Tc2n	0.43	0.008277767	0.502015578	Tandem C2 Domains, Nuclear
Itpril1	0.44	0.032242792	0.874559397	ITPRIP Like 1
Hfe	0.44	0.020588657	0.745141817	Homeostatic Iron Regulator

Wfikkn2	0.44	0.043408156	0.986849578	WAP, Follistatin/Kazal, Immunoglobulin, Kunitz and Netrin Domain Containing 2
Efhb	0.48	0.046339052	0.993299614	EF-Hand Domain Family Member B
Leprot	0.50	0.024655729	0.79721182	Leptin Receptor Overlapping Transcript
Eps8l2	0.50	0.046197323	0.993299614	EPS8 Like 2
Abcg3l3	0.50	0.006043402	0.43241584	ATP-binding cassette, subfamily G (WHITE), member 3-like 3
Hes5	0.51	0.002167534	0.210826536	Hes Family BHLH Transcription Factor 5
Abca12	0.53	0.01058372	0.583584531	ATP Binding Cassette Subfamily A Member 12
Dsp	0.54	0.012450505	0.605503082	Desmoplakin
Slc26a2	0.55	0.018679863	0.70688234	Solute Carrier Family 26 Member 2
Card11	0.57	0.019911273	0.727837217	Caspase Recruitment Domain Family Member 11
Adamts1	0.58	0.00180067	0.185275596	ADAM Metallopeptidase with Thrombospondin Type 1 Motif 1
Lcat	0.58	0.039375421	0.947773931	Lecithin-Cholesterol Acyltransferase
Slc12a7	0.60	0.018557992	0.705441881	Solute Carrier Family 12 Member 7

Transcripts in bold and with an asterisk (*) represent statistically significantly modulated genes once adjustments for multiples comparisons were performed (P-adj.). A complete list of significantly regulated (P-adj.) transcripts can be found in supplementary Table S2.

Table 4. Top 20 regulated transcripts in the comparison of WT-HAL vs. KO-HAL.

Gene Symbol	Fold Change	P-value	P-adj.	Gene Name
Up-regulated transcripts				
Kansl2*	8.84	3.49E-08	0.000247156	KAT8 Regulatory NSL Complex Subunit 2
Izumo1	7.62	0.032724329	0.9999982	Izumo Sperm-Egg Fusion 1
Mgarp	3.51	0.035032298	0.9999982	Mitochondria Localized Glutamic Acid Rich Protein
Cyp11a1	3.51	0.029479204	0.9999982	Cytochrome P450 Family 11 Subfamily A Member 1
Ppm1j	3.24	0.046692175	0.9999982	Protein Phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ Dependent 1J
Ifnlr1	2.04	0.03737447	0.9999982	Interferon Lambda Receptor 1
Kcnh5	1.90	0.000480257	0.9999982	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily H Member 5
Ar	1.87	0.008339017	0.9999982	Androgen Receptor
Mc4r	1.64	0.015394658	0.9999982	Melanocortin 4 Receptor
Rora	1.58	0.03241342	0.9999982	RAR Related Orphan Receptor A
Gipc2	1.56	0.049513934	0.9999982	GIPC PDZ Domain Containing Family

				Member 2
Cdkl4	1.54	0.049479551	0.9999982	Cyclin Dependent Kinase 14
Kcnh7	1.49	0.03025903	0.9999982	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily H Member 7
Ksr1	1.44	0.009471719	0.9999982	Kinase Suppressor of Ras 1
Grin2a	1.41	0.001443747	0.9999982	Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 2A
Cbl	1.40	0.016075302	0.9999982	Cbl Proto-Oncogene
Gpr153	1.36	0.027190337	0.9999982	G Protein-Coupled Receptor 153
Taf4b	1.35	0.024065159	0.9999982	TATA-Box Binding Protein Associated Factor 4b
Tmem56	1.33	0.02607846	0.9999982	Transmembrane Protein 56
Ghr	1.31	0.018351619	0.9999982	Growth Hormone Receptor
Down-regulated transcripts				
Pemt	0.34	0.017316313	0.9999982	Phosphatidylethanolamine N- Methyltransferase
Pik3c2g	0.39	0.045021435	0.9999982	Phosphatidylinositol-4-Phosphate 3- Kinase Catalytic Subunit Type 2 Gamma

Clec12a	0.44	0.04971104	0.9999982	C-Type Lectin Domain Family 12 Member A
Mboat1	0.47	0.047244259	0.9999982	Membrane Bound O-Acyltransferase Domain Containing 1
Six5	0.47	0.028751275	0.9999982	SIX Homeobox 5
Capg	0.51	0.032399464	0.9999982	Capping Actin Protein, Gelsolin Like
Abcg3l3	0.51	0.008833545	0.9999982	ATP-binding cassette, subfamily G (WHITE), member 3-like 3
Lrrc32	0.52	0.046058506	0.9999982	Leucine Rich Repeat Containing 32
Srpx	0.53	0.047785336	0.9999982	Sushi Repeat Containing Protein X- Linked
Dusp5	0.58	0.000234938	0.636096422	Dual Specificity Phosphatase 5
Eno3	0.59	0.004863499	0.9999982	Enolase 3
Hes5	0.59	0.017993381	0.9999982	Hes Family BHLH Transcription Factor 5
Tap1	0.59	0.029222819	0.9999982	Transporter 1, ATP Binding Cassette Subfamily B Member
Bcl2l11	0.60	0.037405173	0.9999982	BCL2 Like 11
Clec14a	0.61	0.019927134	0.9999982	C-Type Lectin Domain Containing 14A

Casp4	0.62	0.006531122	0.9999982	Caspase 4
Slc27a6	0.63	0.012693355	0.9999982	Solute Carrier Family 27 Member 6
Pcdhb11	0.64	0.04452371	0.9999982	Protocadherin Beta 11
Mettl8	0.66	0.042747382	0.9999982	Methyltransferase 8, Methylcytidine
Apoc1	0.67	0.049577575	0.9999982	Apolipoprotein C1

Transcripts in bold and with an asterisk (*) represent statistically significantly modulated genes once adjustments for multiples comparisons were performed (P-adj.). A complete list of significantly regulated (P-adj.) transcripts can be found in supplementary Table S2.

Table 5. Effect of haloperidol on Dual-specificity phosphatase (Dusp) transcript isoforms expressed in the wild-type rat striatum.

Transcript isoform	Read count		Fold change	P value (non-adj)
	WT-Sal	WT-HAL		
Dusp1	287 ± 33	373 ± 35*	1.30	0.039
Dusp3 [†]	3341 ± 54	3524 ± 40	1.05	0.440
Dusp4	145 ± 14	210 ± 8**	1.45	0.0038
Dusp5	41 ± 4	171 ± 21***	4.17	1.69 x 10 ⁻¹⁴
Dusp6	196 ± 33	133 ± 11*	0.68	0.0039
Dusp7 [†]	672 ± 63	614 ± 29	0.92	0.250
Dusp10	52 ± 11	75 ± 1*	1.46	0.042
Dusp14 [†]	118 ± 4	132 ± 8	1.12	0.973
Dusp26	415 ± 4	505 ± 42*	1.21	0.029

[†] Not significantly modulated by Haloperidol (HAL).

* p < 0.05, ** p < 0.01 or *** p < 0.001 vs. WT-Sal (saline).

Supplementary tables

Table S1. Sets of primers for transcripts validated by RT-qPCR.

Gene	FWD oligo	REV oligo	RefSeq	Efficiency (%)
Sgk1	gggctgtcttgatgagatgc	gtgccttgctgagttggtg	NM_001193568.1	90
Dusp5	gaagctcgaagggtgaaagagg	ggaaggaaggattcaactg	NM_133578.1	105
Rgs4	caagatgtgcaaaggactcg	tcccagccgatgtttcata	NM_017214.1	105
Gucy1a3	gctctcagtggtcacctctgc	ctccgatggtctccacctt	NM_017090.2	104
Gpr3	cctacaggcccagctacact	gagatgcacagcaccacatc	NM_153727.1	102
Scg2	agaaaccaaagggtggtg	tccgggatgtcatctaggtc	NM_022669.1	95
Rapgef3	gccccataaagtacggaagc	atcggtagactcgggtggtc	NM_021690.1	109
Arrdc2	ttgcctgtctccaggagtt	ctccgagggtgggttagg	NM_001107303.1	96
Arhgef3	tgtcaagagggcaaactgc	ttgaccctttgttactaggtcc	NM_001106061.1	100
Camk1g	tgagattgctgtgtgaaaagg	gaccaggtagtagtgggtggtg	NM_182842.1	102
Sgsm1	gcaccgtgaagaaggaggt	ctgtcctcatggacgaacttt	NM_001105937.2	102
Fosb	gactccttcggcagtccac	tcctggctggtgtgattg	NM_001256509.1	103
Actb	cccgcgagtacaaccttct	cgtcacatcatggcgaact	NM_031144	98
Gapdh	ccctcaagattgtcagcaatg	agttgtcatggatgaccttg	NM_017008.3	97

Table S2. Transcripts significantly modulated in the WT-Sal vs. WT-HAL, WT-Sal vs. KO-Sal, KO-Sal vs. KO-HAL and WT-HAL vs. KO-HAL comparisons (refer to the Annex section for a link to the Excel file). List of transcripts significantly modulated ($p\text{-adj.} \leq 0.05$) and classified according to their fold-change (upregulated transcripts are highlighted in yellow).

Table S3. GeneAnalytics Results with the WT-Sal vs. WT-HAL comparison (refer to the Annex section for a link to the Excel file).

Table S4. GeneAnalytics Results with the WT-Sal vs. KO-Sal comparison (refer to the Annex section for a link to the Excel file).

Table S5. GeneAnalytics Results with the KO-Sal vs. KO-HAL comparison (refer to the Annex section for a link to the Excel file).

For Tables S3, S4 and S5: Genecards GeneAnalytics[®] tool was used to analyze and group significantly modulated genes as a function of associated pathways and diseases. Each associated pathway or disease phenotype was allotted a matching score representative of the weighted sum of each of the individual matching scores of the matched genes, normalized to the log of the maximal score that can be achieved in that specific pathway or disease. Each analysis report includes gene set, Tissues & Cells, Diseases, Pathways, GO Terms, HPO Phenotypes, MGI Phenotypes and Compounds classifications. Note that GeneAnalytics analysis was not performed with WT-HAL vs. KO-HAL comparison because the number of significantly regulated transcripts was too low.

Table S6. Summary of transcripts associated with G protein pathways modulated by Haloperidol.

Gene	Fold Change	P-adj.	Name
G protein components			
Gng4	1.37	0.035	G Protein Subunit Gamma 4
Gng7	0.76	0.0083	G Protein Subunit Gamma 7
Gnao1	0.82	0.0088	G Protein Subunit Alpha O1
Gnas	1.84	0.031	G Protein Subunit Alpha S
Rgs4	0.52	3.88×10^{-9}	Regulator of G protein signaling 4
Rgs7bp	0.75	0.0394	Regulator of G protein signaling 7 binding protein
Rasgrp1	0.66	3.37×10^{-7}	RAS Guanyl releasing protein 1
Syngap1	0.81	0.025	Synaptic RAS GTPase Activating protein 1
Rapgef3	1.32	0.018	Rap guanine nucleotide exchange factor 3
Arhgef3	0.63	9.97×10^{-5}	Rho guanine nucleotide exchange factor 3
Gucy1a2	0.51	0.00036	Guanylate cyclase 1 soluble subunit alpha 2
Gucy1a3	0.57	7.42×10^{-12}	Guanylate cyclase 1 soluble subunit alpha 3
Gucy1b3	0.82	0.0347	Guanylate cyclase 1 soluble subunit beta 3

Gprin3	0.52	6.96x10 ⁻⁶	G protein-inducer for neurite outgrowth member 3
Sgsm1	1.48	0.00048	Small G protein signaling modulator 1
Second messengers			
Crem	1.58	0.00052	cAMP responsive element modulator
Pde10a	0.63	9.79x10 ⁻⁵	Phosphodiesterase 10A
Pde1b	0.74	0.0039	Phosphodiesterase 1B
Pde4d	0.66	0.0048	Phosphodiesterase 4D
Pla2g3	2.94	0.0027	Phospholipase A2 group III
Dgkb	0.72	0.0012	Diacylglycerol kinase beta
Dgkh	0.54	0.00032	Diacylglycerol kinase eta
Dgki	0.71	0.00015	Diacylglycerol kinase iota
Itpr1	0.68	0.00011	Inositol 1,4,5-triphosphate receptor type 1
Phosphatases			
Dusp5*	4.16	2.81x10 ⁻¹¹	Dual Specificity Phosphatase 5
Strn (Ppp2r6a)	0.59	3.31x10 ⁻⁷	Striatin (protein phosphatase 2 regulatory subunit 6 α , calmodulin binding protein)
Strip2	0.73	0.0163	Striatin interacting protein 2
Ppp2r5c	0.83	0.0098	Protein Phosphatase 2 Regulatory Subunit B γ

Ppp3cb	0.82	0.0058	Protein Phosphatase 3 Catalytic Subunit B
Ppp2r2a	0.69	0.001	Protein Phosphatase 2 Regulatory Subunit B α
Ppp1r9a	0.68	0.00061	Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 9A
Ptp4a3	1.68	1.22x10 ⁻⁸	Protein Tyrosine Phosphatase 4A3
Ptpdc1	1.67	2.57x10 ⁻⁶	Protein tyrosine phosphatase domain containing 1
Ptprt	0.72	0.0315	Protein tyrosine phosphatase receptor type T
Kinases			
Mapk1	0.76	0.00023	Mitogen-activate protein kinase 1
Map3k4	1.31	0.0384	Mitogen-activate protein kinase kinase 4
Mast1	1.74	0.0101	Microtubule-associated serine/threonine kinase 1
Cdkn1a	3.58	1.22x10 ⁻⁸	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A
Sgk1	2.39	7.94x10 ⁻²¹	Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase 1
Pdpk1	0.74	0.0066	3-Phosphoinositide Dependent Protein Kinase 1
Camk1g	1.94	1.84x10 ⁻⁵	Calcium/calmodulin dependent protein kinase 1 gamma
Camk2a	0.80	0.0156	Calcium/calmodulin dependent protein kinase 2 alpha
Camk4	0.74	0.0359	Calcium/calmodulin dependent protein kinase 4
Gsk3b	0.74	0.0231	Glycogen synthase kinase 3 beta

Prkd1	0.73	0.0388	Protein kinase D1
Prkcb	0.76	0.0029	Protein kinase C beta
Prkce	0.77	0.0016	Protein kinase C epsilon
Akt3	0.71	0.0089	Akt Serine/Threonine Kinase 3
Channels			
Cacna1c	0.78	0.0452	Calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C
Cacna1e	0.71	0.0024	Calcium voltage-gated channel subunit alpha1 E
Cacna2d1	0.70	6.07×10^{-5}	Calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha2delta 1
Cacna2d3	0.71	0.0025	Calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha2delta 3
Kcnj2	0.69	0.0216	Potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 2
Kcnj16	2.50	0.00091	Potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 16
Kcnab1	0.71	0.0025	Potassium voltage-gated channel subfamily A member regulatory beta subunit 1
Kcnd3	1.32	0.0307	Potassium voltage-gated channel subfamily D member 3

Kcnk2	0.72	0.0234	Potassium two pore domain channel subfamily K member 2
Kcnq3	0.63	0.0012	Potassium voltage-gated channel subfamily Q member 3
Kcnv1	0.67	0.0047	Potassium voltage-gated channel modifier subfamily V member 1

* See also modulations of other Dusp isoforms in Table 5.

References

- Ahlers-Dannen KE, Spicer MM and Fisher RA (2020) RGS Proteins as Critical Regulators of Motor Function and Their Implications in Parkinson's Disease. *Mol Pharmacol* **98**:730-738.
- Andersson M, Hilbertson A and Cenci MA (1999) Striatal fosB expression is causally linked with L-DOPA-induced abnormal involuntary movements and the associated upregulation of striatal prodynorphin mRNA in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* **6**:461-474.
- Beaudry G, Langlois M-C, Weppe I, Rouillard C and Lévesque D (2000) Contrasting patterns and cellular specificity of transcriptional regulation of the nuclear receptor nerve growth factor-inducible B by haloperidol and clozapine in the rat forebrain. *J Neurochem* **75**:1694-1702.
- Beaulieu JM, Gainetdinov RR and Caron MG (2009) Akt/GSK3 signaling in the action of psychotropic drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **49**:327-347.
- Beaulieu JM, Sotnikova TD, Marion S, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR and Caron MG (2005) An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell* **122**:261-273.
- Bolger AM, Lohse M and Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**:2114-2120.
- Bowling H and Santini E (2016) Unlocking the molecular mechanisms of antipsychotics - a new frontier for discovery. *Swiss Med Wkly* **146**:w14314.

- Brunori G, Pelletier OB, Stauffer AM and Robishaw JD (2021) Selective Manipulation of G-Protein $\gamma(7)$ Subunit in Mice Provides New Insights into Striatal Control of Motor Behavior. *J Neurosci* **41**:9065-9081.
- Campbell DB, Ebert PJ, Skelly T, Stroup TS, Lieberman J, Levitt P and Sullivan PF (2008) Ethnic stratification of the association of RGS4 variants with antipsychotic treatment response in schizophrenia. *Biol Psychiatry* **63**:32-41.
- Campos-Melo D, Galleguillos D, Sanchez N, Gysling K and Andres ME (2013) Nur transcription factors in stress and addiction. *Front Mol Neurosci* **6**:44.
- Carbon M, Kane JM, Leucht S and Correll CU (2018) Tardive dyskinesia risk with first- and second-generation antipsychotics in comparative randomized controlled trials: a meta-analysis. *World Psychiatry* **17**:330-340.
- Celver J, Sharma M and Kovoov A (2010) RGS9-2 mediates specific inhibition of agonist-induced internalization of D2-dopamine receptors. *J Neurochem* **114**:739-749.
- Chong VZ, Young LT and Mishra RK (2002) cDNA array reveals differential gene expression following chronic neuroleptic administration: implications of synapsin II in haloperidol treatment. *J Neurochem* **82**:1533-1539.
- Crittenden JR, Gipson TA, Smith AC, Bowden HA, Yildirim F, Fischer KB, Yim M, Housman DE and Graybiel AM (2021) Striatal transcriptome changes linked to drug-induced repetitive behaviors. *Eur J Neurosci* **53**:2450-2468.
- de Bartolomeis A and Tomasetti C (2012) Calcium-dependent networks in dopamine-glutamate interaction: the role of postsynaptic scaffolding proteins. *Mol Neurobiol* **46**:275-296.

- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M and Gingeras TR (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**:15-21.
- Ethier I, Beaudry G, St-Hilaire M, Milbrandt J, Rouillard C and Lévesque D (2004a) The transcription factor NGFI-B (Nur77) and retinoids play a critical role in acute neuroleptic-induced extrapyramidal effect and striatal neuropeptide gene expression. *Neuropsychopharmacology* **29**:335-346.
- Ethier I, Kagechika H, Shudo K, Rouillard C and Lévesque D (2004b) Docosahexaenoic acid reduces haloperidol-induced dyskinesias in mice: Involvement of Nur77 and retinoid receptors. *Biol Psychiatry* **56**:522-526.
- Fienberg AA, Hiroi N, Mermelstein PG, Song W-J, Snyder GL, Nishi A, Chermany A, O'Callaghan JP, Miller DB, Cole DG, Corbett R, Haile CN, Cooper DC, Onn SP, Grace AA, Ouimet CC, White FJ, Hyman SE, Surmeier DJ, Girault J-A, Nestler EJ and Greengard P (1998) DARPP-32: Regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. *Science* **281**:838-842.
- Florio E, Serra M, Lewis RG, Kramár E, Freidberg M, Wood M, Morelli M and Borrelli E (2022) D2R signaling in striatal spiny neurons modulates L-DOPA induced dyskinesia. *iScience* **25**:105263.
- Gerdeman GL, Ronesi J and Lovinger DM (2002) Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat Neurosci* **5**:446-451.
- Geurts M, Hermans E and Maloteaux J-M (2002) Opposite modulation of regulators of G protein signalling-2 (RGS2) and RGS4 expression by dopamine receptors in the rat striatum. *Neurosci Lett* **333**:146-150.

- Gilbert F, Morissette M, St-Hilaire M, Paquet B, Rouillard C, Di Paolo T and Lévesque D (2006) Nur77 gene knockout alters dopamine neuron biochemical activity and dopamine turnover. *Biol Psychiatry* **60**:538-547.
- Girgenti MJ, Nisenbaum LK, Bymaster F, Terwilliger R, Duman RS and Newton SS (2010) Antipsychotic-induced gene regulation in multiple brain regions. *J Neurochem* **113**:175-187.
- Greengard P, Allen PB and Nairn AC (1999) Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/Protein phosphatase-1 cascade. *Neuron* **23**:435-447.
- Gruber SHM, Nomikos GG and Mathe AA (2002) Effects of haloperidol and risperidone on neurotensin levels in brain regions and neurotensin efflux in the ventral striatum of the rat. *Neuropsychopharmacology* **26**:595-604.
- Heiman M, Heilbut A, Francardo V, Kulicke R, Fenster RJ, Kolaczyk ED, Mesirov JP, Surmeier DJ, Cenci MA and Greengard P (2014) Molecular adaptations of striatal spiny projection neurons during levodopa-induced dyskinesia. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**:4578-4583.
- Hernandez G, Mahmoudi S, Cyr M, Diaz J, Blanchet PJ and Lévesque D (2019) Tardive dyskinesia is associated with altered putamen Akt/GSK-3beta signaling in nonhuman primates. *Mov Disord* **34**:717-726.
- Iancu OD, Darakjian P, Malmanger B, Walter NA, McWeeney S and Hitzemann R (2012) Gene networks and haloperidol-induced catalepsy. *Genes Brain Behav* **11**:29-37.
- Iasevoli F, Tomasetti C, Marmo F, Bravi D, Arnt J and de Bartolomeis A (2010) Divergent acute and chronic modulation of glutamatergic postsynaptic density genes expression by the antipsychotics haloperidol and sertindole. *Psychopharmacology (Berl)* **212**:329-344.

- Jeanneteau F, Diaz J, Sokoloff P and Griffon N (2004) Interactions of GIPC with dopamine D2, D3 but not D4 receptors define a novel mode of regulation of G protein-coupled receptors. *Mol Biol Cell* **15**:696-705.
- Kim Y, Giusti-Rodriguez P, Crowley JJ, Bryois J, Nonneman RJ, Ryan AK, Quackenbush CR, Iglesias-Ussel MD, Lee PH, Sun W, de Villena FP and Sullivan PF (2018) Comparative genomic evidence for the involvement of schizophrenia risk genes in antipsychotic effects. *Mol Psychiatry* **23**:708-712.
- Ko F, Tallerico T and Seeman P (2006) Antipsychotic pathway genes with expression altered in opposite direction by antipsychotics and amphetamine. *Synapse* **60**:141-151.
- Ko WKD, Martin-Negrier ML, Bezard E, Crossman AR and Ravenscroft P (2014) RGS4 is involved in the generation of abnormal involuntary movements in the unilateral 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* **70**:138-148.
- Konradi C (2005) Gene expression microarray studies in polygenic psychiatric disorders: Applications and data analysis. *Brain Res Rev* **50**:142-155.
- Kumarasinghe N, Beveridge NJ, Gardiner E, Scott RJ, Yasawardene S, Perera A, Mendis J, Suriyakumara K, Schall U and Tooney PA (2013) Gene expression profiling in treatment-naïve schizophrenia patients identifies abnormalities in biological pathways involving AKT1 that are corrected by antipsychotic medication. *Int J Neuropsychopharmacol* **16**:1483-1503.
- Kwon OC, Song JJ, Yang Y, Kim SH, Kim JY, Seok MJ, Hwang I, Yu JW, Karmacharya J, Maeng HJ, Kim J, Jho EH, Ko SY, Son H, Chang MY and Lee SH (2021) SGK1 inhibition in glia ameliorates pathologies and symptoms in Parkinson disease animal models. *EMBO Mol Med* **13**:e13076.

- Laruelle M, Jaskiw GE, Lipska BK, Kolachana B, Casanova MF, Kleinman JE and Weinberger DR (1992) D1 and D2 receptor modulation in rat striatum and nucleus accumbens after subchronic and chronic haloperidol treatment. *Brain Res* **575**:47-56.
- Lerner TN and Kreitzer AC (2012) RGS4 Is Required for Dopaminergic Control of Striatal LTD and Susceptibility to Parkinsonian Motor Deficits. *Neuron* **73**:347-359.
- Lévesque C, Hernandez G, Mahmoudi S, Calon F, Gasparini F, Gomez-Mancilla B, Blanchet PJ and Lévesque D (2017) Deficient striatal adaptation in aminergic and glutamatergic neurotransmission is associated with tardive dyskinesia in non-human primates exposed to antipsychotic drugs. *Neuroscience* **361**:43-57.
- Lévesque D, Martres M-P, Diaz J, Griffon N, Lammers CH, Sokoloff P and Schwartz J-C (1995) A paradoxical regulation of the dopamine D3 receptor expression suggests the involvement of an anterograde factor from dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:1719-1723.
- Lévesque D and Rouillard C (2007) Nur77 and retinoid X receptors: crucial factors in dopamine-related neuroadaptation. *Trends Neurosci* **30**:22-30.
- Li B and Dewey CN (2011) RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* **12**:323.
- Love MI, Huber W and Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**:550.
- Maheux J, Ethier I, Rouillard C and Lévesque D (2005) Induction patterns of transcription factors of the Nur family (Nurr1, Nur77 and Nor-1) by typical and atypical antipsychotics in the mouse brain: Implication for their mechanism of action. *J Pharmacol Exp Ther* **313**:460-473.

- Mahmoudi S, Blanchet PJ and Lévesque D (2013) Haloperidol-induced striatal Nur77 expression in a non-human primate model of tardive dyskinesia. *Eur J Neurosci* **38**:2192-2198.
- Masri B, Salahpour A, Didriksen M, Ghisi V, Beaulieu JM, Gainetdinov RR and Caron MG (2008) Antagonism of dopamine D2 receptor/beta-arrestin 2 interaction is a common property of clinically effective antipsychotics. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**:13656-13661.
- McCutcheon RA, Reis Marques T and Howes OD (2020) Schizophrenia-An Overview. *JAMA Psychiatry* **77**:201-210.
- Meltzer HY (2013) Update on typical and atypical antipsychotic drugs. *Annu Rev Med* **64**:393-406.
- Meurers BH, Dziewczapolski G, Shi T, Bittner A, Kamme F and Shults CW (2009) Dopamine depletion induces distinct compensatory gene expression changes in DARPP-32 signal transduction cascades of striatonigral and striatopallidal neurons. *J Neurosci* **29**:6828-6839.
- Min C, Cheong SY, Cheong SJ, Kim M, Cho DI and Kim KM (2012) RGS4 exerts inhibitory activities on the signaling of dopamine D2 receptor and D3 receptor through the N-terminal region. *Pharmacological research* **65**:213-220.
- Patel KR, Cherian J, Gohil K and Atkinson D (2014) Schizophrenia: overview and treatment options. *P&T* **39**:638-645.
- Patterson KI, Brummer T, O'Brien PM and Daly RJ (2009) Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *Biochem J* **418**:475-489.
- Paxinos G (2009) *The rhesus monkey brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, Boston.

- Rampino A, Marakhovskaia A, Soares-Silva T, Torretta S, Veneziani F and Beaulieu JM (2019) Antipsychotic Drug Responsiveness and Dopamine Receptor Signaling; Old Players and New Prospects. *Front Psychiatry* **9**:702.
- Rizig MA, McQuillin A, Ng A, Robinson M, Harrison A, Zvelebil M, Hunt SP and Gurling HM (2012) A gene expression and systems pathway analysis of the effects of clozapine compared to haloperidol in the mouse brain implicates susceptibility genes for schizophrenia. *J Psychopharmacol* **26**:1218-1230.
- Rodriguez JJ, Garcia DR, Nakabeppu Y and Pickel VM (2001) FosB in rat striatum: Normal regional distribution and enhanced expression after 6-month haloperidol administration. *Synapse* **39**:122-132.
- Rouillard C, Baillargeon J, Paquet B, St-Hilaire M, Maheux J, Levesque C, Darlix N, Majeur S and Levesque D (2018) Genetic disruption of the nuclear receptor Nur77 (Nr4a1) in rat reduces dopamine cell loss and l-Dopa-induced dyskinesia in experimental Parkinson's disease. *Exp Neurol* **304**:143-153.
- Sanchez N, Coura R, Engmann O, Marion-Poll L, Longueville S, Hervé D, Andres ME and Girault JA (2014) Haloperidol-induced Nur77 expression in striatopallidal neurons is under the control of protein phosphatase 1 regulation by DARPP-32. *Neuropharmacology* **79**:559-566.
- Schwendt M, Gold SJ and McGinty JF (2006) Acute amphetamine down-regulates RGS4 mRNA and protein expression in rat forebrain: distinct roles of D1 and D2 dopamine receptors. *J Neurochem* **96**:1606-1615.
- Seeman P (2002) Atypical antipsychotics: Mechanism of action. *Can J Psychiatry* **47**:27-38.

- Smith LM, Parr-Brownlie LC, Duncan EJ, Black MA, Gemmell NJ, Dearden PK and Reynolds JN (2016) Striatal mRNA expression patterns underlying peak dose L-DOPA-induced dyskinesia in the 6-OHDA hemiparkinsonian rat. *Neuroscience* **324**:238-251.
- Solmi M, Murru A, Pacchiarotti I, Undurraga J, Veronese N, Fornaro M, Stubbs B, Monaco F, Vieta E, Seeman MV, Correll CU and Carvalho AF (2017) Safety, tolerability, and risks associated with first- and second-generation antipsychotics: a state-of-the-art clinical review. *Ther Clin Risk Manag* **13**:757-777.
- Stertz L, Di Re J, Pei G, Fries GR, Mendez E, Li S, Smith-Callahan L, Raventos H, Tipo J, Cherukuru R, Zhao Z, Liu Y, Jia P, Laezza F and Walss-Bass C (2021) Convergent genomic and pharmacological evidence of PI3K/GSK3 signaling alterations in neurons from schizophrenia patients. *Neuropsychopharmacology* **46**:673-682.
- Surmeier DJ, Plotkin J and Shen W (2009) Dopamine and synaptic plasticity in dorsal striatal circuits controlling action selection. *Curr Opin Neurobiol* **19**:621-628.
- Taymans JM, Kia HK, Claes R, Cruz C, Leysen J and Langlois X (2004) Dopamine receptor-mediated regulation of RGS2 and RGS4 mRNA differentially depends on ascending dopamine projections and time. *Eur J Neurosci* **19**:2249-2260.
- Tian X, Kai L, Hockberger PE, Wokosin DL and Surmeier DJ (2010) MEF-2 regulates activity-dependent spine loss in striatopallidal medium spiny neurons. *Mol Cell Neurosci* **44**:94-108.
- Tomasetti C, Iasevoli F, Buonaguro EF, De Berardis D, Fornaro M, Fiengo AL, Martinotti G, Orsolini L, Valchera A, Di Giannantonio M and de Bartolomeis A (2017) Treating the Synapse in Major Psychiatric Disorders: The Role of Postsynaptic Density Network in

- Dopamine-Glutamate Interplay and Psychopharmacologic Drugs Molecular Actions. *Int J Mol Sci* **18**.
- Urs NM, Peterson SM and Caron MG (2017) New Concepts in Dopamine D2 Receptor Biased Signaling and Implications for Schizophrenia Therapy. *Biol Psychiatry* **81**:78-85.
- Vasconcelos SM, Nascimento VS, Nogueira CR, Vieira CM, Sousa FC, Fonteles MM and Viana GS (2003) Effects of haloperidol on rat behavior and density of dopaminergic D2-like receptors. *Behav Processes* **63**:45-52.
- Wang H, Farhan M, Xu J, Lazarovici P and Zheng W (2017) The involvement of DARPP-32 in the pathophysiology of schizophrenia. *Oncotarget* **8**:53791-53803.
- Werme M, Ringholm A, Olson L and Brené S (2000) Differential patterns of induction of NGFI-B, Nor1 and c-fos mRNAs in striatal subregions by haloperidol and clozapine. *Brain Res* **863**:112-119.
- Woods SW, Morgenstern H, Saksa JR, Walsh BC, Sullivan MC, Money R, Hawkins KA, Gueorguieva RV and Glazer WM (2010) Incidence of tardive dyskinesia with atypical versus conventional antipsychotic medications: a prospective cohort study. *J Clin Psychiatry* **71**:463-474.
- Wu PY, Phan JH and Wang MD (2011) Exploring the feasibility of next-generation sequencing and microarray data meta-analysis. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc* **2011**:7618-7621.
- Yan Z, Song W-J and Surmeier J (1997) D2 dopamine receptors reduce N-type Ca²⁺ currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a membrane-delimited, protein-kinase-C-insensitive pathway. *J Neurophysiol* **77**:1003-1015.

Zahm DS, Williams ES, Poulad D and Krause JE (1996) Temporal dissociation of neurotensin/neuromedin N mRNA expression in topographically separate subsets of rat striatal neurons following administration of haloperidol. *Mol Brain Res* **42**:71-78.

Chapitre 3: Discussion

3.1 Résumé des résultats et discussion générale

L'objectif de notre étude était d'identifier, à l'aide de la technique de séquençage RNAseq, des voies de signalisation et gènes significativement modulés par l'halopéridol et étant associés à l'activité de Nur77. Les résultats de notre étude démontrent effectivement une modulation significative de plusieurs gènes, sur les 32,663 transcrits mesurés, suite au traitement aigu avec halopéridol. De plus, un nombre important de ces transcrits sont différentiellement modulés chez les rats Nur77 déficients traités avec halopéridol. Notamment, l'analyse RNAseq a révélé une modulation significative ajustée pour des comparaisons multiples ($p\text{-adj.} < 0.05$) de 414 gènes dans le groupe ayant reçu l'halopéridol (WT-HAL) comparativement au groupe contrôle (WT-Sal). La majorité de ceux-ci étaient régulés à la baisse (275 gènes) comparativement à la hausse (139 gènes). Quant à l'analyse des groupes déficients en Nur77 (KO-Sal vs. KO-HAL), les résultats n'ont révélé qu'une modulation de 66 gènes, avec 63 gènes étant régulés à la hausse et 3 gènes à la baisse. Ensuite, 71 gènes ont été démontrés comme étant modulés par Nur77 dans les groupes salins (WT-Sal vs. KO-Sal), avec 61 gènes régulés à la baisse et seulement 10 gènes régulés à la hausse.

Parmi les gènes les plus significativement modulés par l'halopéridol dans notre étude, on peut constater le *Dual specificity phosphatase 5* (Dusp5), le *Serum/Glucocorticoid regulated kinase 1* (Sgk1), le *Cyclin dependent kinase inhibitor 1A* (Cdkn1a), le *Guanylate cyclase 1 soluble subunit alpha 3* (Gucy1a3), le *Regulator of G-protein signaling 4* (Rgs4), et le *Striatin* (Strn; aussi connu sous le nom de Protein phosphatase 2 regulatory subunit 6 alpha). Moins de gènes sont modulés dans les groupes KO pour Nur77 recevant halopéridol comparativement aux groupes WT recevant halopéridol. De plus, certains gènes sont différentiellement modulés lors des deux comparaisons tels que la *Nts*, *FosB Proto-Oncogene* (Fosb), Dusp5 et *Serpin Family E*

Member 1 (Serpine1). De façon intéressante, certains gènes en commun avec les groupes WT recevant halopéridol sont ressortis parmi les gènes modulés par Nur77 (WT-Sal vs. KO-Sal), incluant notamment, Nts, Sgk1, Strn et Rgs4 (voir tableaux 1 et 2 du manuscrit). Ces résultats suggèrent une implication directe du Nur77 sur la modulation de composantes en lien avec des voies de signalisation empruntées par halopéridol. En effet, ce chevauchement de gènes modulés vient donc confirmer le lien déjà clairement établi dans la littérature du rôle de Nur77 sur l'activité des antipsychotiques (se référer à la section 1.4.3. de l'introduction du mémoire).

L'analyse bio-informatique, effectuée à l'aide de l'outil GeneAnalytics de GeneCards™, a permis d'identifier des phénotypes, pathologies, termes ontologiques, et voies de signalisation associées avec les gènes significativement modulés dans les groupes expérimentaux. Cette analyse a révélé la modulation de gènes impliqués dans les voies de signalisation glutamatergique et dopaminergique, incluant notamment la voie de l'AMP cyclique et le DARPP-32 avec halopéridol. De plus, les résultats ont démontré des gènes enrichis aux phénotypes associés aux troubles de la locomotion, tels des troubles de coordination et des mouvements involontaires, qui concordent avec la fonction du striatum et la prise d'un antagoniste D₂. Les gènes modulés par Nur77 ont été associés à la synapse glutamatergique, la voie de l'AMP cyclique et le DARPP-32 et la liaison de la calmoduline, une voie dépendante du calcium, ainsi qu'à des phénotypes semblables à ceux observés avec l'halopéridol. Pour faire suite au paragraphe précédent, nous pouvons observer des voies de signalisation communes (AMP cyclique et DARPP-32), et des similarités au niveau du phénotype (troubles de la locomotion) entre les groupes salins recevant halopéridol et les groupes déficients en Nur77, suggérant ainsi des pistes potentielles de voies régulées par Nur77 pouvant être impliquées dans l'activité de l'halopéridol lors d'un traitement à court terme avec cet agent (voir figure 2 et les

tableaux S3, S4 et S5 pour la liste approfondie de voies et phénotypes enrichis pour chaque groupe de comparaison). Cependant, nos analyses ayant comparé nos rats déficients en Nur77 traités ou non avec halopéridol (KO-Sal vs. KO-HAL) n'ont pas reproduit ces données au niveau du phénotype, suggérant possiblement une annulation de l'effet par une déficience en Nur77 sur la modulation de ces gènes par halopéridol (figure S3).

À partir des résultats de l'analyse bio-informatique et de l'analyse RNAseq, nous avons pu identifier un gène d'intérêt, la phosphatase Dusp5, comme étant fortement modulée par l'halopéridol et Nur77 chez les rongeurs. La famille des Dusp est impliquée dans la régulation des *Mitogen-activated protein kinases* (MAPKs), en déphosphorylant les résidus tyrosine et thréonine sur les MAPKs (87). La modulation de la Dusp5 ainsi que son rôle dans les voies des MAPKs nous a donc poussé à explorer davantage le rôle de cette phosphatase dans la DT chez un modèle de primates après traitement chronique avec halopéridol. Nos primates traités chroniquement avec halopéridol ont démontré une forte induction de l'ARNm du Dusp5 dans le striatum, qui est en accord avec ce qui a été observé chez notre modèle de rongeurs (voir figure 4A et tableau 1 du manuscrit). De plus, une différence significative a été observée entre le groupe d'animaux aillant développé la dyskinésie par rapport au groupe non dyskinétique. Les primates traités chroniquement avec halopéridol n'ont révélé aucune modulation significative au niveau de l'expression protéique du gène Dusp5 comparativement au groupe contrôle (groupe contrôle = $1,086 \pm 0,151$ vs. groupe halopéridol = $0,782 \pm 0,151$, P-value = 0,2368) (voir figure 4B du manuscrit). Cependant, suite à une sous-analyse ayant séparé les sujets recevant halopéridol en deux groupes, ceux ayant développé ou non la DT, nous avons pu constater une diminution significative de l'expression de la protéine Dusp5 spécifiquement chez les primates recevant l'halopéridol et ayant développé de la DT (groupe non-dyskinétique = $0,9828 \pm 0,1384$,

groupe dyskinétique = $0,4384 \pm 0,0737$, P-value = 0,0078) (se référer à la figure 4B du manuscrit). Ces résultats suggèrent donc un rôle protecteur du Dusp5 dans le développement de DT induites par la prise d'antipsychotiques.

3.2 La modulation de gènes liés à la neurotransmission dopaminergique et la signalisation dépendante des protéines G

Notre analyse RNAseq effectuée chez le rat a révélé une modulation de la neurotransmission dopaminergique et de plusieurs composantes de la signalisation intracellulaire des récepteurs D₂ avec un traitement à l'halopéridol. Tout d'abord, nous avons pu observer une modulation significative de composantes en lien avec la signalisation des récepteurs couplés aux protéines G. Parmi celles-ci, nous avons constaté une modulation significative des protéines régulatrices de la signalisation des protéines G, plus précisément les isoformes Rgs4 et *Regulator of G-protein signaling 9* (Rgs9) qui furent régulés à la baisse dans notre étude. Tel que décrit auparavant par Ahlers-Dannen et al. (2020), ces protéines peuvent agir au niveau du striatum en tant que protéines activatrices de la GTPase et peuvent ainsi désactiver les différentes sous-unités G_i alpha, G_o alpha et G_q alpha et ainsi inhiber la signalisation en aval (88). De nombreuses évidences existent dans la littérature scientifique suggérant un rôle important du Rgs4 dans la régulation de l'activité du récepteur D₂, incluant la réponse aux antipsychotiques (89–91). Tel que décrit par Bowling et al. (2016), les antipsychotiques, par leur antagonisme au niveau des récepteurs D₂, peuvent retirer l'inhibition tonique provoquée par G_{i/o} sur l'activité de l'adénylate cyclase (92). La régulation à la baisse du Rgs4 observé dans notre étude peut donc représenter une adaptation à la diminution de l'activité du G_i suite à l'antagonisme des récepteurs D₂ par l'halopéridol. De façon intéressante, Rgs4 fut également associé avec des troubles du mouvement et la dyskinésie induite par la L-Dopa dans la maladie de Parkinson (93,94), et Rgs9

fut associé à l'internalisation du récepteur D₂ (95). Ces évidences renforcent un lien entre l'activité du Rgs4 et Rgs9 et un traitement aigu aux antipsychotiques typiques et suggèrent que ces modulations pourraient être à l'origine des changements neuroadaptatifs observés à plus long terme, tel que la régulation à la hausse des récepteurs D₂ dans le striatum (96).

Pour faire suite à la modulation de certaines isoformes des Rgs par l'halopéridol, nous avons pu observer une modulation de plusieurs composantes de la signalisation en lien avec les protéines G (voir tableau S6 du manuscrit). Notamment, nos résultats ont révélé une modulation de nombreuses phosphatases, kinases et seconds messagers suite à la prise aiguë d'halopéridol. Plusieurs éléments de ces voies de signalisation ont déjà été décrits dans la littérature comme étant impliqués dans les effets des antipsychotiques (97,98). Cependant, certains éléments sont nouveaux, telles que la modulation des phosphatases Dusp, pour laquelle 6 isoformes furent modulés significativement par l'halopéridol dans notre étude (voir tableau 5 du manuscrit).

Parmi les enzymes pouvant réguler les seconds messagers, nous avons constaté une baisse de plusieurs sous-types de phosphodiesterase avec l'halopéridol, soit la *Phosphodiesterase 10a* (Pde10a), la *Phosphodiesterase 1b* (Pde1b), la *Phosphodiesterase 4d* (Pde4d) et une régulation à la hausse des phospholipases *PLAG1 like Zinc finger 1* (Plagl1) et *Phospholipase A2 group III* (Pla2g3). Parmi celles-ci, la Pde10a est d'intérêt particulier. En effet, plusieurs évidences dans la littérature ont démontré chez les rongeurs un phénotype semblable lors de l'inhibition de la Pde10a comparativement au phénotype lors de l'inhibition du D₂ (99). De plus, un effet préférentiel aux MSN de la voie indirecte a été observé lors de l'inhibition de la Pde10a (99). Malgré ces observations, des études cliniques testant l'effet d'inhibiteurs sélectifs de la Pde10a chez des patients se sont avérées négatives, illustrant la possibilité de différences non négligeables entre les différentes espèces étudiées (99). Nos résultats du RNAseq ont démontré

une modulation de plusieurs phosphodiésterases, et Pde1b a déjà été rapporté dans la littérature comme étant impliqué dans la régulation de la motricité et dans la réponse à l'amphétamine chez la souris (100). Ainsi, il se pourrait qu'une inhibition sélective de la Pde10a mène à une compensation par d'autres sous-types de phosphodiésterases, possiblement la Pde1b, pouvant expliquer le manque de réponse avec ces agents. Des recherches plus approfondies à ce niveau restent à être effectués.

Au niveau des phosphatases, nous avons observé une régulation à la baisse par l'halopéridol du *Strn*, *Protein Phosphatase 2 Regulatory Subunit B Gamma* (PPP2R5C), *Protein Phosphatase 3 Catalytic Subunit Beta* (PPP3CB), *Protein Phosphatase 2 Regulatory Subunit B alpha* (PPP2R2A), *Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 9A* (PPP1R9A) et la régulation de plusieurs phosphatases de type Dusp. Plusieurs kinases furent également modulées par l'halopéridol, incluant notamment *Sgk1*, *3-Phosphoinositide Dependent Protein Kinase 1* (Pdk1), *Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase II Alpha* (Camk2a), *Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase II Delta* (Camk2d), *Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase IV* (Camk4), *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A* (Cdkn1a), *Glycogen Synthase Kinase 3 Beta* (Gsk-3 β) et *AKT Serine/Threonine Kinase 3* (Akt3). Les kinases Akt3 et Gsk-3 β ainsi que la *Strn*, une sous-unité de la protéine phosphatase 2A (PP2A), pourraient réguler la voie de désensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G, par une diminution de la formation du complexe β -arrestine/PP2A/Akt impliqué dans la désensibilisation du récepteur D₂ (101,102). Ceci suggère qu'il y aurait l'enclenchement rapide d'une cascade d'évènements par l'halopéridol pouvant possiblement expliquer la régulation à la hausse des récepteurs D₂ observés lors de prise d'antipsychotiques à plus long terme (96).

Ensuite, de façon intéressante, nos résultats du RNAseq ont rapporté une modulation à la baisse du récepteur à l'adénosine *Adenosine A2a Receptor* (Adora2a, A_{2A}) par l'halopéridol. Ce récepteur a déjà été documenté dans la littérature comme pouvant former un complexe hétérodimère avec le récepteur D₂ au niveau des iMSN de la voie indirecte dans le striatum (103). Adora2a (A_{2A}) agirait de façon allostérique sur les récepteurs D₂, avec comme effet une diminution de l'efficacité et de l'affinité de ligands D₂ par un ligand A_{2A} (104). De façon réciproque, la liaison d'agonistes D₂ a mené à une diminution de la liaison de ligands A_{2A} (105). Les récepteurs D₂ et les récepteurs A_{2A} régulent les voies de l'adénylate cyclase et de la phospholipase C respectivement, et donc pourraient travailler de concert dans la régulation de la locomotion. Pour conclure, une modulation aussi importante et rapide de nombreuses composantes intracellulaires reliées aux protéines G selon nos résultats RNAseq suggère que, dès la première prise d'halopéridol, il y aurait une altération importante des voies de signalisation des GPCR, possiblement médié par le D₂, mais on ne peut pas exclure la contribution d'autres récepteurs, notamment le Adora2a (A_{2A}), qui est couplé à la voie G_s-AMP cyclique dans les MSN D₂.

3.3 La modulation de gènes liés à la neurotransmission glutamatergique et dopaminergique

Nos résultats ont également révélé une modulation de composantes impliquées dans la signalisation glutamatergique. Le gène *Homer1* fut régulé à la hausse dans les rats déficients pour *Nur77* traités avec halopéridol, et les gènes *SH3 And Multiple Ankyrin Repeat Domains 3* (*Shank3*) et *GRIN2A* furent régulés à la baisse tandis que le gène *Trafficking Regulator And Scaffold Protein Tamalin* (*Grasp*) fut régulé à la hausse dans nos sujets WT traités avec halopéridol. Les gènes *Homer1*, *Shank3* et *Grasp* peuvent agir en tant que protéines d'échafaudage pouvant relier les récepteurs dopaminergiques et glutamatergiques (106). De plus,

elles peuvent agir au niveau des récepteurs métabotropes mGluR₁ et mGluR₅ qui ont la capacité de se coupler aux récepteurs NMDA et ainsi potentialiser la réponse de ce récepteur (107). Une étude a démontré une régulation à la hausse de Homer1 suite à un traitement avec l'halopéridol chez des rats (108). Par ailleurs, Ho Lee et coll. ont élucidé un lien avec la protéine kinase C et la fonction des mGluR par l'entremise de la signalisation calcique avec la calmoduline (109). L'activation du mGluR₅ engendrerait la phosphorylation de la protéine kinase C, une modification de la liaison de la calmoduline, des modifications au niveau du trafic moléculaire et un changement de la signalisation en aval (109). Tel que discuté dans l'introduction, les récepteurs mGluR₅ ont récemment été soulevés en tant que cible intéressante pour des antipsychotiques, puisque ce récepteur a été associé à un rôle dans les fonctions cognitives de la schizophrénie et des modulateurs allostériques positifs de ce récepteur ont rapporté des résultats prometteurs chez des données *in vivo* (110). Parallèlement, nos résultats démontrent une modulation de plusieurs gènes par l'halopéridol et par Nur77, notamment des gènes codant pour plusieurs protéines d'échafaudage et des gènes impliqués dans l'activité de la calmoduline, qui sont tous deux vitaux au fonctionnement approprié des récepteurs métabotropes du glutamate (mGluR). Nos données rapportent donc Homer1, Shank3, GRIN2A, Grasp, Strn et Camk2d en tant que gènes d'intérêt modulés par un traitement à court-terme par les antipsychotiques et étant impliqués dans la signalisation glutamatergique striatale.

La voie de signalisation G-protéine dépendante DARPP-32/AMPC fut également modulée suite à un traitement aïgu à l'halopéridol ainsi que par Nur77. De par sa liaison aux récepteurs D₂ des iMSN du striatum et l'activation subséquente des sous-unités G α_i et $\beta\gamma$, la dopamine peut inhiber la phosphorylation de DARPP-32. (111). De façon intéressante, DARPP-32 est également impliqué dans la modulation glutamatergique en agissant au niveau de la calcineurine. Lors

d'ouverture des récepteurs NMDA par le glutamate, il y a influx d'ions calciques au niveau du neurone et activation de la calcineurine (PP1) par la calmoduline. La calcineurine peut agir en tant que médiateur de la phosphorylation du DARPP-32 et peut ainsi promouvoir sa déphosphorylation (111). D'ailleurs, des gènes étant impliqués dans l'activité de la calmoduline furent également modulés selon nos résultats, *Strn* (régulé à la baisse dans les groupes salins ayant reçu l'halopéridol) et *Camk2d* (régulé à la hausse dans les groupes Nur77 KO sous des conditions salines). DARPP-32 peut assumer un rôle soit activateur ou inhibiteur sur les voies de signalisation dopaminergiques et glutamatergiques en fonction du site de phosphorylation sur celle-ci (111). Une phosphorylation du DARPP-32 au site Thr-75 agit comme inhibiteur de l'AMPC et contribue donc à une augmentation de la déphosphorylation en aval. Dans leur étude portant chez des souris transgéniques KO pour DARPP-32, Fienberg et coll. ont démontré une réduction de la sensibilité de ces souris aux agents antipsychotiques (112). Plus précisément, le groupe KO a démontré une capacité réduite d'induire la catalepsie suite à un traitement avec l'antagoniste D₂ raclopride (112). Nos rats traités avec halopéridol ont rapporté une modulation de plusieurs sous-unités de canaux calciques voltage-dépendants tels que *Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha 1C* (*Cacna1c*), *Calcium Voltage-Gated Channel Auxiliary Subunit Alpha 2 delta 3* (*Cacna2d3*), *Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha 1E* (*Cacna1e*) et *Calcium Voltage-Gated Channel Auxiliary Subunit Alpha 2 delta 1* (*Cacna2d1*), et les canaux calciques ont d'ailleurs été rapportés comme étant impliqués dans la catalepsie (113). L'effet cataleptique observé avec halopéridol pourrait donc du moins partiellement être expliqué par son effet sur les canaux calciques, qui impliquerait également l'activité du DARPP-32. Nos résultats d'analyse transcriptomique supportent une altération de la voie de DARPP-32 et plus particulièrement, une modulation de la *Strn* et de la *Camk2d*, impliqués dans l'activité de la calmoduline. Wang et coll.

(2017) ont rapporté une augmentation de la phosphorylation de DARPP-32 suite à un traitement avec halopéridol et la rispéridone (114). De plus, nos rats traités avec halopéridol ont démontré une modulation à la baisse de Gucyl1a3, une guanylate cyclase impliquée dans la voie de l'oxyde nitrique et pouvant phosphoryler DARPP-32 (115). Une représentation sous forme de schéma des voies communes dopaminergiques et glutamatergiques ainsi que du rôle partagé de DARPP-32 dans ces cascades intracellulaires est illustré dans la figure S4. En somme, selon nos résultats et ceux rapportés dans la littérature décrite ci-haut, un traitement par l'halopéridol à court terme pourrait moduler l'activité des composantes de cette voie et apporterait une perturbation de l'activité du DARPP-32 phosphorylé.

Nous avons observé une modulation à la hausse du Sgk1 dans les groupes ayant reçu l'halopéridol ainsi que dans les groupes Nur77 KO traités avec de la saline. En effet, Sgk1 constitue une composante importante de la voie de signalisation du PI3K/Gsk3. De façon intéressante, Stertz et coll. (2021) ont démontré dans leur étude de séquençage chez des cellules pluripotentes humaines dérivés de patients schizophrènes la voie PI3K/Gsk3 en tant que voie majeure enrichie avec Sgk1, l'inhibiteur du Gsk-3 β , modulé à la hausse (116). Bien que les animaux de notre étude soient des animaux sains et non schizophrènes, il est intéressant de constater que la prise aïgue d'halopéridol module également le Sgk1 à la hausse et que la voie PI3K/Gsk3 est également enrichie dans notre analyse bio-informatique. Ceci suggère que certains éléments associés à la physiopathologie de la schizophrénie peuvent être ciblés par l'halopéridol, comme décrit antérieurement (85,98,117).

3.4 La modulation différentielle de gènes par Nur77

Nos résultats ont révélé une forte contribution du Nur77 dans la modulation de gènes par l'halopéridol. De façon globale, Nur77 semble être impliqué dans la régulation à la baisse de nombreux gènes lors de la prise d'halopéridol, tel que témoigné par les différences observées au niveau des gènes significativement modulés chez les groupes sauvages recevant halopéridol (414 gènes) comparativement aux groupes déficients pour Nur77 recevant halopéridol (seulement 66 gènes). La majorité des gènes furent régulés à la baisse par halopéridol (275 gènes sur 414), alors que seulement 3 gènes sur 66 furent régulés à la baisse dans le groupe déficient pour Nur77. Ces résultats suggèrent que l'absence de Nur77 a mené à une augmentation relative de plusieurs gènes qui sont normalement régulés à la baisse par l'halopéridol, annulant ainsi l'effet significatif sur la modulation nette de ces gènes.

En dépit de ces observations, notre analyse a rapporté certains transcrits étant moins fortement induits dans les groupes déficients pour Nur77 recevant halopéridol comparativement aux animaux sauvages recevant le même traitement (se référer aux tableaux 1 et 3). Ces gènes incluent notamment la *Nts*, *Dusp5*, *Cdkn1a*, et *Sgk1*. Notre analyse RT-qPCR a permis de valider les modulations des gènes obtenus avec nos résultats du RNAseq, avec certains gènes étant modulés différemment entre les groupes sauvages et déficients en Nur77 recevant halopéridol. Ces gènes sont *Dusp5*, *Fosb*, *G Protein-Coupled Receptor 3* (*Gpr3*), *Arrdc2*, *Rgs4*, *Rap Guanine Nucleotide Exchange Factor 3* (*Rapgef3*) et *Small G Protein Signaling Modulator 1* (*Sgsm1*). Il est bien documenté dans la littérature qu'une absence en Nur77 peut modifier des comportements régulés par les circuits dopaminergiques, tels que l'hyperactivité spontanée, une altération dans la catalepsie induite par les antipsychotiques, la DT induite par les antipsychotiques et les effets des psychostimulants (75,118). Le profil de gènes modulés par Nur77 dans nos analyses transcriptomiques et en RT-qPCR suggèrent donc que Nur77 pourrait

réguler certaines composantes en lien avec la signalisation intracellulaire du récepteur D₂, qui aident à mieux élucider le mécanisme d'action de celui-ci dans les effets des antipsychotiques (se référer au tableau S6 pour une liste des gènes en lien avec les protéines G). Pour terminer, nos rats déficients en Nur77 ont démontré des modulations différentielles de plusieurs transcrits mentionnés ci-haut, suggérant ainsi une contribution potentielle du Nur77 dans les processus neuroadaptatifs associés avec l'usage des antipsychotiques.

3.5 La modulation des Dusp et leur rôle dans les mouvements involontaires anormaux (dyskinésie)

Tel qu'abordé dans la discussion générale, nos résultats de transcriptomique ont révélé une modulation de 6 isoformes des phosphatases Dusp par l'halopéridol, avec un rôle potentiellement protecteur du Dusp5 (et possiblement des autres isoformes) dans le développement de dyskinésies tardives avec l'usage d'antipsychotiques. De façon intéressante, Heiman et coll. ont observé dans leur modèle de souris hémiparkinsoniens, des régulations des Dusp dans les MSN D₁, en lien avec des dyskinésies induites par la lévodopa et une suractivité du D₁ (119). Bien qu'il s'agisse d'un modèle de la maladie de Parkinson, il est tout de même intéressant de constater que la Dusp5 était fortement augmentée dans les cellules D₁ mais plutôt réduite dans les cellules D₂ (119). Ceci suggère une association entre la Dusp5 et la dyskinésie dans ces deux populations cellulaires, ce qui pourrait supporter nos données démontrant un rôle de cette phosphatase dans la DT induite par les antipsychotiques.

Comme mentionné précédemment, les principaux substrats de déphosphorylation de la Dusp5 sont les membres de la famille des MAPKs, et plus spécifiquement Erk1/2. D'ailleurs, Hernandez et coll. (2019) ont rapporté dans leur étude qu'un traitement chronique à l'halopéridol chez des singes n'a apporté aucune modification significative sur les niveaux de Erk1 mais a

mené à des niveaux de Erk1 phosphorylés davantage élevés comparativement à sa forme non-phosphorylée (120). Cette observation est en accord avec nos résultats qui démontrent une diminution des niveaux de la protéine Dusp5 lors de la prise d'halopéridol chronique (dyskinétiques seulement) et ainsi, par conséquence, une hausse prévue de la fraction phosphorylée de Erk1. Ceci étant dit, Hernandez et coll. n'ont rapporté aucune différence significative dans le ratio de Erk1 phosphorylé vs. non-phosphorylé chez les singes présentant de la DT vs. ceux non-dyskinétiques (120). Cette observation ne concorde donc pas avec la modulation de cette phosphatase, considérant nos résultats qui démontrent une diminution des niveaux de Dusp5 chez nos sujets dyskinétiques. Cette divergence pourrait ainsi suggérer que, bien qu'il y ait une réduction des niveaux de Dusp5, les effets de cette phosphatase seraient exercés par une voie de signalisation différente de celle impliquant Erk1. En effet, Dusp5 pourrait agir sur la voie de l'Akt/Gsk-3 β , possiblement de concert avec Sgk1, afin de moduler les réponses dyskinétiques. Plus précisément, Dusp5 agirait en déphosphorylant pAkt, ainsi réduisant la fraction de Gsk-3 β non-phosphorylée. L'augmentation de Gsk-3 β phosphorylée serait associée à une réduction de la DT selon Hernandez et coll. et donc, Dusp5 pourrait exercer un effet protecteur de la DT par ce mécanisme (120). Cependant, jusqu'à présent, aucune donnée dans la littérature n'a clairement établi de lien entre Dusp5 et la voie de l'Akt/Gsk-3 β . La contribution des autres Dusp pourraient également influencer, du moins en partie, l'état de phosphorylation de ces kinases. Ceci étant dit, une recherche plus approfondie est nécessaire à ce niveau.

3.6 Autres études de transcriptomique dans la littérature

Tel que discuté précédemment dans l'introduction, plusieurs études existent dans la littérature ayant effectué des analyses transcriptomiques de type microarray, avec des résultats variables dans les gènes rapportés. Ceci étant dit, certaines études plus récentes ont été effectuées en utilisant la méthode de RNAseq.

Tout d'abord, Chong et coll., à l'aide de la technique de microarray, ont pu mesurer l'expression de gènes dans le striatum de rats suite à l'administration chronique d'halopéridol. Ceux-ci ont rapporté une augmentation de l'expression du *G protein-coupled receptor 12* (Gpr12), ainsi qu'une diminution de l'expression d'un sous-type de récepteur au glutamate, le *Glutamate Metabotropic Receptor 4* (Grm4) (82). Bien que nous n'ayons pas observé une modulation de ces gènes dans notre étude, nous avons cependant observé une modulation significative de d'autres sous-types de récepteurs couplés aux protéines G et de récepteurs au glutamate par l'halopéridol, notamment le Gpr3, *G Protein-Coupled Receptor 34* (Gpr34), *G Protein-Coupled Receptor 88* (Gpr88), *G-Protein-Coupled Receptor 155* (Gpr155) et le *Glutamate Metabotropic Receptor 5* (Grm5).

Par la suite, Fehér et coll. ont utilisé la technique de séquençage par microarray afin de déterminer le profil d'expression de gènes chez des rats suite à un traitement chronique avec l'halopéridol ou la rispéridone. De façon générale, ils ont identifié des gènes significativement modulés différents de ce qui a été rapporté auparavant. D'intérêt, ils ont identifié une surexpression de l'ARNm de *Calmodulin 2* (Calm2) et du récepteur glutamatergique *Glutamate Ionotropic Receptor AMPA Type Subunit 2* (Gria2), deux composantes soulevées dans nos résultats (se référer au tableau S2 du manuscrit) (121).

Ensuite, Girgenti et coll. (2010) ont mesuré par microarray l'expression de gènes suite à un traitement chronique avec halopéridol ou olanzapine dans le striatum, le cortex frontal et l'hippocampe de rats (97). Ils ont identifié 153 gènes significativement modulés dans le striatum. Parmi ceux-ci, ils ont observé une induction de 31 facteurs de transcription et de plusieurs gènes impliqués dans la signalisation des neurotransmetteurs, tels que la Nts, des récepteurs à la somatostatine, des récepteurs à l'enképhaline, des gènes régulant l'activité de l'acétylcholine et le Gria2 associé aux récepteurs glutamatergiques (97).

Plus récemment, Kim et coll. ont rapporté dans leur étude de séquençage RNAseq chez des souris traitées chroniquement avec halopéridol, une modulation de gènes dans le striatum, certains d'entre eux étant en commun avec ce dont nous avons rapporté, tels que la Nts, Grin2a, Pdpk1 et *Calcium Voltage-Gated Channel Auxiliary Subunit Beta 4* (Cacnb4) (98). La présence de gènes impliquant les voies glutamatergiques et calciques ainsi que la modulation de kinases supportent donc nos observations des différentes voies affectées par la prise d'halopéridol.

Florio et coll., dans leur étude récente datant de 2022, rapportent des résultats très intéressants comparativement à ce dont nous avons trouvé dans notre analyse transcriptomique. Ils ont mesuré l'expression génétique différentielle par RNAseq dans le striatum dorsolatéral de souris mutantes avec délétion du D₂ spécifiquement dans les iMSN et ayant reçu une lésion *6-hydroxydopamine* (6-OHDA) comparativement aux souris contrôles (122). Il s'agit ici d'un modèle de dyskinésie induite par la lévodopa. Néanmoins, plusieurs gènes dont nous avons identifié ont été rapportés dans leur étude, soit le Gng7, Pde10a et Pde1b, Adora2a, Gpr88, Rgs4, Nur77 et Dusp1 (122). Une délétion du D₂ dans les neurones de la voie indirecte a donc modulé cette série de gènes, ce qui est très intéressant considérant nos résultats semblables avec un

traitement par halopéridol (antagoniste D₂ agissant sur les MSN). Ces résultats viennent donc supporter un rôle de ces gènes dans la signalisation D₂ spécifiquement au niveau des iMSN.

Les études de transcriptomique dans la littérature comportent certaines différences par rapport à notre étude. Tout d'abord, les études par microarray ont mesuré l'expression génétique chez des rats Sprague-Dawley comparativement à notre étude où nous avons utilisé des rats FHH (82,97,121). De plus, ces études ont mesuré l'expression génétique suite à un traitement chronique, soit 4 semaines de traitement avec antipsychotique, avec l'exception de l'étude de Fehér et coll. où ils ont également traité leurs rats pendant 96 heures en tant que traitement aigu (121). Toutes les études par microarray ont comparé les gènes modulés par halopéridol, mais les études de Fehér et coll. et de Girgenti et coll. ont également mesuré les gènes modulés par rispéridone et olanzapine, respectivement (97,121). Concernant l'étude par Kim et coll., elle fut effectuée chez des souris traités chroniquement avec halopéridol et non chez des rats traités de façon aigu comme dans notre étude (98). Les nombreuses différences au niveau des modèles utilisés, soit au niveau de l'espèce utilisé, de la durée de traitement et de la technique de séquençage, peuvent expliquer certaines des variations obtenues au niveau des gènes modulés dans les études, incluant la nôtre.

3.7 Limites de l'étude et perspectives d'avenir

Notre étude comporte certaines limites méthodologiques. Tout d'abord, il aurait été intéressant d'effectuer une analyse transcriptomique chez des rats suite à un traitement chronique aux antipsychotiques et non seulement aigu, considérant que la DT se produit suite à un traitement à long terme avec ces drogues. Ceci étant dit, l'objectif de notre étude était plutôt d'élucider les cibles directes de Nur77 lors de prise d'antipsychotique. Étant un gène immédiat-précoce, Nur77

est rapidement régulé à la hausse suite à la prise d'halopéridol et donc, afin d'obtenir un profil précis de gènes directement modulés par Nur77, un traitement aigu à l'halopéridol était à privilégier. C'est pour cette raison que nos animaux furent sacrifiés 5 heures suite à l'injection d'halopéridol. Par contre, une analyse comparative des gènes modulés de façon aiguë et chronique par les antipsychotiques serait une donnée importante à obtenir dans des études subséquentes. De plus, il serait intéressant d'explorer les impacts différentiels au niveau transcriptomique d'un traitement aux antipsychotiques à plus long terme chez des animaux déficients en Nur77, surtout considérant que Nur77 agit normalement en tant que gène immédiat-précoce. Cependant, les résultats d'une telle étude seraient plus difficiles à interpréter puisque plusieurs phénomènes adaptatifs qui n'ont pas de lien direct avec l'activité de Nur77 viendraient agir en tant que facteurs confondants.

Ensuite, nos données ont été obtenues chez des rats traités de façon aiguë avec halopéridol, un antipsychotique typique. L'absence de données de transcriptomique avec un antipsychotique atypique, tel que l'olanzapine, limite l'applicabilité de nos résultats au contexte clinique actuel où les antipsychotiques atypiques sont fréquemment utilisés (123). Ceci dit, bien qu'à première vue il puisse sembler intéressant d'obtenir des données sur les gènes différenciellement modulés par Nur77 lors d'un traitement avec un antipsychotique atypique, ceci ne serait pas utile dans le contexte de notre étude. Notamment, l'absence d'une modulation significative de Nur77 au niveau des régions striatales a été démontré à plusieurs reprises lors d'un traitement avec l'antipsychotique atypique clozapine (74,77,124). De plus, la tendance à développer de la DT particulièrement chez le rat suite à un traitement avec un agent atypique est beaucoup plus faible qu'avec un agent typique (125). Ces deux facteurs limitent donc la pertinence d'évaluer notre objectif dans un modèle de rats traités avec un antipsychotique atypique. Une étude comparative

entre un agent typique et atypique pourrait tout de même être effectué mais celle-ci devrait être au niveau du noyau accumbens où il y a été démontré y avoir induction de Nur77 (77).

Nos travaux antérieurs ont montré qu'il existe plusieurs différences notables dans les effets neurochimiques de l'administration de l'halopéridol entre les rongeurs et les primates non humains (modulation D₃ vs. D₂, rôle du Gsk-3 β vs. Erk/ Δ FosB) (126,127). Une piste importante à explorer dans le futur serait donc d'effectuer une étude transcriptomique de type RNAseq dans un modèle de primates. Ceci pourrait être vital à l'identification de gènes d'intérêt modulés par les antipsychotiques chez l'humain puisqu'il pourrait y exister des différences non négligeables entre les différentes espèces. Bien que ces résultats divergents pourraient être expliqués par d'autres facteurs tels que la durée de traitement avec les antipsychotiques dans les deux groupes, le choix de l'espèce pourrait également y être impliqué.

Une limite possible de notre étude s'agit du fait que nous avons effectué notre analyse à partir de striatum complets homogénéisés. Puisqu'il s'agit du tissu complet, nous ne pouvons exclure la possibilité que certains de nos gènes rapportés soient exprimés dans d'autres types cellulaires que des iMSN. En effet, nos données ont démontré la modulation de gènes tels que le *Von Willebrand Factor A Domain Containing 5B1* (Vwa5b1) et le CD180 qui sont des gènes habituellement exprimés dans les vaisseaux sanguins (128,129). Puisque l'objectif de notre étude était d'obtenir une vue d'ensemble des voies et composantes modulées par halopéridol et Nur77, nous avons opté pour la méthode de séquençage en masse (*bulk sequencing*), nous permettant d'élaborer des profils d'expression entre nos différents groupes de comparaison. Cependant, il aurait été intéressant de procéder à une sous-analyse des gènes différentiellement modulés dans les différentes populations cellulaires (MSN, microglie, astrocytes etc.), qui serait possible grâce à la méthode de séquençage par cellules uniques (*single-cell sequencing*). En effet, dans leur

étude de transcriptomique, Abrantes et coll. ont utilisé la technique de séquençage par cellules uniques, leur permettant de déterminer des gènes différentiellement modulés dans les MSN, la microglie et les astrocytes de souris traités chroniquement avec halopéridol ou olanzapine (85). De plus, nous ne pouvons exclure l'impact qu'un traitement avec l'halopéridol (antagoniste D₂) aurait sur les interneurons cholinergiques du striatum faisant synapse avec les MSN, surtout considérant que cette population neuronale possède des récepteurs D₂ à sa surface, et est impliquée dans l'activité des MSN (130,131).

Concernant notre modèle utilisé dans notre analyse RNAseq, celui-ci comporte certains avantages et inconvénients. Tout d'abord, notre modèle s'agit d'un modèle unique car peu de modèles de délétion génétique existent chez le rat (132). Cependant, notre modèle impliquait la production d'un codon stop au site de l'acide aminé 130, tel que décrit par Rouillard et coll. (86). Cette mutation produit une protéine tronquée dont on peut fortement soupçonner comme étant non fonctionnelle. Par contre, cette mutation pourrait en théorie quand même avoir un effet dominant négatif et interférer avec l'activité des Nurs. De plus, il s'agit d'une mutation non inductible qui est présente durant le développement et durant toute la vie de l'animal. On ne peut donc exclure d'importants effets potentiels que l'absence d'une protéine fonctionnelle pour Nur77 pendant toute la vie de l'animal pourrait avoir. Ceci est particulièrement important pour l'interprétation des données lors de la comparaison entre les groupes WT-Sal vs. KO-Sal.

3.8 Conclusion

Notre étude de transcriptomique effectuée chez des rats sauvages ou déficients en Nur77 traités avec une dose unique d'halopéridol a permis de révéler des gènes d'intérêt modulés par l'halopéridol et Nur77. Les résultats de l'analyse bio-informatique ont révélé un effet de

l'halopéridol sur plusieurs composantes en lien avec la signalisation aux protéines G, incluant notamment la modulation significative de deux isoformes des Rgs, Rgs4 et Rgs9, ainsi que la modulation significative de plusieurs phosphodiésterases, kinases, phosphatases, et seconds messagers impliqués avec la signalisation du récepteur D₂. De plus, des composantes de d'autres voies de signalisation furent modulés, telles certaines composantes de la voie de désensibilisation des récepteurs (Akt3, PP2A), le Sgk1, impliqué dans la régulation du Gsk-3 β dans la voie du PI3K/Gsk3, et des phosphatases de la famille des Dusp, plus particulièrement l'isoforme Dusp5, impliqué dans la voie des MAPK/Erk.

Le profil de gènes modulés par l'halopéridol est en général similaire avec ce qui a été rapporté précédemment dans la littérature et est en accord avec l'observation d'une régulation à la hausse du récepteur D₂ par un traitement avec un antagoniste D₂. Les modulations différentielles dans les rats Nur77 déficients traités ou non avec halopéridol suggère également un rôle de ce récepteur nucléaire dans la régulation de plusieurs composantes en lien avec voies de signalisation modulées par l'halopéridol. De surcroît, nos résultats ont également révélé certaines composantes de la signalisation glutamatergique comme étant modulés par l'halopéridol, incluant des protéines d'échafaudage tels que Shank3 et Homer1. En conclusion, nos résultats ont permis d'identifier une modulation rapide de plusieurs composantes de la signalisation en lien avec les protéines G ainsi que des composantes de la signalisation dopaminergique et glutamatergique par la prise d'halopéridol, qui supportent un rôle de Nur77 sur la modulation de ces voies. Finalement, nous avons pu identifier Dusp5 en tant que nouvelle composante pouvant être corrélée avec la DT induite par les antipsychotiques n'ayant jamais été rapportée auparavant.

Références

1. Patel KR, Cherian J, Gohil K, Atkinson D. Schizophrenia: Overview and Treatment Options. *Pharm Ther.* sept 2014;39(9):638-45.
2. Jablensky A. The diagnostic concept of schizophrenia: its history, evolution, and future prospects. *Dialogues Clin Neurosci.* sept 2010;12(3):271-87.
3. Saha S, Chant D, Welham J, McGrath J. A systematic review of the prevalence of schizophrenia. *PLoS Med.* mai 2005;2(5):e141.
4. Charlson FJ, Ferrari AJ, Santomauro DF, Diminic S, Stockings E, Scott JG, et al. Global Epidemiology and Burden of Schizophrenia: Findings From the Global Burden of Disease Study 2016. *Schizophr Bull.* oct 2018;44(6):1195-203.
5. Owen MJ, O'Donovan MC, Thapar A, Craddock N. Neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *Br J Psychiatry.* mars 2011;198(3):173-5.
6. Lichtenstein P, Yip BH, Björk C, Pawitan Y, Cannon TD, Sullivan PF, et al. Common genetic influences for schizophrenia and bipolar disorder: A population-based study of 2 million nuclear families. *Lancet.* 17 janv 2009;373(9659):10.1016/S0140-6736(09)60072-6.
7. Escudero I, Johnstone M. Genetics of Schizophrenia. *Curr Psychiatry Rep.* nov 2014;16(11):502.
8. Henriksen MG, Nordgaard J, Jansson LB. Genetics of Schizophrenia: Overview of Methods, Findings and Limitations. *Front Hum Neurosci.* 22 juin 2017;11:322.

9. Ban TA. Fifty years chlorpromazine: a historical perspective. *Neuropsychiatr Dis Treat*. août 2007;3(4):495-500.
10. Carlsson A, Lindqvist M. Effect of Chlorpromazine or Haloperidol on Formation of 3-Methoxytyramine and Normetanephrine in Mouse Brain. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 1963;20(2):140-4.
11. Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-Hydroxytryptophan as Reserpine Antagonists. *Nature*. nov 1957;180(4596):1200-1200.
12. Bramness JG, Gundersen ØH, Guterstam J, Rognli EB, Konstenius M, Løberg EM, et al. Amphetamine-induced psychosis - a separate diagnostic entity or primary psychosis triggered in the vulnerable? *BMC Psychiatry*. 5 déc 2012;12:221.
13. Howes OD, Kapur S. The Dopamine Hypothesis of Schizophrenia: Version III—The Final Common Pathway. *Schizophr Bull*. mai 2009;35(3):549-62.
14. Davis KL, Kahn RS, Ko G, Davidson M. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry*. nov 1991;148(11):1474-86.
15. Pycock CJ, Kerwin RW, Carter CJ. Effect of lesion of cortical dopamine terminals on subcortical dopamine receptors in rats. *Nature*. juill 1980;286(5768):74-7.
16. Laruelle M, Abi-Dargham A, van Dyck CH, Gil R, D'Souza CD, Erdos J, et al. Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 20 août 1996;93(17):9235-40.

17. Kapur S. Psychosis as a State of Aberrant Salienc: A Framework Linking Biology, Phenomenology, and Pharmacology in Schizophrenia. *Am J Psychiatry*. janv 2003;160(1):13-23.
18. Fletcher PC, Frith CD. Perceiving is believing: a Bayesian approach to explaining the positive symptoms of schizophrenia. *Nat Rev Neurosci*. janv 2009;10(1):48-58.
19. Kim JS, Kornhuber HH, Schmid-Burgk W, Holzmüller B. Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neurosci Lett*. 1 déc 1980;20(3):379-82.
20. Hu W, MacDonald ML, Elswick DE, Sweet RA. The glutamate hypothesis of schizophrenia: evidence from human brain tissue studies. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1338(1):38-57.
21. Mielnik CA, Binko MA, Chen Y, Funk AJ, Johansson EM, Intson K, et al. Consequences of NMDA receptor deficiency can be rescued in the adult brain. *Mol Psychiatry*. juill 2021;26(7):2929-42.
22. Marek GJ. Metabotropic glutamate_{2/3} (mGlu_{2/3}) receptors, schizophrenia and cognition. *Eur J Pharmacol*. 10 août 2010;639(1-3):81-90.
23. Moghaddam B. Bringing Order to the Glutamate Chaos in Schizophrenia. *Neuron*. 4 déc 2003;40(5):881-4.
24. Gao WJ. NMDA hypofunction as a convergence point for progression and symptoms of schizophrenia. *Front Cell Neurosci*. :12.

25. Rorick-Kehn LM, Johnson BG, Knitowski KM, Salhoff CR, Witkin JM, Perry KW, et al. In vivo pharmacological characterization of the structurally novel, potent, selective mGlu2/3 receptor agonist LY404039 in animal models of psychiatric disorders. *Psychopharmacology (Berl)*. 1 juill 2007;193(1):121-36.
26. Patil ST, Zhang L, Martenyi F, Lowe SL, Jackson KA, Andreev BV, et al. Activation of mGlu2/3 receptors as a new approach to treat schizophrenia: a randomized Phase 2 clinical trial. *Nat Med*. sept 2007;13(9):1102-7.
27. Fell MJ, Svensson KA, Johnson BG, Schoepp DD. Evidence for the Role of Metabotropic Glutamate (mGlu)2 Not mGlu3 Receptors in the Preclinical Antipsychotic Pharmacology of the mGlu2/3 Receptor Agonist (–)-(1R,4S,5S,6S)-4-Amino-2-sulfonylbicyclo[3.1.0]hexane-4,6-dicarboxylic Acid (LY404039). *J Pharmacol Exp Ther*. 1 juill 2008;326(1):209-17.
28. Marek GJ, Behl B, Bernalov AY, Gross G, Lee Y, Schoemaker H. Glutamatergic (N-Methyl-d-aspartate Receptor) Hypofrontality in Schizophrenia: Too Little Juice or a Miswired Brain? *Mol Pharmacol*. 1 mars 2010;77(3):317-26.
29. Ango F, Pin JP, Tu JC, Xiao B, Worley PF, Bockaert J, et al. Dendritic and Axonal Targeting of Type 5 Metabotropic Glutamate Receptor Is Regulated by Homer1 Proteins and Neuronal Excitation. *J Neurosci*. 1 déc 2000;20(23):8710-6.
30. Ayala JE, Chen Y, Banko JL, Sheffler DJ, Williams R, Telk AN, et al. mGluR5 positive allosteric modulators facilitate both hippocampal LTP and LTD and enhance spatial learning. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. août 2009;34(9):2057-71.

31. Kokkinou M, Ashok AH, Howes OD. The effects of ketamine on dopaminergic function: meta-analysis and review of the implications for neuropsychiatric disorders. *Mol Psychiatry*. janv 2018;23(1):59-69.
32. Krystal JH, D'Souza DC, Karper LP, Bennett A, Abi-Dargham A, Abi-Saab D, et al. Interactive effects of subanesthetic ketamine and haloperidol in healthy humans. *Psychopharmacology (Berl)*. juill 1999;145(2):193-204.
33. Gleich T, Deserno L, Lorenz RC, Boehme R, Pankow A, Buchert R, et al. Prefrontal and Striatal Glutamate Differently Relate to Striatal Dopamine: Potential Regulatory Mechanisms of Striatal Presynaptic Dopamine Function? *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1 juill 2015;35(26):9615-21.
34. Schwartz TL, Sachdeva S, Stahl SM. Glutamate Neurocircuitry: Theoretical Underpinnings in Schizophrenia. *Front Pharmacol*. 26 nov 2012;3:195.
35. Quednow B, Geyer M, Halberstadt A. Serotonin and Schizophrenia. Dans: *Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin*. 2009. p. 585-620.
36. Crow TJ, Baker HF, Cross AJ, Joseph MH, Lofthouse R, Longden A, et al. Monoamine mechanisms in chronic schizophrenia: post-mortem neurochemical findings. *Br J Psychiatry J Ment Sci*. mars 1979;134:249-56.
37. Bantick RA, Deakin JFW, Grasby PM. The 5-HT1A receptor in schizophrenia: a promising target for novel atypical neuroleptics? *J Psychopharmacol (Oxf)*. 1 janv 2001;15(1):37-46.

38. Tauscher J, Kapur S, Verhoeff NPLG, Hussey DF, Daskalakis ZJ, Tauscher-Wisniewski S, et al. Brain serotonin 5-HT(1A) receptor binding in schizophrenia measured by positron emission tomography and [11C]WAY-100635. *Arch Gen Psychiatry*. juin 2002;59(6):514-20.
39. Yasuno F, Suhara T, Ichimiya T, Takano A, Ando T, Okubo Y. Decreased 5-HT1A receptor binding in amygdala of schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 1 mars 2004;55(5):439-44.
40. Okubo Y, Suhara T, Suzuki K, Kobayashi K, Inoue O, Terasaki O, et al. Serotonin 5-HT2 receptors in schizophrenic patients studied by positron emission tomography. *Life Sci*. 2000;66(25):2455-64.
41. Lewis R, Kapur S, Jones C, DaSilva J, Brown GM, Wilson AA, et al. Serotonin 5-HT2 receptors in schizophrenia: a PET study using [18F]setoperone in neuroleptic-naive patients and normal subjects. *Am J Psychiatry*. janv 1999;156(1):72-8.
42. Ngan ET, Yatham LN, Ruth TJ, Liddle PF. Decreased serotonin 2A receptor densities in neuroleptic-naive patients with schizophrenia: A PET study using [(18)F]setoperone. *Am J Psychiatry*. juin 2000;157(6):1016-8.
43. Scarr E, Pavey G, Copolov D, Dean B. Hippocampal 5-hydroxytryptamine receptors: abnormalities in postmortem brain from schizophrenic subjects. *Schizophr Res*. 1 déc 2004;71(2-3):383-92.
44. Dean B, Pavey G, Thomas D, Scarr E. Cortical serotonin7, 1D and 1F receptors: effects of schizophrenia, suicide and antipsychotic drug treatment. *Schizophr Res*. déc 2006;88(1-3):265-74.

45. Ameer MA, Saadabadi A. Neuroleptic Medications. Dans: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [cité 7 nov 2022]. Disponible à :
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459150/>
46. Kane JM. The current status of neuroleptic therapy. *J Clin Psychiatry*. sept 1989;50(9):322-8.
47. Buoli M, Kahn RS, Serati M, Altamura AC, Cahn W. Haloperidol versus second-generation antipsychotics in the long-term treatment of schizophrenia. *Hum Psychopharmacol*. juill 2016;31(4):325-31.
48. Leucht S, Cipriani A, Spineli L, Mavridis D, Orey D, Richter F, et al. Comparative efficacy and tolerability of 15 antipsychotic drugs in schizophrenia: a multiple-treatments meta-analysis. *Lancet Lond Engl*. 14 sept 2013;382(9896):951-62.
49. Mailman RB, Murthy V. Third generation antipsychotic drugs: partial agonism or receptor functional selectivity? *Curr Pharm Des*. 2010;16(5):488-501.
50. Dazzan P, Morgan KD, Orr K, Hutchinson G, Chitnis X, Suckling J, et al. Different Effects of Typical and Atypical Antipsychotics on Grey Matter in First Episode Psychosis: the ÆSOP Study. *Neuropsychopharmacology*. avr 2005;30(4):765-74.
51. Solmi M, Murru A, Pacchiarotti I, Undurraga J, Veronese N, Fornaro M, et al. Safety, tolerability, and risks associated with first- and second-generation antipsychotics: a state-of-the-art clinical review. *Ther Clin Risk Manag*. 29 juin 2017;13:757-77.

52. Hirsch L, Patten SB, Bresee L, Jette N, Pringsheim T. Second-generation antipsychotics and metabolic side-effects: Canadian population-based study. *BJPsych Open*. 12 juill 2018;4(4):256-61.
53. Bymaster FP, Calligaro DO, Falcone JF, Marsh RD, Moore NA, Tye NC, et al. Radioreceptor binding profile of the atypical antipsychotic olanzapine. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. févr 1996;14(2):87-96.
54. Stroup TS, Lieberman JA, McEvoy JP, Davis SM, Swartz MS, Keefe RSE, et al. Results of Phase 3 of the CATIE Schizophrenia Trial. *Schizophr Res*. janv 2009;107(1):1-12.
55. Lieberman JA. Dopamine partial agonists: a new class of antipsychotic. *CNS Drugs*. 2004;18(4):251-67.
56. Waln O, Jankovic J. An Update on Tardive Dyskinesia: From Phenomenology to Treatment. *Tremor Hyperkinetic Mov*. 12 juill 2013;3:tre-03-161-4138-1.
57. Vinuela A, Kang UJ. Reversibility of Tardive Dyskinesia Syndrome. *Tremor Hyperkinetic Mov*. 27 nov 2014;4:282.
58. Vasan S, Padhy RK. Tardive Dyskinesia. Dans: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [cité 7 nov 2022]. Disponible à : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448207/>
59. Gebhardt S, Härtling F, Hanke M, Mittendorf M, Theisen FM, Wolf-Ostermann K, et al. Prevalence of movement disorders in adolescent patients with schizophrenia and in

relationship to predominantly atypical antipsychotic treatment. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 1 oct 2006;15(7):371-82.

60. Kim J, Macmaster E, Schwartz TL. Tardive dyskinesia in patients treated with atypical antipsychotics: case series and brief review of etiologic and treatment considerations. *Drugs Context*. 2014;3:212259.
61. Teo JT, Edwards MJ, Bhatia K. Tardive dyskinesia is caused by maladaptive synaptic plasticity: a hypothesis. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc*. 1 sept 2012;27(10):1205-15.
62. Mahmoudi S, Lévesque D, Blanchet PJ. Upregulation of dopamine D3, not D2, receptors correlates with tardive dyskinesia in a primate model. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc*. août 2014;29(9):1125-33.
63. Bergman J, Dwolatzky T, Brettholz I, Lerner V. Beneficial effect of donepezil in the treatment of elderly patients with tardive movement disorders. *J Clin Psychiatry*. janv 2005;66(1):107-10.
64. Mathews M, Gratz S, Adetunji B, George V, Mathews M, Basil B. Antipsychotic-Induced Movement Disorders. *Psychiatry Edgmont*. mars 2005;2(3):36-41.
65. Maxwell MA, Muscat GEO. The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles. *Nucl Recept Signal*. 8 févr 2006;4:e002.
66. To SK, Zeng JZ, Wong AS. Nur77: a potential therapeutic target in cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 1 juin 2012;16(6):573-85.

67. Kolluri SK, Bruey-Sedano N, Cao X, Lin B, Lin F, Han YH, et al. Mitogenic Effect of Orphan Receptor TR3 and Its Regulation by MEKK1 in Lung Cancer Cells. *Mol Cell Biol.* déc 2003;23(23):8651-67.
68. Zhao B xing, Chen H zi, Du X dan, Luo J, He J ping, Wang R hao, et al. Orphan Receptor TR3 Enhances p53 Transactivation and Represses DNA Double-Strand Break Repair in Hepatoma Cells under Ionizing Radiation. *Mol Endocrinol.* 1 août 2011;25(8):1337-50.
69. Harant H, Lindley IJD. Negative cross-talk between the human orphan nuclear receptor Nur77/NAK-1/TR3 and nuclear factor- κ B. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(17):5280-90.
70. Wu L, Chen L. Characteristics of Nur77 and its ligands as potential anticancer compounds (Review). *Mol Med Rep.* 1 déc 2018;18(6):4793-801.
71. Paulsen RF, Granas K, Johnsen H, Rolseth V, Sterri S. Three related brain nuclear receptors, NGFI-B, Nurr1, and NOR-1, as transcriptional activators. *J Mol Neurosci MN.* 1995;6(4):249-55.
72. Perlmann T, Jansson L. A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev.* 1 avr 1995;9(7):769-82.
73. Maheux J, Vuillier L, Mahfouz M, Rouillard C, Lévesque D. Modulation of haloperidol-induced patterns of the transcription factor Nur77 and Nor-1 expression by serotonergic and adrenergic drugs in the mouse brain. *Int J Neuropsychopharmacol.* 1 mai 2012;15(4):509-21.
74. Beaudry G, Langlois MC, Weppe I, Rouillard C, Lévesque D. Contrasting Patterns and Cellular Specificity of Transcriptional Regulation of the Nuclear Receptor Nerve Growth

- Factor-Inducible B by Haloperidol and Clozapine in the Rat Forebrain. *J Neurochem.* 2000;75(4):1694-702.
75. Éthier I, Beaudry G, St-Hilaire M, Milbrandt J, Rouillard C, Lévesque D. The Transcription Factor NGFI-B (Nur77) and Retinoids Play a Critical Role in Acute Neuroleptic-Induced Extrapyramidal Effect and Striatal Neuropeptide Gene Expression. *Neuropsychopharmacology.* févr 2004;29(2):335-46.
76. Ethier I, Kagechika H, Shudo K, Rouillard C, Lévesque D. Docosahexaenoic acid reduces haloperidol-induced dyskinesias in mice: involvement of Nur77 and retinoid receptors. *Biol Psychiatry.* 1 oct 2004;56(7):522-6.
77. Maheux J, Ethier I, Rouillard C, Lévesque D. Induction patterns of transcription factors of the nur family (nurr1, nur77, and nor-1) by typical and atypical antipsychotics in the mouse brain: implication for their mechanism of action. *J Pharmacol Exp Ther.* avr 2005;313(1):460-73.
78. Mahmoudi S, Blanchet PJ, Lévesque D. Haloperidol-induced striatal Nur77 expression in a non-human primate model of tardive dyskinesia. *Eur J Neurosci.* juill 2013;38(1):2192-8.
79. Novak G, Gallo A, Zai CC, Meltzer HY, Lieberman JA, Potkin SG, et al. Association of the orphan nuclear receptor NR4A1 with tardive dyskinesia. *Psychiatr Genet.* févr 2010;20(1):39-43.
80. Kumarasinghe N, Beveridge NJ, Gardiner E, Scott RJ, Yasawardene S, Perera A, et al. Gene expression profiling in treatment-naive schizophrenia patients identifies abnormalities in

biological pathways involving AKT1 that are corrected by antipsychotic medication. *Int J Neuropsychopharmacol.* août 2013;16(7):1483-503.

81. Chen ML, Chen CH. Microarray Analysis of Differentially Expressed Genes in Rat Frontal Cortex Under Chronic Risperidone Treatment. *Neuropsychopharmacology.* févr 2005;30(2):268-77.
82. Chong VZ, Young LT, Mishra RK. cDNA array reveals differential gene expression following chronic neuroleptic administration: implications of synapsin II in haloperidol treatment. *J Neurochem.* sept 2002;82(6):1533-9.
83. Graveley BR. Power sequencing. *Nature.* juin 2008;453(7199):1197-8.
84. Kukurba KR, Montgomery SB. RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harb Protoc.* 13 avr 2015;2015(11):951-69.
85. Abrantes A, Giusti-Rodriguez P, Ancalade N, Sekle S, Basiri ML, Stuber GD, et al. Gene expression changes following chronic antipsychotic exposure in single cells from mouse striatum. *Mol Psychiatry.* juin 2022;27(6):2803-12.
86. Rouillard C, Baillargeon J, Paquet B, St-Hilaire M, Maheux J, Lévesque C, et al. Genetic disruption of the nuclear receptor Nur77 (Nr4a1) in rat reduces dopamine cell loss and l-Dopa-induced dyskinesia in experimental Parkinson's disease. *Exp Neurol.* juin 2018;304:143-53.

87. An N, Bassil K, Al Jowf GI, Steinbusch HWM, Rothermel M, de Nijs L, et al. Dual-specificity phosphatases in mental and neurological disorders. *Prog Neurobiol.* 1 mars 2021;198:101906.
88. Ahlers-Dannen KE, Spicer MM, Fisher RA. RGS Proteins as Critical Regulators of Motor Function and Their Implications in Parkinson's Disease. *Mol Pharmacol.* déc 2020;98(6):730-8.
89. Campbell DB, Ebert PJ, Skelly T, Stroup TS, Lieberman J, Levitt P, et al. Ethnic stratification of the association of RGS4 variants with antipsychotic treatment response in schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 1 janv 2008;63(1):32-41.
90. Geurts M, Hermans E, Maloteaux JM. Opposite modulation of regulators of G protein signalling-2 RGS2 and RGS4 expression by dopamine receptors in the rat striatum. *Neurosci Lett.* 22 nov 2002;333(2):146-50.
91. Min C, Cheong SY, Cheong SJ, Kim M, Cho DI, Kim KM. RGS4 exerts inhibitory activities on the signaling of dopamine D2 receptor and D3 receptor through the N-terminal region. *Pharmacol Res.* févr 2012;65(2):213-20.
92. Bowling H, Santini E. Unlocking the molecular mechanisms of antipsychotics - a new frontier for discovery. *Swiss Med Wkly.* 2016;146:w14314.
93. Ko WKD, Martin-Negrier ML, Bezard E, Crossman AR, Ravenscroft P. RGS4 is involved in the generation of abnormal involuntary movements in the unilateral 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* oct 2014;70:138-48.

94. Lerner TN, Kreitzer AC. RGS4 is required for dopaminergic control of striatal LTD and susceptibility to parkinsonian motor deficits. *Neuron*. 26 janv 2012;73(2):347-59.
95. Cerver J, Sharma M, Koo A. RGS9-2 mediates specific inhibition of agonist-induced internalization of D2-dopamine receptors. *J Neurochem*. août 2010;114(3):739-49.
96. Silvestri S, Seeman MV, Negrete JC, Houle S, Shammi CM, Remington GJ, et al. Increased dopamine D2 receptor binding after long-term treatment with antipsychotics in humans: a clinical PET study. *Psychopharmacology (Berl)*. oct 2000;152(2):174-80.
97. Girgenti MJ, Nisenbaum LK, Bymaster F, Terwilliger R, Duman RS, Newton SS. Antipsychotic-induced gene regulation in multiple brain regions. *J Neurochem*. 2010;113(1):175-87.
98. Kim Y, Giusti-Rodriguez P, Crowley JJ, Bryois J, Nonneman RJ, Ryan AK, et al. Comparative Genomic Evidence for the Involvement of Schizophrenia Risk Genes in Antipsychotic Effects. *Mol Psychiatry*. mars 2018;23(3):708-12.
99. Menniti FS, Chappie TA, Schmidt CJ. PDE10A Inhibitors—Clinical Failure or Window Into Antipsychotic Drug Action? *Front Neurosci*. 20 janv 2021;14:600178.
100. Siuciak JA. The Role of Phosphodiesterases in Schizophrenia. *CNS Drugs*. 1 déc 2008;22(12):983-93.
101. Beaulieu JM, Gainetdinov RR, Caron MG. Akt/GSK3 signaling in the action of psychotropic drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2009;49:327-47.

102. Beaulieu JM, Sotnikova TD, Marion S, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Caron MG. An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell*. 29 juill 2005;122(2):261-73.
103. Fernández-Dueñas V, Ferré S, Ciruela F. Adenosine A2A-dopamine D2 receptor heteromers operate striatal function: impact on Parkinson's disease pharmacotherapeutics. *Neural Regen Res*. févr 2018;13(2):241-3.
104. Ferré S, Bonaventura J, Tomasi D, Navarro G, Moreno E, Cortés A, et al. Allosteric mechanisms within the adenosine A2A-dopamine D2 receptor heterotetramer. *Neuropharmacology*. mai 2016;104:154-60.
105. Fernández-Dueñas V, Gómez-Soler M, Morató X, Núñez F, Das A, Kumar TS, et al. DOPAMINE D2 RECEPTOR-MEDIATED MODULATION OF ADENOSINE A2A RECEPTOR AGONIST BINDING WITHIN THE A2AR/D2R OLIGOMER FRAMEWORK. *Neurochem Int*. juill 2013;63(1):42-6.
106. Tomasetti C, Iasevoli F, Buonaguro EF, De Berardis D, Fornaro M, Fiengo ALC, et al. Treating the Synapse in Major Psychiatric Disorders: The Role of Postsynaptic Density Network in Dopamine-Glutamate Interplay and Psychopharmacologic Drugs Molecular Actions. *Int J Mol Sci*. 12 janv 2017;18(1):E135.
107. Fitzjohn SM, Irving AJ, Palmer MJ, Harvey J, Lodge D, Collingridge GL. Activation of group I mGluRs potentiates NMDA responses in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett*. 26 janv 1996;203(3):211-3.

108. Iasevoli F, Buonaguro EF, Avagliano C, Barone A, Eramo A, Vellucci L, et al. The Effects of Antipsychotics on the Synaptic Plasticity Gene Homer1a Depend on a Combination of Their Receptor Profile, Dose, Duration of Treatment, and Brain Regions Targeted. *Int J Mol Sci.* 3 août 2020;21(15):5555.
109. Lee JH, Lee J, Choi KY, Hepp R, Lee JY, Lim MK, et al. Calmodulin dynamically regulates the trafficking of the metabotropic glutamate receptor mGluR5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 26 août 2008;105(34):12575-80.
110. Maksymetz J, Moran SP, Conn PJ. Targeting metabotropic glutamate receptors for novel treatments of schizophrenia. *Mol Brain.* 26 avr 2017;10(1):15.
111. Gould TD, Manji HK. DARPP-32: A molecular switch at the nexus of reward pathway plasticity. *Proc Natl Acad Sci.* 11 janv 2005;102(2):253-4.
112. Fienberg AA, Hiroi N, Mermelstein PG, Song WJ, Snyder GL, Nishi A, et al. DARPP-32: Regulator of the Efficacy of Dopaminergic Neurotransmission. *Science.* 7 août 1998;281(5378):838-42.
113. Haraguchi K, Ito K, Kotaki H, Sawada Y, Iga T. Catalepsy induced by calcium channel blockers in mice. *Biopharm Drug Dispos.* mars 1998;19(2):115-22.
114. Wang H, Farhan M, Xu J, Lazarovici P, Zheng W. The involvement of DARPP-32 in the pathophysiology of schizophrenia. *Oncotarget.* 8 août 2017;8(32):53791-803.
115. Meurers BH, Dziewczapolski G, Shi T, Bittner A, Kamme F, Shults CW. Dopamine Depletion Induces Distinct Compensatory Gene Expression Changes in DARPP-32 Signal

Transduction Cascades of Striatonigral and Striatopallidal Neurons. *J Neurosci*. 27 mai 2009;29(21):6828-39.

116. Stertz L, Di Re J, Pei G, Fries GR, Mendez E, Li S, et al. Convergent genomic and pharmacological evidence of PI3K/GSK3 signaling alterations in neurons from schizophrenia patients. *Neuropsychopharmacology*. févr 2021;46(3):673-82.
117. Freyberg Z, Ferrando SJ, Javitch JA. Roles of the Akt/GSK-3 and Wnt signaling pathways in schizophrenia and antipsychotic drug action. *Am J Psychiatry*. avr 2010;167(4):388-96.
118. Lévesque D, Rouillard C. Nur77 and retinoid X receptors: crucial factors in dopamine-related neuroadaptation. *Trends Neurosci*. janv 2007;30(1):22-30.
119. Heiman M, Heilbut A, Francardo V, Kulicke R, Fenster RJ, Kolaczyk ED, et al. Molecular adaptations of striatal spiny projection neurons during levodopa-induced dyskinesia. *Proc Natl Acad Sci*. 25 mars 2014;111(12):4578-83.
120. Hernandez G, Mahmoudi S, Cyr M, Diaz J, Blanchet PJ, Lévesque D. Tardive dyskinesia is associated with altered putamen Akt/GSK-3 β signaling in nonhuman primates. *Mov Disord*. 2019;34(5):717-26.
121. Fehér LZ, Kálmán J, Puskás LG, Gyülvézi G, Kitajka K, Penke B, et al. Impact of haloperidol and risperidone on gene expression profile in the rat cortex. *Neurochem Int*. 1 sept 2005;47(4):271-80.

122. Florio E, Serra M, Lewis RG, Kramár E, Freidberg M, Wood M, et al. D2R signaling in striatal spiny neurons modulates L-DOPA induced dyskinesia. *iScience*. 21 oct 2022;25(10):105263.
123. ÜÇOK A, GAEBEL W. Side effects of atypical antipsychotics: a brief overview. *World Psychiatry*. févr 2008;7(1):58-62.
124. Werme M, Ringholm A, Olson L, Brené S. Differential patterns of induction of NGFI-B, Nor1 and c-fos mRNAs in striatal subregions by haloperidol and clozapine. *Brain Res*. 28 avr 2000;863(1-2):112-9.
125. Kakigi T, Gao XM, Tamminga CA. Drug-induced oral dyskinesias in rats after traditional and new neuroleptics. *J Neural Transm Gen Sect JNT*. 1 févr 1995;101(1):41-9.
126. Blanchet PJ, Parent MT, Rompré PH, Lévesque D. Relevance of animal models to human tardive dyskinesia. *Behav Brain Funct BBF*. 9 mars 2012;8:12.
127. Blanchet PJ. A Focused Update on Tardive Dyskinesia. *Can J Neurol Sci J Can Sci Neurol*. nov 2020;47(6):747-55.
128. VWA5B1 von Willebrand factor A domain containing 5B1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cité 7 nov 2022]. Disponible à:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/127731>
129. Cd180 CD180 molecule [Rattus norvegicus (Norway rat)] - Gene - NCBI [Internet]. [cité 7 nov 2022]. Disponible à: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/294706>

130. Mallet N, Leblois A, Maurice N, Beurrier C. Striatal Cholinergic Interneurons: How to Elucidate Their Function in Health and Disease. *Front Pharmacol.* 13 déc 2019;10:1488.
131. Deng P, Zhang Y, Xu ZC. Involvement of Ih in Dopamine Modulation of Tonic Firing in Striatal Cholinergic Interneurons. *J Neurosci.* 21 mars 2007;27(12):3148-56.
132. Sato M, Nakamura S, Inada E, Takabayashi S. Recent Advances in the Production of Genome-Edited Rats. *Int J Mol Sci.* 25 févr 2022;23(5):2548.

Annexe

Les tableaux supplémentaires sont disponibles dans la section « Ensemble de données de recherche lié ». (<https://doi.org/10.5683/SP3/PMB4NR>)