

Université de Montréal

**Caractérisation du bitopertin, un inhibiteur sélectif du transporteur de la glycine 1,
pour le traitement de la maladie de Parkinson et des complications induites par la L-
DOPA**

Par

Imane FROUNI

Département de Pharmacologie et physiologie, Faculté de Médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Doctorat ès Sciences (Ph.D.) en
Pharmacologie, option Neuropharmacologie

Avril, 2023

© Imane FROUNI, 2023

Université de Montréal
Département de Pharmacologie et physiologie
Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée

**Caractérisation du bitopertin, un inhibiteur sélectif du transporteur de la glycine 1,
pour le traitement de la maladie de Parkinson et des dyskinésies induites par la lévodopa**

Présentée par

Imane FROUNI

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

René Cardinal, Ph.D.

Président-rapporteur

Philippe Huot, M.D., Ph.D.

Directeur de recherche

Louis-Éric Trudeau, Ph.D.

Membre du jury

Thérèse Di Paolo, Ph.D.

Examinatrice externe

Line Beaudet, Ph.D.

Représentante du doyen

Résumé

La maladie de Parkinson (MP) est un trouble dégénératif du système nerveux central qui affecte principalement les personnes âgées. Son principal traitement est la L-3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA), qui malheureusement provoque des problèmes handicapants tels que les dyskinésies et les psychoses à la suite d'une administration chronique. Peu de traitements sont disponibles pour réduire efficacement ces complications et certains interfèrent avec l'effet thérapeutique de la L-DOPA, alors que d'autres induisent des effets secondaires potentiellement dangereux pour la vie des patients. Il est donc crucial de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques. Des études cliniques et précliniques ont montré que le site de liaison de la glycine du récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA) est une cible thérapeutique prometteuse pour les problèmes moteurs de la MP. En effet, la stimulation de celui-ci augmenterait la transmission glutamatergique via la voie hyperdirecte des ganglions de la base, et par conséquent favoriserait l'inhibition du thalamus qui mènera à une moindre activation du cortex moteur, et donc possiblement moins de dyskinésies. De plus, puisque l'activation des récepteurs NMDA le long de la voie nigro-striée augmente la libération de dopamine dans le striatum, il est possible qu'un effet antiparkinsonien soit également obtenu.

L'objectif de cette étude est de caractériser les potentiels anti-dyskinétique, antipsychotique et antiparkinsonien de l'inhibition sélective du transporteur de la glycine 1 (GlyT1) chez deux modèles animaux de la MP.

Le chapitre 1 décrit le développement et la validation d'une nouvelle méthode de détection pour quantifier les niveaux plasmatiques du bitopertin, un inhibiteur du GlyT1. Le chapitre 2 détermine le profil pharmacocinétique du bitopertin chez le rat, à la suite d'une administration sous-cutanée. Le chapitre 3 évalue l'effet du bitopertin sur la dyskinésie et le parkinsonisme

chez le rat hémi-parkinsonien, montrant une amélioration significative de la dyskinésie et du parkinsonisme. Le chapitre 4 évalue l'effet de l'ALX-5407, un inhibiteur du GlyT1, sur la dyskinésie et les comportements de types psychotiques chez le ouistiti lésé au 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP), démontrant une amélioration de la sévérité globale de la dyskinésie, des comportements de type psychose et du parkinsonisme.

Dans l'ensemble, ces résultats fournissent des données convaincantes pour soutenir le potentiel thérapeutique de l'inhibition de GlyT1. De plus, le bitopertin a fait l'objet d'essais cliniques approfondies pour le traitement de la schizophrénie, et a présenté un profil de sécurité et de tolérance bien documenté, ce qui en fait un candidat attrayant pour une nouvelle étude clinique dans le traitement de la MP.

Mots clés: transporteur de la glycine 1, bitopertin, ALX-5407, L-DOPA, maladie de Parkinson, dyskinésie, comportements de type psychotiques, 6-OHDA, MPTP, pharmacocinétique.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a degenerative disorder of the central nervous system that primarily affects older people. Its main treatment is L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), which unfortunately causes disabling problems such as dyskinesias and psychosis following chronic administration. Few treatments are available to effectively reduce these complications, and some interfere with the therapeutic effect of L-DOPA, while others induce potentially life-threatening side effects. It is therefore crucial to discover new therapeutic targets. Clinical and preclinical studies have shown that the glycine site of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor is a promising therapeutic target for motor problems in PD. Indeed, this may increase glutamatergic transmission via the hyperdirect pathway of the basal ganglia, and consequently promote inhibition of the thalamus, which will lead to minimal activation of the motor cortex, and therefore possibly less dyskinesia. Additionally, since activation of NMDA receptors along the nigrostriatal pathway increases dopamine release in the striatum, it is possible that an antiparkinsonian effect is also achieved.

The objective of this study is to characterize the anti-dyskinetic, antipsychotic and antiparkinsonian potentials of selective inhibition of glycine transporter 1 (GlyT1) in two animal models of PD.

Chapter 1 describes the development and validation of a new detection method to quantify plasma levels of bitopertin, a GlyT1 inhibitor. Chapter 2 determines the pharmacokinetic profile of bitopertin in rats, following subcutaneous administration. Chapter 3 evaluates the effect of bitopertin on dyskinesia and parkinsonism in hemi-parkinsonian rats, showing a significant improvement in dyskinesia and parkinsonism. Chapter 4 evaluates the effect of ALX-5407, a GlyT1 inhibitor, on dyskinesia and psychotic-like behaviours in marmosets injured with 1-

methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), demonstrating an improvement in the overall severity of dyskinesia, psychosis-like behaviours, and parkinsonism.

Taken together, these results provide compelling data to support the therapeutic potential of GlyT1 inhibition. Additionally, bitopertin has been extensively tested in clinical trials for the treatment of schizophrenia, and has demonstrated a well-documented safety and tolerability profile, making it an attractive candidate for further clinical study in the treatment of the PD.

Key words: glycine transporter 1, bitopertin, ALX-5407, L-DOPA, Parkinson's disease, dyskinesia, psychotic-like behaviours, 6-OHDA, MPTP, pharmacokinetics.

Résumé vulgarisé

La maladie de Parkinson (MP) est un trouble neurologique qui touche principalement les personnes âgées et entraîne des problèmes de mouvement. Son principal traitement est la L-DOPA, mais après une utilisation prolongée, elle provoque souvent des effets secondaires graves, notamment des psychoses et des mouvements incontrôlés appelés dyskinésies. Dans ce cas, il est nécessaire de trouver de meilleurs traitements. Une option prometteuse consiste à cibler un transporteur cérébral spécifique appelée GlyT1. Cette approche pourrait aider à réduire les problèmes de mouvement dans la MP en modifiant le fonctionnement des signaux cérébraux. Cela pourrait également entraîner moins d'effets secondaires comme les psychoses et les dyskinésies. Cette thèse vise à étudier comment le blocage d'un transporteur spécifique appelée GlyT1 chez les animaux pourrait aider à résoudre les symptômes susmentionnés.

Dans le chapitre 1, nous avons développé une nouvelle méthode pour mesurer une substance appelée le bitopertin, qui bloque spécifiquement le GlyT1. Dans le chapitre 2, nous avons étudié le profil du bitopertin dans le corps des rats lorsqu'administré sous la peau ou en intraveineux. Dans le chapitre 3, nous avons testé le bitopertin chez des rats présentant des symptômes de la MP et des dyskinésies, et avons constaté qu'il améliorait leurs mouvements incontrôlés et leur état général. Dans le chapitre 4, nous avons utilisé un autre bloqueur du GlyT1 appelé ALX-5407 chez des singes présentant des symptômes de type MP, et il a réduit leurs mouvements incontrôlés, leur comportement de type psychose et leur état général.

Tous ces résultats suggèrent que le blocage de GlyT1 pourrait être un traitement prometteur contre la MP. De plus, le bitopertin a été testée chez des personnes atteintes de schizophrénie et

son utilisation est sécuritaire, ce qui en fait un candidat pour des recherches ultérieures sur la MP.

Table des matières

Résumé	1
Abstract.....	3
Résumé vulgarisé.....	5
Table des matières	7
Liste des figures.....	10
Liste des tableaux	11
Liste des abréviations	12
Remerciements	14
1. INTRODUCTION GÉNÉRALE	16
1.1. La maladie de Parkinson.....	17
1.1.1. Manifestations cliniques de la maladie de Parkinson.....	17
1.1.2. Les circuits des ganglions de la base	18
1.1.3. Neuropathologie	21
1.1.4. Pathophysiologie de la maladie de Parkinson	22
1.1.5. Traitements symptomatiques.....	28
1.2. Complications induites par la L-DOPA.....	32
1.2.1. La dyskinésie induite par la L-DOPA	33
1.2.2. Les psychoses dans la maladie de Parkinson	42

1.3.	Neurotransmission glycinergique	50
1.3.1.	Glycine	50
1.3.2.	Transporteurs de la glycine	51
1.4.	Transporteur de la glycine 1	53
1.4.1.	Distribution anatomique	53
1.4.2.	Fonction et régulation.....	54
1.5.	Bitopertin	55
1.5.1.	Pharmacologie de bitopertin.....	55
1.5.2.	Études cliniques.....	57
1.6.	ALX-5407	60
1.6.1.	Pharmacologie d'ALX-5407	60
1.7.	Modèles animaux de la maladie de Parkinson.....	60
1.7.1.	Lésion au MPTP	61
1.7.2.	Lésion à la 6-OHDA.....	65
2.	PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	68
2.1	Problématique	69
2.2	Hypothèses.....	69
2.3	Objectifs.....	70
2.4	Articles.....	71
3.	RÉSULTATS	74

Chapitre 1: Méthode de détection du bitopertin dans le plasma de rat et ouistiti à la suite d'une administration sous-cutané et intraveineuse.	75
Chapitre 2: Profil pharmacocinétique du bitopertin chez le rat	105
Chapitre 3: Effet de l'inhibition de GlyT1 sur les dyskinésies induites par la L-DOPA chez le modèle de rat lésé à la 6-hydroxydopamine	138
Chapitre 4: Effet de l'inhibition de GlyT1 sur les dyskinésies et les psychoses induites chez le modèle de ouistiti lésé au MPTP	180
4. DISCUSSION	218
4.1. Récapitulation des résultats	219
4.2. L'inhibition de GlyT1 comme cible thérapeutique pour la MP et la dyskinésie	220
4.3. L'inhibition de GlyT1 comme cible thérapeutique de la psychose	228
4.4. Considérations méthodologiques	230
4.5. Perspectives et conclusion	232
5. RÉFÉRENCES.....	234
6. ANNEXES	311
Échelles d'évaluation comportementales.....	312
Liste des publications lors du doctorat	317

Liste des figures

Figure 1: Le circuit des ganglions de la base (Sharma et al., 2018).....	20
Figure 2: Modifications dans les synapses dopaminergiques et glutamatergiques dans la MP (Fabbrini et al., 2021).	38
Figure 3: Mécanisme d'action de l'inhibition de GlyT1 (Moschetti et al., 2018).....	54
Figure 4: Mécanisme d'action du MPTP (Philippens, 2017).	62
Figure 5 (modifiée): Niveaux de GlyT1 et NMDA dans la MP et la dyskinésie (Sharma et al., 2018).....	226

Liste des tableaux

Tableau 1: Exemples de symptômes moteurs et non-moteurs de la maladie de Parkinson 18

Tableau S. 1. Échelle d'évaluation des mouvements anormaux involontaires chez le rat lésé à la 6-OHDA 312

Tableau S. 2. Échelle d'évaluation de la dyskinésie induite par la L-DOPA chez le ouistiti lésé au MPTP 313

Tableau S. 3. Échelle d'évaluation de la dyskinésie induite par la L-DOPA chez le ouistiti lésé au MPTP 314

Tableau S. 4. Échelle d'évaluation des comportements de types psychotiques chez le ouistiti lésé au MPTP 315

Liste des abréviations

5-HT: sérotonine	GlyT: transporteur de la glycine
6-OHDA: 6-hydroxydopamine	GPe/GPi: globus pallidus externe/interne;
AIMS: Abnormal Involuntary Movement Scale	Hsc70: protéine de choc thermique 70 kDa
AIMs: Abnormal Involuntary Movements	IC ₅₀ : concentration inhibitrice semi- maximale
AMPA: acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4- isoxazolepropionique	IL-1 β : interleukine 1 bêta
AMPc: adénosine monophosphate cyclique	ISRS: inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine
ARNm: acide ribonucléique messenger	Ki: constante d'inhibition
ATP: adénosine triphosphate	L-DOPA : L-3,4-dihydroxyphénylalanine
BEH-AD: échelle d'évaluation des pathologies comportementales de la maladie d'Alzheimer	MAO-B: monoamine oxydase B
BHE: barrière hématoencéphalique	mGlu: récepteur métabotrope du glutamate
COMT: catéchol-O-méthyltransférase	MP: maladie de Parkinson
ERK1/2: extracellular signal-regulated kinases	MPTP: 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6- tétrahydropyridine
FDA: Food and Drug Administration	MPP ⁺ : 1-méthyl-4-phénylpyridinium
GABA: acide gamma-aminobutyrique	MSN: neurones épineux moyens
GlyA: récepteur glycinergique sensible à la strychnine	NMDA: N-méthyl-D-aspartate
GlyB: récepteur glycinergique insensible à la strychnine	PANSS: Positive And Negative Syndrome Scale
	PKA: protéine kinase A

ROS: dérivés réactifs de l'oxygène

SAS: échelle de Simpson-Angus

SNpc/pr: substantia nigra partie
compacte/réticulée

STN: noyau sous-thalamique

TEP: tomographie par émission de positrons

TNF: tumour necrosis factor

TOC: trouble obsessionnel compulsif

UPDRS: Unified Parkinson's Disease Rating
Scale

Remerciements

Tout d'abord, je remercie mon directeur de recherche le Dr Philippe Huot, de m'avoir donné l'opportunité de poursuivre mes études supérieures dans son groupe de recherche et d'être allé au-delà de ses fonctions de directeur. Ses connaissances approfondies sur les troubles du mouvement, son souci du détail, ses questions ouvertes et sa critique de mon projet ont constamment renforcé mes capacités de pensée critique scientifique et mon développement en tant que chercheuse.

Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire Huot, avec qui j'ai eu le plaisir de travailler, pour leur camaraderie et leur soutien qui ont vraiment fait de mon parcours de doctorat une expérience positive. Je tiens précisément à remercier notre ancien gestionnaire de laboratoire Dr Adjia Hamadjida pour ses conseils tout le long de mon projet, que cela soit en théorie ou en pratique, jouant ainsi un rôle déterminant dans ma formation en tant qu'étudiante graduée. Je remercie Dominique Bédard pour sa précieuse implication dans les études pharmacocinétiques et son aide dans certaines études comportementales. Je remercie aussi Woojin Kang pour les sacrifices qu'il a fait en m'accompagnant dans plusieurs étapes de mon projet et en travaillant les fins de semaine dans le cadre de mon projet, sans lui le projet n'aurait pas été si bien complété. J'aimerais également remercier mes anciens collègues Cynthia Kwan, Sébastien Belliveau et Élodie Bourgeois-Cayer avec qui j'ai eu d'innombrables discussions sur les expériences, la recherche en général et la vie en dehors de la recherche. Je remercie également mes collègues actuels Dre Margaux Teil, Esther Kim et Judy Shaqfah ainsi que tous les anciens membres du laboratoire. J'aimerais également remercier tous nos collaborateurs, Stephen G Nuara, Fleur Gaudette, Dr Francis Beaudry et Dre Lekha Sleno. Je remercie aussi Mme Lamia Ouali et Mme Julie Plourde qui ont toujours été présentes pour répondre à mes questions et préoccupations administratives. J'aimerais également remercier Parkinson Canada de m'avoir supporté financièrement lors de la complétion de ce projet.

Enfin, je suis extrêmement reconnaissante à ma famille immédiate pour son soutien et ses encouragements tout au long de cette aventure difficile mais enrichissante. Je remercie mes parents pour leur soutien continu dans ma poursuite d'études supérieures. Je remercie mon époux d'avoir toujours été présent au meilleur et au pire. Tu as fait énormément de sacrifices pour que je puisse compléter mon doctorat. Merci d'avoir été là pour moi et notre petite Izza.

*“When the cure for Parkinson’s is found — and it will be —
it will be because of all of us, working together.”*

Michael J Fox

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1. La maladie de Parkinson

1.1.1. Manifestations cliniques de la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson (MP) est un trouble neurodégénératif progressif impliquant à la fois des caractéristiques motrices et non motrices qui contribuent à la diminution de la qualité de vie des patients à mesure que la maladie progresse. Bien qu'une myriade de signes et de symptômes contribue à l'invalidité liée à la MP (**Tableau 1**), au stade précoce elle est largement caractérisée par des symptômes moteurs cardinaux, notamment le tremblement au repos, la rigidité musculaire et la bradykinésie (Moustafa et al., 2016).

Le tremblement au repos est l'un des principaux symptômes de la MP, mais son mécanisme est toujours mal compris. Il est défini comme un mouvement involontaire, rythmique et oscillatoire d'une partie du corps (Bhatia et al., 2018; Carr, 2002). La rigidité est définie par une résistance accrue lors de la mobilisation passive d'un membre, indépendamment de la direction et de la vitesse du mouvement imposé par un tonus musculaire excessif (Hess et al., 2017). La rigidité peut se présenter dans les articulations des membres supérieurs et inférieurs ainsi que dans le cou et le tronc, et est souvent décrite comme une oppression ou raideur par les personnes atteintes de la MP (HessHallett, 2017). Quant à la bradykinésie, elle définit spécifiquement la lenteur des mouvements volontaires, mais fait également référence à des mouvements de faible amplitude (hypokinésie) et à une réduction progressive de la vitesse et de l'amplitude lors de la répétition des mouvements (Berardelli et al., 2001; HessHallett, 2017).

Tableau 1: Exemples de symptômes moteurs et non-moteurs de la maladie de Parkinson

Symptômes moteurs	Symptômes non-moteurs
Tremblement	Problèmes neuropsychiatriques (dépression, apathie, hallucination, psychose, etc.)
Rigidité musculaire	Dysfonction autonome (constipation, dysphagie, dysfonction sexuelle, etc.)
Bradykinésie	Problèmes de sommeil (insomnie, trouble du comportement en sommeil paradoxal, etc.)
Instabilité posturale	Problèmes sensoriels (douleur, fatigue, dysfonction olfactive, etc.)

En plus des symptômes moteurs, les patients avec la MP peuvent également présenter une variété de symptômes non moteurs (**Tableau 1**), qui se manifestent à divers stades de la maladie (Schapira et al., 2017). Parmi ces symptômes non moteurs, les patients peuvent souffrir des troubles du sommeil avec des altérations du rapport veille-sommeil ou des troubles psychiatriques tels que les psychoses et la dépression (Aarsland et al., 2009; Ffytche et al., 2017; Lajoie et al., 2021; Ray et al., 2020).

1.1.2. Les circuits des ganglions de la base

Les ganglions de la base sont composés du striatum (noyau caudé et putamen), le globus pallidus (GP) externe et interne (GPe, GPi), le noyau sous-thalamique (STN), la substance noire

(SN) partie reticulée (SNpr) et la SN partie compacte (SNpc) (Lanciego et al., 2012). Certaines anomalies de la fonction des ganglions de la base ont été associées à la MP et la dyskinésie.

Le modèle classique (Figure 1.a) divise les neurones épineux moyens (MSNs) striataux en deux populations, les MSNs de la voie directe et de la voie indirecte, en fonction de leurs cibles de projection (DeLong, 1990). Les MSNs de la voie directe se projettent directement sur la sortie des ganglions de la base (GPi/SNpr) et expriment les récepteurs dopaminergiques de type D1 couplés à la protéine $G_{\alpha olf}$ (Deng et al., 2006; Herve et al., 1995). Ainsi, l'activation de la voie directe stimule les signaux inhibiteurs sortant du striatum qui inhiberont les neurones GABAergiques du GPi et de la SNpr, et par conséquent, désinhibe le thalamus et favorise le mouvement. En revanche, les MSNs de la voie indirecte se projettent indirectement sur la sortie des ganglions de la base via le GPe et le STN et expriment des récepteurs dopaminergiques de type D2 couplés à la protéine G inhibitrice (Deng et al., 2006; Herve et al., 1995). Ainsi, la stimulation du récepteur D2 dans la voie indirecte déclenche une réduction de l'activité du GPe grâce à des signaux inhibiteurs provenant du striatum. En conséquence, l'inhibition du STN exercée par le GPe est réduite, permettant ainsi l'émission de signaux excitateurs vers le GPi et la SNpr. Cette stimulation augmentera l'inhibition du thalamus et diminuera l'excitation corticale, ce qui empêchera le déclenchement du mouvement.

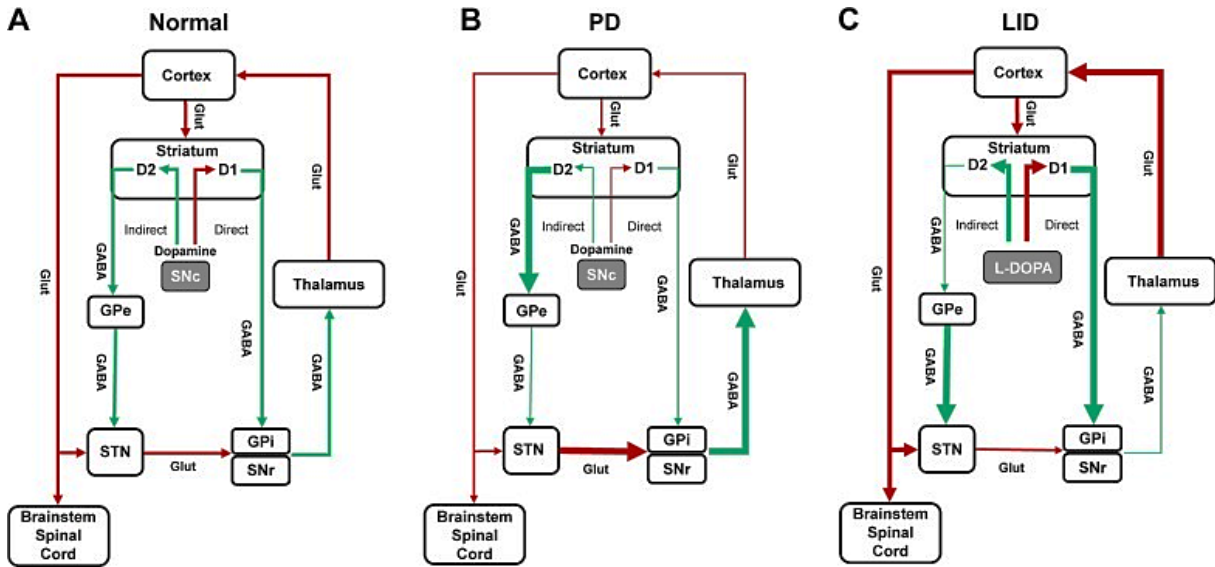


Figure 1: Le circuit des ganglions de la base (Sharma et al., 2018)

Dans la MP (Figure 1.b), la perte de dopamine provoque une activité déséquilibrée entre les deux voies au niveau striatal. Une activité excessive de la voie indirecte inhibe l'activité du GPe, augmente l'activité du STN et entraîne une augmentation de l'inhibition thalamique médiée par le GPi (DeLong, 1990; Obeso et al., 2000). Simultanément, l'inhibition de la voie directe désinhibe les neurones GPi, favorisant la suppression du thalamus et du cortex (Obeso et al., 2000; Wichmann et al., 1996), entraînant par conséquent une réduction du mouvement.

Dans la dyskinésie (Figure 1.c), l'administration chronique de la L-DOPA rend la voie directe hyperactif, menant à la surinhibition du GPi/SNpr. Cette surinhibition résulte en une inhibition réduite des neurones thalamo-corticaux et une suractivation des aires motrices corticales, menant à un excès de mouvement. Quant à la voie indirecte, elle devient hypoactive causant une désinhibition du GPe, qui conduit à son tour à une surinhibition du STN, à une réduction de la commande excitatrice du STN et à une hypoactivité dans les neurones de sortie du

complexe Gpi/SNr. Cette inhibition induit à son tour à une augmentation de l'activité thalamo-corticale, conduisant à une augmentation de la stimulation du cortex moteur.

1.1.3. Neuropathologie

Dans la MP, la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNpc et leurs projections vers le striatum est un des principaux marqueurs de la maladie (Rinne, 1993). Les projections de la SNpc vers le putamen dégèrent plus tôt que les projections vers les parties associatives ou limbiques du striatum (Biondetti et al., 2021). La perte de neurones dopaminergiques et leurs projections vers le striatum produisent les principaux symptômes moteurs de la MP et déclenchent des changements morphologiques secondaires importants (Mattay et al., 2002).

En effet, une réduction de la densité des épines dendritiques sur les MSNs est observée, ce qui peut considérablement modifier la transmission corticostriée (Gomez et al., 2019; Ingham et al., 1989; Zaja-Milatovic et al., 2005). La perte de neurones dopaminergiques déclenche également des changements dans la densité et la sensibilité des récepteurs de la dopamine (Gagnon et al., 2017). L'expression de l'acide ribonucléique messenger (ARNm) pour les récepteurs de la dopamine D2 et les sites de liaison dans le striatum est augmentée chez les patients atteints de la MP et les animaux parkinsoniens (Bezard et al., 2001; Bokobza et al., 1984; Marshall et al., 1989). De plus, la localisation des récepteurs de la dopamine dans le striatum peut également changer au sein de la cellule. En effet, la proportion de récepteurs D1 liés à la membrane plasmique est plus importante que la proportion dans le cytoplasme dans la MP par rapport à l'état sain (Guigoni et al., 2007). Plus de détails sont présentés dans la section 1.1.5.

Les projections noradrénergiques et sérotoninergiques sont également affectées dans la MP. Une étude de tomographie par émission de positrons (TEP) chez des patients atteints de la MP montrent des corrélations entre une réduction de l'activité du récepteur 5-HT1A dans le système limbique et la dépression dans la MP (Ballanger et al., 2012). Une augmentation des niveaux de SERT a également été observée dans les structures limbiques et le noyau de raphé chez des patients de la MP atteint de dépression (Boileau et al., 2008; Pagano et al., 2017; Politis et al., 2010). D'autres études ont montré une corrélation entre le dysfonctionnement de la signalisation sérotoninergique et noradrénergique avec des troubles du sommeil, des troubles de l'humeur et des déficits cognitifs dans la MP (Espay et al., 2014; Politis et al., 2015).

Une autre caractéristique pathologique de la MP est les corps de Lewy. La microscopie électronique a révélé que les corps de Lewy et les neurites de Lewy sont constitués de filaments d'alpha (α)-synucléine non ramifiés (Spillantini et al., 1998). Les corps de Lewy se trouvent dans différentes régions du cerveau, occasionnellement accompagnés d'une perte neuronale (Surmeier et al., 2017) correspondant au fardeau des symptômes. Le site le plus connu du dépôt de corps de Lewy et de neurodégénérescence est le mésencéphale, les neurones dopaminergiques de la SNpc et, dans une moindre mesure, l'aire tegmentaire ventrale (Goedert et al., 2013; Surmeier et al., 2017). La présence de corps de Lewy dans les zones limbiques et néocorticales est fortement corrélée au déclin cognitif (Horvath et al., 2013)

1.1.4. Pathophysiologie de la maladie de Parkinson

Plusieurs mécanismes jouent un rôle dans le développement et la progression de la MP, incluant le dysfonctionnement mitochondrial, la neuroinflammation, l'agrégation de l' α -synucléine et le

dysfonctionnement de l'élimination des protéines (Behl et al., 2022; Kaur et al., 2019; Picca et al., 2021).

Dysfonctionnement mitochondrial

Le dysfonctionnement mitochondrial est considéré comme un élément clé dans la pathogenèse de la MP (Moon et al., 2015). Des études *post-mortem* chez des patients avec la MP ont montré une déficience du complexe mitochondrial 1 dans la SNpc par rapport à des sujets sains (Schapira et al., 1990), ce qui démontre que le mécanisme de la chaîne de transport d'électrons a été perturbé. Le dommage observé au niveau du complexe 1 génère la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), produisant ainsi un effet cytotoxique au niveau des neurones (Indo et al., 2007). La vulnérabilité des neurones dopaminergiques de la SNpc peut également s'expliquer par le fait que ces neurones présentent une arborisation axonale considérablement plus étendue et des besoins énergétiques plus importants, ce qui se traduit par une augmentation du taux de phosphorylation oxydative mitochondriale et de la production de ROS (Pacelli et al., 2015).

Certaines toxines et pesticides produisent ce type d'altération. Une étude a montré une perte de neurones dopaminergiques à la suite de l'autopsie de personnes s'étant administrés du 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine [MPTP] (Langston et al., 1999). Il a été montré que le MPTP est absorbé par les neurones dopaminergiques à la suite de son oxydation, conduisant ainsi à l'inhibition du complexe mitochondrial 1 (Nicklas et al., 1985; Sriram et al., 1997). Des pesticides tels que la roténone et le paraquat induisent également une perte de neurones dopaminergiques chez les animaux (Tanner et al., 2011).

De plus, de nombreux gènes causant la MP jouent un rôle dans l'homéostasie mitochondriale (Sai et al., 2012). En effet, les gènes *PINK1* et *Parkin* régulent l'élimination des mitochondries dysfonctionnelles par mitophagie, un processus de dégradation sélectif des mitochondries en état normal (Ge et al., 2020). *PINK1* et *Parkin* jouent également un rôle clé dans l'immunité adaptative en inhibant la présentation des antigènes mitochondriaux (Matheoud et al., 2019; Matheoud et al., 2016). Dans le cadre de la MP, une mutation de type perte de fonction au niveau de ces gènes entraînerait une altération du contrôle de qualité mitochondriale (Ge et al., 2020; Truban et al., 2017).

Neuroinflammation

La neuroinflammation a été étroitement liée aux maladies neurodégénératives et se caractérise souvent par l'activation des cellules gliales et la surexpression de cytokines pro-inflammatoires (Chen et al., 2016; Grigoriadis et al., 2006; Heneka et al., 2015; Hirsch et al., 2012). Dans des conditions physiologiques, les cellules gliales éliminent les débris cellulaires, les substances toxiques et libèrent des facteurs neurotrophiques, jouant ainsi un rôle bénéfique (Wilton et al., 2019). Cependant, dans la MP, la microglie activée a un effet délétère sur les neurones et émet des niveaux nocifs de cytokines telles que le « *tumour necrosis factor* » (TNF- α) et interleukine 1-bêta (IL-1 β) (Long-Smith et al., 2009; Sawada et al., 2006), induisant ainsi un état neuroinflammatoire chronique qui contribue au processus neurodégénératif. Des études cérébrales *post-mortem* ont décrit l'activation de la microglie et du complément, l'infiltration des lymphocytes T et une concentration élevée de cytokines pro-inflammatoires dans la SNpc et le striatum des patients atteints de la MP par rapport à des sujets sains (Loeffler et al., 2006; McGeer et al., 1988). Chez des modèles animaux de la MP, l'inhibition de l'activation

microglicale atténue la mort des cellules dopaminergiques dans la SNpc (He et al., 2001; Jackson-Lewis et al., 2002), confirmant ainsi que l'inflammation produite à la suite de l'activation des microglies contribue à la dégénérescence observée dans la MP.

La présence d'astrocyte active joue également un rôle dans le développement de la MP. Dans des conditions physiologiques, les astrocytes fournissent un soutien structurel et métabolique et régulent la transmission synaptique, le transport de l'eau et le flux sanguin dans le cerveau (Sofroniew et al., 2010). Toutefois, les astrocytes actifs formés en réponse à un stimulus ou à des blessures dans le SNC favorisent la pathogenèse de la MP par gain de fonction toxique (Phatnani et al., 2015). Les astrocytes actifs libèrent une variété de chimiokines et de cytokines telles que TNF- α et IL-1 β , qui sont neurotoxiques (Lau et al., 2001). Plusieurs gènes affectés dans la MP sont également liés avec le dysfonctionnement des astrocytes (Booth et al., 2017). La perte de fonction de *PINK1* augmente la réponse pro-inflammatoire des astrocytes, en augmentant l'expression de NO, TNF- α et IL-1 β , causant ainsi une mort neuronale (Sun et al., 2018). Une perte de fonction de *Parkin* dans les astrocytes augmente quant à elle la libération des cytokines et réduit la sécrétion des facteurs neurotrophiques, ce qui rend les neurones plus sensibles aux neurotoxines (Solano et al., 2008). Bref, de plus en plus de preuves ont montré la contribution des cellules gliales, notamment les microglies et les astrocytes, dans la pathogenèse de la MP soit par perte de leurs fonctions homéostatiques normales ou par gain de fonctions toxiques.

α -Synucléine

L' α -synucléine est une protéine de 140 acides aminés appartenant à la famille des synucléines (Maroteaux et al., 1988). Elle est abondante au niveau du cerveau mais également présente dans d'autres tissus tels que les globules rouges (Barbour et al., 2008). En état physiologique, l' α -synucléine joue un rôle dans la libération des neurotransmetteurs (Liu et al., 2004) et dans le maintien du pool de vésicules synaptiques dans les neurones primaires de l'hippocampe (Murphy et al., 2000).

En état pathologique, l' α -synucléine adopte une structure de type amyloïde riche en feuillets β qui a tendance à s'agréger (Kalia et al., 2013). Plusieurs mécanismes ont été suggérés pour les changements conformationnels qui peuvent conduire à une agrégation anormale de l' α -synucléine, notamment la phosphorylation de la sérine 129, l'ubiquitination et la coupure de l'extrémité C-terminale de cette protéine (Ma et al., 2018; Qing et al., 2009; Rott et al., 2014). Une étude a démontré une interaction entre l' α -synucléine oligomérique et le récepteur mitochondrial TOM20 (Di Maio et al., 2016). Cette interaction a entraîné une altération de la machinerie d'importation des protéines mitochondriales, une réduction de la respiration cellulaire, une production excessive de ROS et une perte de potentiel membranaire mitochondrial (Di Maio et al., 2016). Il existe également une multitude de preuves suggérant que l' α -synucléine peut déclencher directement l'activation microgliale et par conséquent, initier des processus inflammatoires (Theodore et al., 2008; Watson et al., 2012; Zhang et al., 2017).

Mécanismes d'éliminations de protéines dysfonctionnelles

Il existe deux mécanismes d'élimination des protéines: la voie de dégradation ubiquitine-protéasome et la voie autophagie lysosomale (Wang et al., 2019). La voie de dégradation

ubiquitine-protéasome est responsable de la dégradation des protéines solubles mal repliées et des polypeptides non repliés, en les marquant avec l'ubiquitine et les transportant vers le protéasome pour la dégradation (Nandi et al., 2006). Dans la MP, une étude *post-mortem* a montré que l'activité catalytique ubiquitine-protéasome est réduite au niveau du SNpc comparativement à des sujets sains (McNaught et al., 2001). De plus, la sous-unité α du protéasome 20S et d'autres molécules impliquées dans le fonctionnement normal du système ubiquitine-protéasome, comme PA700 et PA28 (activateurs du protéasome), sont réduites dans le SNpc des patients avec la MP (McNaught et al., 2003; McNaught et al., 2002a). Une étude préclinique a rapporté une réduction de l'activité enzymatique de la voie ubiquitine-protéasome et des composantes de la sous-unité 26S chez des ouistitis lésés au MPTP (Zeng et al., 2006b). D'autres études ont également démontré que l'inhibition du protéasome chez des rats sains induit une mort des cellules dopaminergiques (McNaught et al., 2002b; Zeng et al., 2006a). Ainsi, un dysfonctionnement de la voie de dégradation ubiquitine-protéasome représente un mécanisme pathogène potentiel pour la MP.

Pour ce qui est de l'autophagie, c'est une voie de dégradation qui transporte le contenu cytoplasmique aux lysosomes pour la dégradation (Mizushima, 2007). Elle représente une voie majeure d'élimination des protéines cellulaires agrégées et des organites dysfonctionnels (Mizushima, 2007). Dans la MP, une activité autophagique aberrante a été observée dans le SNpc des patients avec la MP, montrant une réduction de la protéine membranaire des lysosomes LAMP2A et de la chaperonne « *Heat shock cognate* »70 kDa (Hsc70) (Alvarez-Erviti et al., 2010). Certaines études ont montré qu'une augmentation de l' α -synucléine peut altérer la synthèse de l'autophagosome en inhibant Rab1a, une protéine chargée du transport de protéines (Winslow et al., 2010). De plus, les agrégats d' α -synucléine préformés peuvent

interférer avec l'élimination de l'autophagosome et résistent à la dégradation par l'autophagie (Tanik et al., 2013). Ainsi, le dysfonctionnement de la voie autophagie-lysosomale peut aggraver la progression de la MP en élevant les niveaux d'agrégats extracellulaires d' α -synucléine et en favorisant sa propagation.

1.1.5. Traitements symptomatiques

L-DOPA

La L-3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) est le principal traitement de la MP et est le plus efficace pour les symptômes moteurs (Fox et al., 2011). La L-DOPA traverse la barrière hémato-encéphalique et est convertie en dopamine dans les neurones dopaminergiques restants de la SNpc (Riederer et al., 2007). Elle est généralement administrée sous forme de comprimés plusieurs fois par jour, mais peut également être administrée par perfusion duodénale chez les patients à un stade avancé de la maladie, fournissant une amélioration significative des symptômes (Antonini et al., 2010; Buongiorno et al., 2015). Toutefois, la L-DOPA provoque des effets secondaires périphériques comme les nausées et l'hypotension (Schapira et al., 2009). Ces effets secondaires peuvent être évités par un inhibiteur de la décarboxylase périphérique (carbidopa ou benserazide) (Schapira et al., 2009). D'autres effets secondaires comprennent la somnolence, la confusion, les hallucinations et les troubles du contrôle des impulsions, tels que l'hypersexualité, les achats compulsifs, et l'utilisation compulsive de jeux de hasard (Beaulieu-Boire et al., 2015). Cependant, la principale limitation de la L-DOPA est le développement de complications motrices telles que les fluctuations motrices et les dyskinésies (Fox et al., 2008).

Le développement de complications motrices en réponse à la L-DOPA est lié à la sévérité de la neurodégénérescence dopaminergique (plus sévère, plus à risque), à de hautes doses de L-DOPA (>400 mg par jour), au sexe féminin et au faible poids (lié à la dose/kg) (Olanow et al., 2013). Une formulation de L-DOPA-carbidopa à libération prolongée a été développée afin de réduire les fluctuations motrices (Dhall et al., 2016). Dans la MP avancée, lorsque les complications motrices deviennent invalidantes et sont mal contrôlées par un traitement pharmacologique classique, la L-DOPA peut être administrée sous forme de gel de L-DOPA-carbidopa directement dans le duodénum par pompe à travers un cathéter de gastrostomie (Buongiorno et al., 2015). Il a été démontré que cette formulation réduisait significativement les fluctuations motrices dans la MP avancée (Buongiorno et al., 2015). Les effets indésirables potentiels sont liés à la procédure chirurgicale et au système de perfusion lui-même (Fernandez et al., 2011).

Agonistes dopaminergiques

Cliniquement, le ropinirole (un agoniste du récepteur D2) et le pramipexole (un agoniste du récepteur D2 et un agoniste partiel des récepteur D3 et D4) sont administrés par voie orale; des formulations à libération immédiate et prolongée sont disponibles (Mizuno et al., 2012; Shill et al., 2009). Quant à la rotigotine (agoniste non sélectif des récepteurs D1, D2 et D3), elle est administrée sous forme de dispositif transdermique, une fois par jour (Raeder et al., 2021). L'apomorphine (agoniste des récepteurs D1 et D2) a une courte durée d'activité, et par conséquent ne peut être administrée que par voie sous-cutanée sous forme d'injection ou sublinguale pour les épisodes OFF aigus, ou par perfusion sous-cutanée continue pour réduire

les fluctuations motrices dans la MP avancée (Carbone et al., 2019; Frankel et al., 1990; Olanow et al., 2020).

Les agonistes dopaminergiques stimulent directement les récepteurs dopaminergiques postsynaptiques (D1, D2 et D3) dans le striatum sans nécessiter de métabolisme supplémentaire dans les neurones dopaminergiques (Quinn, 1995). Toutefois, ils ne sont pas aussi efficaces pour inverser les symptômes moteurs que la L-DOPA, mais ils sont associés à un risque moindre de dyskinésie (Parkinson Study Group, 2000b; Stocchi, 2011). Ils sont utilisés en monothérapie dans les phases précoces de la maladie et en combinaison avec la L-DOPA au fil du temps (Fox et al., 2011). Les effets secondaires sont similaires à ceux de la L-DOPA, mais comprennent également des œdèmes aux jambes, ainsi que des troubles du contrôle des impulsions incluant l'hypersexualité et l'utilisation compulsive de jeux de hasard (Stocchi et al., 2020; Wood, 2010).

Inhibiteurs de la monoamine oxydase B

Le potentiel thérapeutique des inhibiteurs de la monoamine oxydase B (MAO-B) repose sur leur capacité à diminuer le métabolisme de la dopamine et ainsi prolonger et potentialiser la stimulation dopaminergique (Shih et al., 1999). La rasagiline et la sélégiline sont les inhibiteurs irréversibles les plus utilisés. Dans les stades précoces de la MP, ils sont utilisés en monothérapie car ils offrent une légère amélioration symptomatique avec moins de complications que la L-DOPA (Pålhagen et al., 2006), tandis qu'au stade avancé, ils sont utilisés en association avec d'autres médicaments pour réduire les fluctuations motrices et les besoins en L-DOPA (Cereda et al., 2017; Lew et al., 2007; Rascol et al., 2005; Sivertsen et al., 1989).

Le safinamide est un inhibiteur réversible de la MAO-B, qui agit également en bloquant les canaux sodiques voltage-dépendants, en modulant les canaux calciques et en inhibant la libération de glutamate (Caccia et al., 2006). Cet inhibiteur est une nouvelle option pour traiter les fluctuations motrices au stade avancé de la MP (Borghain et al., 2014; Stocchi et al., 2012), démontrant un meilleur contrôle des symptômes de la fonction motrice. De plus, le safinamide a montré un effet anti-dyskinétique dans des modèles animaux (Grégoire et al., 2013).

Inhibiteurs de catéchol-O-méthyl transférase

Les inhibiteurs de l'enzyme catéchol-O-méthyl-transférase (COMT) empêchent le catabolisme de la L-DOPA en périphérie, réduisant ainsi son élimination et augmentant par conséquent sa biodisponibilité (Goetz, 1998). En clinique, les inhibiteurs de la COMT tels que l'entacapone et l'opicapone sont administrés comme traitement adjuvant à la L-DOPA pour améliorer les fluctuations motrices (Brooks et al., 2003; Kurth et al., 1998; Lees et al., 2019).

Anticholinergiques

Avant la découverte de la L-DOPA, les médicaments anticholinergiques tels que la trihexyphénidyle et la benztropine, étaient les principaux traitements de la MP (Pagano et al., 2015). Les patients montraient une amélioration significative des symptômes moteurs (Pagano et al., 2015). Malheureusement, les anticholinergiques administrés peuvent induire des symptômes comme le dysfonctionnement de la marche et les troubles cognitifs, limitant davantage leur utilité clinique (Ruxton et al., 2015). En revanche, selon une méta-analyse, les traitements qui améliorent la transmission cholinergique tels que les inhibiteurs de

l'acétylcholinestérase comme la rivastigmine, le donépézil et la galantamine, améliorent la fonction cognitive et les troubles du comportement mais augmentent les tremblements (Pagano et al., 2015).

Amantadine

L'amantadine est un antagoniste non compétitif des récepteurs du glutamate de type N-méthyl-D-aspartate (NMDA) avec une affinité pour une multitude de cibles pharmacologiques, notamment les canaux potassiques, les récepteurs sérotoninergiques (5-HT) 3, les récepteurs nicotiques $\alpha 4\beta 2$ et les récepteurs sigma 1 (Matsubayashi et al., 1997; Peeters et al., 2004; Rammes et al., 2001; Shen et al., 2020). L'administration d'amantadine par voie orale à libération immédiate, en monothérapie ou en adjuvant de la L-DOPA, est reconnu comme traitement efficace des symptômes moteurs de la MP (Bauer et al., 1974; Dallos et al., 1970). Elle est principalement prescrite en monothérapie au stade précoce de la MP (Kong et al., 2017). Son efficacité antiparkinsonienne globale est modérée, mais semble être similaire à celle des inhibiteurs de la MAO-B. Contrairement aux anticholinergiques qui agissent seulement sur les tremblements et la rigidité, l'amantadine améliore toutes les caractéristiques motrices cardinales de la MP. Ses effets secondaires comprennent les hallucinations et la confusion (Kong et al., 2017).

1.2. Complications induites par la L-DOPA

1.2.1. La dyskinésie induite par la L-DOPA

La dyskinésie est une complication motrice survenant chez les patients atteints de la MP après une administration chronique de L-DOPA (Ahlskog et al., 2001). La dyskinésie est principalement reconnue comme des mouvements de chorée apparaissant initialement du côté du corps le plus affecté (Fabbrini et al., 2007). Elle survient chez 40 % des patients après 4 ans de traitement à la L-DOPA, avec un risque particulièrement élevé chez les patients plus jeunes traités avec des doses plus élevées et peut atteindre jusqu'à 89% des patients après 10 ans d'administration (AhlskogMuentner, 2001; Schrag et al., 2006).

Manifestations cliniques

La dyskinésie induite par la L-DOPA est une complication de la MP qui peut être composée d'une combinaison de troubles du mouvement tels que la chorée, dystonie et le ballisme (Fabbrini et al., 2007). Les dyskinésies les plus fréquentes sont la chorée et la choréoathétose (Markham, 1971). La chorée affecte fréquemment les membres et se développe généralement du côté du corps où les premiers symptômes de la MP sont apparus (Luquin et al., 1992). La chorée affecte parfois le visage, le cou ou tout le corps (Müller et al., 2006). Dans des cas sévères, une dyskinésie caractérisée par des mouvements répétitifs et alternés, peut combiner chorée, ballisme et mouvements stéréotypés (Luquin et al., 1992).

La dyskinésie peut également prendre la forme d'une dystonie (Encarnacion et al., 2008). Les membres inférieurs sont plus fréquemment touchés. Les manifestations les plus courantes de la dystonie comprennent l'extension du gros orteil et l'inversion du pied au niveau de la cheville

(Fabbrini et al., 2007; Melamed, 1979). La dystonie peut être observée dans trois états différents:

- L'état ON, qui se présente sous la forme de mouvements involontaires qui coïncident avec le pic de l'effet antiparkinsonien de la L-DOPA (Espay et al., 2018). Ces mouvements sont exprimés par des contractions spasmodiques dans les muscles des membres supérieurs et du cou (EncarnacionHauser, 2008);
- L'état OFF, décrit comme une dystonie douloureuse au niveau d'un pied ou d'un orteil au réveil et se produit lors d'une baisse de la stimulation dopaminergique du cerveau (Vidailhet et al., 1999);
- L'état diphasique, caractérisé par des mouvements involontaires des jambes sous forme alternatifs et répétitifs qui apparaissent avant que le patient n'atteigne la période ON et réapparaissent à la fin de cette période (EncarnacionHauser, 2008; Muenter et al., 1977).

Quant au ballisme, il se caractérise par des mouvements involontaires répétitifs d'amplitude très importante pouvant impliquer les régions proximales d'un seul membre (unilatéral) ou des deux membres (bilatéral) ou de l'ensemble d'un demi-corps (hémiballisme) et il est souvent associé à une chorée (Bologna et al., 2022).

Pathophysiologie

Système dopaminergique

Le principal facteur responsable du développement de la dyskinésie dans la MP est le degré de dénervation dopaminergique dans la voie nigro-striée (Sharma et al., 2010). En effet, des études

expérimentales ont démontré que l'administration de L-DOPA chez des animaux présentant une dénervation nigro-striée sévère détermine l'émergence de la dyskinésie dès les premières doses du médicament (Bedard et al., 1986; Di Monte et al., 2000; Pearce et al., 1995). En revanche, l'administration chronique d'un traitement dopaminergique dans des conditions caractérisées par une voie nigro-striée intacte n'a pas entraîné de dyskinésie (Di Monte et al., 2000). Cependant, une dénervation dopaminergique sévère n'est pas suffisante en soi pour provoquer le développement de la dyskinésie (Guigoni et al., 2005; Huot, 2015).

Dans les stades précoces de la maladie, les neurones dopaminergiques intacts assurent la conversion de la L-DOPA en dopamine et son stockage par la suite, permettant le maintien de concentration de dopamine à des niveaux physiologiques au niveau extracellulaire (Carta et al., 2018). Dans les stades avancés de la MP, et à la suite d'une dénervation dopaminergique sévère, la conversion et la libération de la dopamine semblent s'effectuer dans les terminaisons axonales sérotoninergiques (Navailles et al., 2010; Navailles et al., 2012). Les neurones sérotoninergiques ne disposent pas de la machinerie nécessaire pour le contrôle de rétroaction et la régulation de la libération de la dopamine, ce qui pourrait potentiellement entraîner une oscillation anormale des niveaux de dopamine extracellulaire après administration de la L-DOPA (CartaBjorklund, 2018).

L'utilisation de la L-DOPA affecte non seulement les neurones, mais également divers composants gliaux des noyaux gris centraux et du mésencéphale (Bortolanza et al., 2015; Inyushin et al., 2012). La L-DOPA s'accumule principalement dans les corps cellulaires des astrocytes, les extrémités des astrocytes autour des vaisseaux sanguins et les péricytes (Inyushin et al., 2012). Les astrocytes striataux servent de réservoir à la L-DOPA, ainsi ils sont capables

de l'absorber ou de la libérer en fonction des concentrations extracellulaires (Inyushin et al., 2012). Les astrocytes peuvent également convertir la L-DOPA en dopamine par décarboxylation, mais une décarboxylation non régulée peut contribuer à la toxicité (Juorio et al., 1993). Chez des rats lésés à la 6-OHDA et recevant de la L-DOPA, une hypertrophie des corps cellulaires des astrocytes et une augmentation du nombre d'astrocytes sont observées, indiquant une gliose réactive (Bortolanza et al., 2015). Ce phénomène était limité à l'hémisphère ipsilatéral à la lésion, nécessitant à la fois une dénervation dopaminergique et un traitement chronique à la L-DOPA pour son expression (Bortolanza et al., 2015).

La combinaison d'une dénervation dopaminergique sévère et de l'absence de stimulation dopaminergique tonique physiologique dans le circuit nigrostrié provoque des altérations de la signalisation par les récepteurs dopaminergiques. La sensibilisation des récepteurs D1 ainsi que leur cascade de signalisation ont été associées à la dyskinésie (Heiman et al., 2014). En effet, des études ont montré qu'une hyperactivation intracellulaire des voies de signalisation des kinases régulées par des signaux extracellulaires 1 et 2 (ERK1/2) et adénosine monophosphate cyclique (AMPC)/protéine kinase AMPC-dépendante (PKA) des neurones striataux contribuent à l'hyperactivité du récepteur D1 dans la dyskinésie (Heiman et al., 2014). Plusieurs études précliniques ont rapporté que l'activation des récepteurs D1 entraîne le développement des dyskinésies chez différents modèles animaux, ce qui renforce leur rôle dans la dyskinésie (Blanchet et al., 1996a; Darmopil et al., 2009; Perez et al., 2017).

Les niveaux du récepteur D2 sont élevés dans le striatum chez les rats lésés à la 6-hydroxydopamine (6-OHDA), les primates non-humains lésés au MPTP et les patients avec la MP qui n'ont jamais reçu de L-DOPA comme traitement (Creese et al., 1977; Graham et al.,

1993; Lee et al., 1978). Toutefois, cette augmentation est renversée après une administration chronique de L-DOPA. Plusieurs études expérimentales ont rapporté que l'activation des récepteurs D2 induit des dyskinésies. En effet, l'administration de bromocriptine ou ropinirole a induit la dyskinésie chez les primates lésés au MPTP et les patients avec la MP (Blanchet et al., 1993; Pearce et al., 1998; Rascol et al., 2000).

Enfin, les modifications de l'activité des récepteurs D3 jouent également un rôle dans la dyskinésie. Chez les rats lésés à la 6-OHDA, l'augmentation des niveaux de récepteurs D3 dans le striatum dorsal est associée à la dyskinésie (Bordet et al., 1997). Deux études dans des modèles d'inactivation du gène du récepteur D3, ont montré une réduction de la dyskinésie (Lanza et al., 2021; Solís et al., 2017). Une étude TEP a montré une augmentation de l'expression des récepteurs D3 en utilisant le radioligand [11C]PHNO, dans le striatum dorsal des patients avec la MP traités chroniquement avec la L-DOPA et dans le GP chez les patients dyskinétiques (Payer et al., 2016). Des études récentes ont suggéré qu'une interaction entre les récepteurs D1 et D3 contribue à la dyskinésie. En effet, une suractivation du récepteur D3 semble affecter fonctionnellement la voie du récepteur D1 (Lanza et al., 2021).

En résumé, la dyskinésie est influencée par la dénervation dopaminergique, les altérations de la signalisation des récepteurs dopaminergiques (notamment D1, D2 et D3) et des modifications dans la conversion de L-DOPA en dopamine. Ces éléments ajoutent de la complexité à la dyskinésie et représentent des domaines d'intérêt dans les études relatives à la MP.

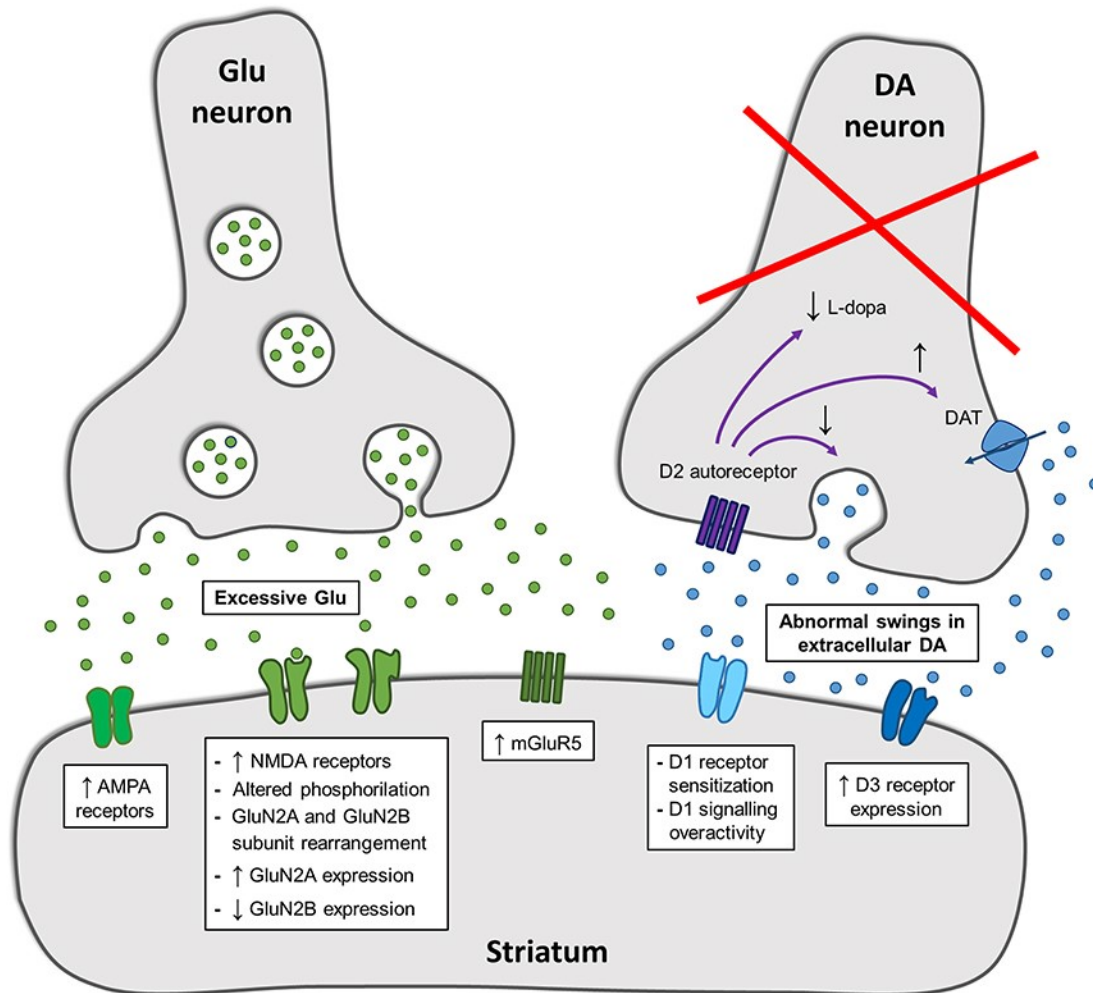


Figure 2: Modifications dans les synapses dopaminergiques et glutamatergiques dans la MP (Fabbrini et al., 2021).

Système glutamatergique

Outre les mécanismes dopaminergiques, des altérations de plusieurs systèmes non dopaminergiques ont été liées à la physiopathologie des dyskinésies au cours des deux dernières décennies. Premièrement, une hyperactivation de la neurotransmission glutamatergique a été

observée à plusieurs niveaux dans le circuit des ganglions de la base-thalamo-cortical (Sgambato-Faure et al., 2012).

Des quantités excessives de récepteurs NMDA et acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique (AMPA) sont exprimés dans le striatum des patients avec la MP et des animaux atteints de dyskinésie (Calon et al., 2003; Sgambato-FaureCenci, 2012). Une étude en neuroimagerie a montré une augmentation des niveaux de glutamate associé au récepteur NMDA dans le striatum et les aires corticales motrices chez les patients dyskinétiques à la suite de l'administration de la L-DOPA, comparativement aux patients non-dyskinétiques (Ahmed et al., 2011). Ainsi, le rôle du glutamate dans la dyskinésie est bien documenté.

Des modifications structurelles et fonctionnelles ont également été observées au niveau du récepteur NMDA chez des modèles expérimentaux de la MP. En effet, une augmentation de l'activité excitatrice du glutamate dans les synapses cortico-striées a été observée à la suite de la surexpression de GluN2A et de la réduction de l'expression de GluN2B, deux sous-unités du récepteur NMDA, dans le striatum (Hallett et al., 2005). Conformément à ces observations, un essai clinique randomisé, en double aveugle, contrôlé contre placebo, a réaffirmé que le blocage de la sous-unité GluN2B avec l'antagoniste CP-101,606, réduit la dyskinésie induite par la L-DOPA chez des patients avec la MP (Nutt et al., 2008). D'autres études cliniques ont également démontré que le blocage du récepteur NMDA avec des antagonistes tels qu'amantadine, mémantine et dextrométhorphan, réduit la dyskinésie (Kim et al., 2018; Pahwa et al., 2015).

L'implication des récepteurs métabotropes du glutamate (mGlu) dans la physiopathologie de la dyskinésie a également été démontrée, et il a été découvert que les récepteurs mGlu modulent la signalisation intracellulaire sans affecter l'action excitatrice du glutamate sur la neurotransmission synaptique. Les récepteurs du groupe I (mGluR1 et mGluR5) amplifient les

courants du récepteur NMDA et augmentent l'activité de la voie liée au récepteur D1, tandis que la stimulation du groupe II (mGluR2, mGluR3) inhibe la libération de glutamate dans les terminaux cortico-striés et sous-thalamo-nigraux, et que l'activation du groupe III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8) réduit la neurotransmission glutamatergique dans le GP.

Des études animales ont montré que les niveaux striataux de mGluR5 augmentent en fonction du développement de la dyskinésie (Samadi et al., 2008; Sanchez-Pernaute et al., 2008). De même, l'expression de mGluR5 est augmentée dans le putamen et le GP des patients dyskinétiques parkinsoniens (Ouattara et al., 2011). Conformément à ces données, plusieurs antagonistes du mGluR5 se sont avérés efficaces dans la réduction de la dyskinésie et de son développement dans divers modèles animaux de PD ainsi que dans le cadre d'études cliniques (Bezard et al., 2014; Levandis et al., 2008; Rylander et al., 2010; Tison et al., 2013; Tison et al., 2016). L'activation des récepteurs mGluR2/3 a montré une réduction de la dyskinésie et son développement chez deux modèles animaux (Frouni et al., 2019a; Hamadjida et al., 2020). Une étude a montré que l'activation des récepteurs mGluR4 peut également réduire la sévérité de la dyskinésie chez des primates non-humains (Frouni et al., 2023). Bien que prometteurs, ces résultats restent largement préliminaires et d'autres études mieux contrôlées sont nécessaires pour confirmer l'implication des récepteurs mGlu dans la pathophysiologie de la dyskinésie.

Traitements

Amantadine

L'amantadine est un antagoniste non sélectif des récepteurs NMDA (Hubsher et al., 2012) . Il est largement reconnu comme le médicament le plus efficace pour la dyskinésie (Fox et al., 2011; Goetz et al., 2005). Des études cliniques ont montré que l'amantadine peut diminuer la

sévérité de la dyskinésie sans réduire l'effet antiparkinsonien de la L-DOPA (Oertel et al., 2017; Pahwa et al., 2017; Pahwa et al., 2015; Sawada et al., 2010). Une étude randomisée et contrôlée contre placebo a montré que l'amantadine continue d'être efficace dans le traitement de la dyskinésie pendant plus d'un an sans s'estomper, un effet qui a été également observé dans une autre étude, en double aveugle, contrôlée contre placebo (Metman et al., 1999; Wolf et al., 2010). Toutefois, l'arrêt du traitement a été associé à une augmentation de la sévérité de la dyskinésie (Wolf et al., 2010). Les principaux effets secondaires de l'amantadine sont des troubles psychiatriques, limitant ainsi son utilisation (Postma et al., 1975).

Clozapine

La clozapine est un antipsychotique atypique non sélectif qui présente une forte affinité pour les récepteurs 5-HT_{2A}, muscariniques 1 (M₁) et alpha-1 (α 1) adrénergiques et une faible affinité pour les récepteurs 5-HT_{1A} et D₂ (Meltzer, 1994). La clozapine produit un effet anti-dyskinétique chez les patients aux stades avancés de la maladie (Durif et al., 2004). Dans une étude randomisée, la clozapine a montré une réduction des périodes ON avec dyskinésie comparativement au groupe placebo (Durif et al., 2004). Le principal effet secondaire de la clozapine est l'agranulocytose accompagnée d'une augmentation des éosinophiles (Alvir et al., 1993; Durif et al., 2004; Marchel et al., 2017). Bien que cet effet secondaire disparaisse rapidement après le retrait de la clozapine, il rend l'utilisation de la clozapine à long terme inappropriée pour certaines personnes.

1.2.2. Les psychoses dans la maladie de Parkinson

Outre les principaux symptômes moteurs, la MP peut être associée à un large éventail de symptômes non moteurs, notamment des troubles psychiatriques (Chaudhuri et al., 2006). Les symptômes de psychoses sont fréquents chez les patients atteints de MP (Chang et al., 2016). Longtemps considérés comme de simples effets secondaires des traitements dopaminergiques, les psychoses sont désormais considérées comme le résultat d'interactions complexes entre la maladie et les effets liés au traitement (Fénelon, 2008). La psychose touche près de 50 à 60% des patients avec la MP (Fénelon et al., 2010; Forsaa et al., 2010). Une étude a rapporté que la prévalence de la psychose passe de 3% à 10% chez les patients atteints avec la MP en seulement deux ans à la suite du diagnostic initial (de la Riva et al., 2014). De plus, la psychose est associée à une réduction de la qualité de vie, une augmentation du stress des soignants, une augmentation de placement en maison de retraite ainsi que qu'une augmentation du risque de mortalité (de Lau et al., 2014; Martinez-Martin et al., 2015).

Manifestations cliniques

Les psychoses les plus fréquentes dans la MP sont les hallucinations, les délires, les illusions et les sensations de présence (Weintraub et al., 2022).

Les hallucinations observées dans la MP sont souvent visuelles, avec des images persistantes (animaux, personnes, objets) superposées à l'environnement entourant (Fénelon et al., 2000). Une étude longitudinale a montré que les hallucinations visuelles peuvent affecter jusqu'à 74% des patients avec la MP (Biglan et al., 2007; Fénelon et al., 2000; Hely et al., 2008; Williams et al., 2008). D'autres types d'hallucinations peuvent également être présentes telles

qu'auditive, tactile, gustative et olfactive (Fénelon et al., 2002; Inzelberg et al., 1998; Solla et al., 2022).

Les délires sont moins fréquents que les hallucinations dans la MP, avec une prévalence estimée allant jusqu'à 16 % (Factor et al., 2014; Lee et al., 2012). Toutes les formes de délires peuvent être observées avec la MP, bien que les délires de jalousie et de persécution (sentiment d'être surveillé et agressé) soient les plus largement rapportés et représentent un plus grand défi pour le traitement (Marsh et al., 2004). Ces délires peuvent conduire à l'agressivité, ce qui peut poser un risque sérieux pour la sécurité de la personne atteinte, des membres de sa famille et du personnel soignant.

Les illusions et les sensations de présence sont collectivement appelées « hallucinations mineures » et sont observées chez presque 40 % des patients aux stades précoces de la maladie (Williams et al., 2008). Les illusions sont de type visuel et incluent la kinétopsie et l'identification erronée d'objets (Nishio et al., 2018). La kinétopsie est lorsque le patient perçoit des objets inanimés en mouvement (Nishio et al., 2018). Quant aux illusions d'identification erronée d'un objet, le patient perçoit un certain objet comme un objet différent (Nishio et al., 2018). Les illusions sont présentes chez presque 47% des patients avec la MP (Williams et al., 2008). Les sensations de présence sont la sensation vive que quelqu'un, connu ou inconnu, est présent à proximité alors que personne n'est pas réellement présente, et ce en absence de stimuli externes (Fénelon et al., 2011). Elles sont présentes chez 46% des patients avec la MP (Williams et al., 2008).

Pathophysiologie

Une variété de facteurs contribue au développement des symptômes de psychoses dans la MP, incluant les traitements dopaminergiques, un dysfonctionnement visuel, le trouble du sommeil et des anomalies neurochimiques.

Traitements dopaminergiques :

Plusieurs traitements contre la MP ont été impliqués dans l'apparition de caractéristiques psychotiques, et ces caractéristiques disparaissent souvent après la réduction ou l'élimination du traitement (Celesia et al., 1970; Goetz et al., 1982b; Kulisevsky et al., 2010; Montastruc et al., 2000). En effet, une étude a comparé la propension relative de la L-DOPA et des agonistes dopaminergiques à induire un comportement de type psychotique dans un modèle animal de MP, concluant que les deux types de traitement ont un potentiel similaire pour provoquer ces symptômes (Fox et al., 2006). D'autres maladies, comme la démence à corps de Lewy (DCL), présentent des hallucinations à la suite de l'administration de traitements antiparkinsoniens (Archie et al., 2013). La DCL est une maladie neurodégénérative complexe et débilitante caractérisée par un large éventail de symptômes cognitifs, comportementaux et neurologiques qui peuvent être cliniquement et pathologiquement difficile à distinguer de la maladie de Parkinson accompagnée de démence (Tsuboi et al., 2005). Pour traiter le parkinsonisme associé à la DCL, la lévodopa est administrée mais un ajustement des doses administrées est essentiel pour éviter d'exacerber les hallucinations visuelles ou de provoquer une agitation (Fernandez et al., 2003; Goldman et al., 2008). Quant aux agonistes dopaminergiques, comme le pramipexole et le ropinirole, ils ne sont généralement pas préférés dans la DCL en raison de leur potentiel à induire des hallucinations et de la somnolence (Fernandez et al., 2003).

Dysfonctionnement visuel :

Les hallucinations visuelles sont souvent associées aux corps de Lewy déposés dans le lobe temporal, et spécifiquement dans l'amygdale et le gyrus parahippocampique (Harding et al., 2002; Papapetropoulos et al., 2006). Les patients de la MP présentant des hallucinations visuelles ont souvent une acuité visuelle plus faible et des déficits de reconnaissance des couleurs et des contrastes (Diederich et al., 1998; Holroyd et al., 2001). Des études d'IRM fonctionnelle suggèrent une réduction des signaux rétiniens-striatal-corticaux chez les patients avec des hallucinations, conduisant à la libération d'images générées en interne (Holroyd et al., 2006; Stebbins et al., 2004). Il a été proposé qu'une déficience en dopamine dans la rétine est liée aux hallucinations visuelles dans la MP et la DCL. Cette déficience peut agir comme un facilitateur pour l'apparition des hallucinations dans la MP.

Troubles du sommeil :

De plus, les psychoses sont associées aux troubles du sommeil. Une étude menée auprès de patients de la MP a révélé une relation entre les hallucinations visuelles et un sommeil paradoxal court et fragmenté (Pappert et al., 1999). En effet, les patients souffrant d'hallucinations présentaient une qualité de sommeil inférieure et une durée et un pourcentage de sommeil paradoxal total réduits par rapport aux patients ne souffrant pas d'hallucinations.

Anormalités neurochimiques :

- Système dopaminergique

Il existe une dégénérescence importante des neurones dopaminergiques dans l'aire tegmentaire ventrale dans la MP et avec la progression de la maladie, les projections vers le striatum ventral et les régions méso-cortico-limbiques sont de plus en plus affectées (Alberico et al., 2015; Hornykiewicz et al., 1987). Une hypersensibilisation des récepteurs de la dopamine dans la voie méso-cortico-limbique après une stimulation chronique semble augmenter la susceptibilité à développer des psychoses (Goetz et al., 1982a; Papapetropoulos et al., 2005). En effet, cela peut entraîner un dysfonctionnement de structures limbiques responsables dans l'attribution d'une signification émotionnelle aux informations sensorielles (Goetz et al., 1982a; Moskowitz et al., 1978a; Wolters, 1999). Ainsi, un traitement anormal de l'information pourrait conduire à une attribution erronée de stimuli internes comme provenant d'informations sensorielles externes (PapapetropoulosMash, 2005).

Il est important de noter que la psychose de la MP n'est pas exclusivement médiée par la thérapie dopaminergique; plusieurs systèmes de neurotransmission sont également impliqués dans son étiologie (ChangFox, 2016; Frouni et al., 2019a; Kwan et al., 2021b; Sid-Otmane et al., 2020; Stahl, 2016).

- Système glutamatergique

Plusieurs études ont lié le glutamate au développement de la psychose dans la MP. En effet, une diminution de l'activité glutamatergique accompagnée d'une augmentation de la fonction dopaminergique peut entraîner des hallucinations (Mehler-Wex et al., 2006). Une étude utilisant la spectroscopie par résonance magnétique à protons a révélé que les niveaux de glutamate dans la région dorsale du caudé et du putamen étaient plus faibles chez les patients avec la MP atteints

de psychose que chez ceux sans psychose (Rodríguez-Violante et al., 2015). Ces résultats ont été soutenus par les effets indésirables, tels que les hallucinations visuelles, causés par l'amantadine et la mémantine, deux antagonistes des récepteurs NMDA, qui sont administrés pour le traitement des symptômes moteurs dans la MP et les dyskinésies (Hauser et al., 2017; Litvinenko et al., 2010; Varanese et al., 2010).

Dans des études ayant ciblé les récepteurs métabotropes, en activant le récepteur mGluR2 par le LY-487,379 ou le LY-354,740 ou le CBiPES, ont montré une réduction des symptômes de type psychotiques induites par la L-DOPA chez des ouistitis lésés au MPTP (Frouni et al., 2019a; Frouni et al., 2021b; Nuara et al., 2020; Sid-Otmane et al., 2020). D'autres études sont nécessaires pour étudier l'action thérapeutique potentielle du récepteur mGluR2 dans la psychose de la MP.

Traitements

Clozapine

Dans un essai de phase III en double aveugle contrôlé par placebo, des faibles doses de clozapine (6,25 à 50 mg/jour) ont démontré un effet antipsychotique par rapport au placebo sans exacerber les symptômes moteurs chez 60 patients avec la MP sur une période de 4 semaines (Parkinson Study Group, 1999). Dans un essai ouvert de 3 mois post-traitement chez 53 patients, la clozapine a été arrêtée chez un patient en raison d'une leucopénie et 6 décès, non liés à la clozapine, sont survenus (Parkinson Study Group, 1999). Un essai de phase III en double aveugle contre placebo a utilisé une méthodologie similaire et a rapporté des résultats comparables, la clozapine (6,25 à 50 mg/jour) a entraîné une amélioration significative de la

psychose chez 60 patients avec la MP pendant 4 semaines et n'a pas aggravé l'incapacité parkinsonienne (French Clozapine Parkinson Study Group, 1999). De plus, une méta-analyse d'études publiées évaluant l'efficacité de la clozapine (3,25 à 400 mg/jour) chez les patients avec la MP a rapporté une résolution partielle des symptômes psychotiques chez plus de 80% des patients sans exacerber les symptômes moteurs (Factor et al., 1995). Bien que l'utilisation de la clozapine ait été jugée comme efficace avec un risque de sécurité acceptable, la clozapine n'est pas prescrite comme traitement de première ligne en raison de risque d'agranulocytose, qui peut être fatale, et nécessite une surveillance spécialisée du nombre de neutrophiles (Alvir et al., 1993; Seppi et al., 2019).

Quétiapine

La quétiapine est un antipsychotique atypique qui présente une affinité relativement plus élevée pour les récepteurs 5-HT_{2A} et α 1-adrénergiques avec une affinité modérée pour les récepteurs D₂ (Richelson et al., 2000). Plusieurs essais ouverts ont évalué l'efficacité à court et à long terme de la quétiapine (12,5 à 800 mg/jour) dans la psychose de la MP et ont trouvé un bénéfice significatif sur les symptômes de la psychose sans aggraver la fonction motrice (Fernandez et al., 1999; Juncos et al., 2004; Reddy et al., 2002; Targum et al., 2000). Malgré les résultats positifs des essais ouverts, trois études contrôlées randomisées qui ont évalué l'efficacité de la quétiapine chez les patients parkinsoniens n'ont pas montré d'amélioration des symptômes de la psychose par rapport au placebo (Ondo et al., 2005; Rabey et al., 2007; Shotbolt et al., 2010). Malgré l'insuffisance des preuves de son efficacité dans la psychose de la MP, la quétiapine a été largement prescrite comme traitement de première ligne avant l'approbation de la pimavansérine par la Food and Drug Administration (FDA), en raison de l'absence

d'exacerbation de la fonction motrice et d'un risque acceptable sans besoin de surveillance spécialisée, contrairement aux risques associés à la clozapine (Kyle et al., 2020; Panchal et al., 2018; Seppi et al., 2011).

Pimavansérine

La pimavansérine est un agoniste inverse des récepteurs 5-HT_{2A}, avec une liaison préférentielle au récepteur 5-HT_{2A} plutôt qu'au récepteur 5-HT_{2C} (40 fois plus sélectif) et une liaison négligeable aux récepteurs dopaminergiques, adrénergiques, histaminergiques ou muscariniques (Vanover et al., 2006). Quatre essais contrôlés randomisés ont évalué l'innocuité et l'efficacité de la pimavansérine en tant qu'agent antipsychotique dans la MP, ce qui a conduit à son approbation par la FDA en 2016 (U.S. Food and Drug Administration, 2018). La première étude était un essai de phase II mené sur 4 semaines auprès de 60 patients avec la MP, et a montré que la pimavansérine (20 à 60 mg/jour) améliorait de façon non significative la psychose sans aggraver les symptômes moteurs (Meltzer et al., 2010). Toutefois, il y a eu une augmentation de certaines mesures des scores d'hallucinations et de délires (Meltzer et al., 2010). Un essai multicentrique randomisé en double aveugle contre placebo de phase III mené chez 199 patients avec la MP a révélé que la pimavansérine (34 mg/jour) réduisait la fréquence et/ou la sévérité des hallucinations visuelles chez les patients avec la MP atteints de psychose sans altérer la fonction motrice (Cummings et al., 2014b). Malgré le fait qu'un seul essai de phase III ait obtenu des résultats positifs, la FDA a approuvé pimavansérine. À la suite de cette approbation, un essai ouvert, avec 459 patients avec la MP, a rapporté qu'un traitement à long terme (jusqu'à 15 mois) avec de la pimavansérine (34 mg/jour) était bien toléré (Ballard et al., 2020).

1.3. Neurotransmission glycinergique

1.3.1. Glycine

Dans le système nerveux, la glycine agit comme un neurotransmetteur inhibiteur lorsqu'elle se lie aux récepteurs de la glycine (Nguyen et al., 2001). Il existe deux types de récepteurs de la glycine: sensible à la strychnine (GlyA) et insensible à la strychnine (GlyB) (Chalpin et al., 2010). Le récepteur GlyA est localisé dans la membrane post-synaptique des neurones glycinergiques (Shank et al., 1970; Snyder, 1975), tandis que GlyB est associé à la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA (Johnson et al., 1987).

Les récepteurs GlyA interviennent dans les circuits inhibiteurs de la moelle épinière et du tronc cérébral (Lynch, 2004). Ils sont composés de 5 sous-unités : quatre sous-unités alpha (α 1-4), qui lient la glycine et forme le pore, et la sous-unité β qui est responsable de l'ancrage des récepteurs de la glycine au cytosquelette sous-synaptique via la protéine cytoplasmique géphyrine (Lynch, 2004). Ils sont excitateurs dans les neurones embryonnaires lorsqu'ils sont activés en raison d'une concentration intracellulaire de chlorure élevée dans les neurones immatures (Lynch, 2004). Dans ces conditions, lorsque la glycine se lie, il y a une dépolarisation de la cellule, ce qui entraîne un influx de calcium important pour le développement du neurone, plus précisément pour la synapse glycinergique (Lynch, 2004). Lorsque le neurone devient mature, l'expression du cotransporteur K^+/Cl^- est observée, ce qui baisse la concentration intracellulaire de chlorure. Cela inverse ainsi le flux de cet ion lorsque le récepteur GlyA est activé, entraînant une hyperpolarisation et une inhibition de la cellule postsynaptique (Lynch, 2004). Dans la moelle épinière et le tronc cérébral, les interneurons

glycinergiques fournissent un mécanisme de rétroaction inhibiteur qui contrôle la génération du rythme moteur pendant le mouvement et ils jouent également un rôle important dans la coordination des réflexes spinaux (Grillner et al., 1998; Legendre, 2001). La glycine est également un neurotransmetteur important dans le traitement de l'information auditive à travers les noyaux cochléaires, le complexe olivaire supérieur et le colliculus inférieur (Wenthold et al., 1990), et dans le traitement de l'information visuelle dans les cellules ganglionnaires rétiniennes (Han et al., 1997).

1.3.2. Transporteurs de la glycine

Dans le système nerveux central des mammifères, le transporteur de la glycine (GlyT) appartient à la grande famille des transporteurs d'ions dépendants de Na^+/Cl^- (Nelson, 1998). Deux types de GlyT ont été identifiés: le transporteur de la glycine 1 (GlyT1; *SLC6A9*) et le transporteur de la glycine 2 (GlyT2; *SLC6A5*) (Bröer et al., 2012; Guastella et al., 1992; Liu et al., 1993; Nelson, 1998). Ils contiennent 12 domaines transmembranaires α -hélicoïdaux reliés par six boucles extracellulaires et cinq boucles intracellulaires (Betz et al., 2006).

Le GlyT1 assure la recapture du neuromodulateur glycine de l'espace extracellulaire vers le cytosol (Eulenburg et al., 2005; Gomeza et al., 2003; Roux et al., 2000). Cette protéine transmembranaire est encodée par le gène humain *SLC6A9* et existe en plusieurs variantes d'épissage générées par trois exons N-terminaux (a, b, c) et deux C-terminaux (d, e) (Adams et al., 1995; Lopez-Corcuera et al., 2001). Dans les mammifères, GlyT1 est distribué dans la plupart des régions du système nerveux central avec un haut niveau d'expression dans la moelle épinière, le tronc cérébral et le cervelet et un niveau plus modéré dans le cortex cérébral et

l'hippocampe (Zafra et al., 1995). En tant que transporteur de la glycine, GlyT1 présente des fonctions régulatrices à la fois excitatrices et inhibitrices (Gomez et al., 2003). En effet, GlyT1 est exprimé dans les astrocytes adjacents aux neurones glycinergiques dans la région caudale du cerveau, où il joue un rôle dans l'arrêt de la neurotransmission inhibitrice en retirant la glycine des synapses glycinergiques (Aragón et al., 2003; Aroeira et al., 2015; Eulenburg et al., 2010). Dans les régions du télencéphale, et précisément dans le néocortex et l'hippocampe, GlyT1 se trouve à la fois dans les cellules gliales et dans les synapses des sous-populations de neurones glutamatergiques et son mode d'expression correspond étroitement à la distribution des récepteurs NMDA (Smith et al., 1992; Supplisson et al., 1997).

Il est important de noter que l'affinité de la glycine pour les récepteurs NMDA est nettement plus élevée que celle pour les récepteurs GlyA ($EC_{50} = 134 \text{ nM}$ contre $EC_{50} = 270 \text{ } \mu\text{M}$) (Breitinger et al., 2020; Stroebel et al., 2021). Par conséquent, dans des conditions physiologiques, il est probable que la glycine endogène exerce principalement un effet exciteur dans l'hippocampe ou le thalamus, où à la fois les récepteurs GlyA et les récepteurs NMDA sont exprimés.

GlyT2 est exclusivement exprimé par les neurones glycinergiques (Liu et al., 1993; Poyatos et al., 1997). Il joue un rôle dans le transport de la glycine de la fente synaptique vers le cytoplasme des neurones glycinergiques pour limiter l'étendue du signal synaptique (Brasnjo et al., 2003). Il assure également des concentrations suffisantes de glycine dans le cytosol terminal de l'axone pour le chargement des vésicules présynaptiques via le transporteur vésiculaire des acides aminés inhibiteurs [GABA et glycine] (Supplisson et al., 2002).

Dans ce projet de thèse, nous nous sommes intéressés uniquement au GlyT1 et à ses inhibiteurs dans la MP, ainsi qu'à son rôle dans les complications induites par la L-DOPA.

1.4. Transporteur de la glycine 1

1.4.1. Distribution anatomique

La distribution des GlyTs est principalement déterminée par le type de neurotransmission glycinergique, inhibitrice ou excitatrice, ayant lieu.

Pour le GlyT1, l'expression de son ARNm a été observée de façon abondante dans les cellules gliales de l'hypothalamus, du thalamus, de la rétine, du cortex et du bulbe olfactif (Zafra et al., 1995). Une forte expression a également été observée au niveau des régions liées aux terminaisons glutamatergiques comme le néocortex et l'hippocampe (Cubelos et al., 2005; Smith et al., 1992). Pour ce qui est de l'expression de la protéine GlyT1, elle est observée aux niveaux pré- et post-synaptiques des terminaisons glutamatergiques, où elle est colocalisée avec les récepteurs NMDA (Cubelos et al., 2005; Smith et al., 1992). De plus, GlyT1 est exprimé dans les membranes plasmiques des neurones et peut également être trouvé dans de petites vésicules intracellulaires contenant des marqueurs de vésicules synaptiques (Cubelos et al., 2014). En effet, la colocalisation de GlyT1 avec des vésicules contenant de la synaptophysine a été observée par microscopie électronique, suggérant la possibilité de co-libération de glutamate et de glycine dans les terminaisons glutamatergiques (Galli et al., 1993; Luccini et al., 2008).

1.4.2. Fonction et régulation

La principale fonction des GlyTs est de recapturer la glycine au niveau des terminaisons synaptiques (Gomez et al., 2003; RouxSupplisson, 2000). La délétion génétique de ces transporteurs induit des changements drastiques dans la fonction neuronale et le comportement animal (Tsai et al., 2004). La mutation de GlyT1 est létale chez la souris. Toutefois, une délétion d'un seul allèle donne des souris saines mais induit une amélioration de la mémoire spatiale comparativement aux souris sauvages (Tsai et al., 2004).

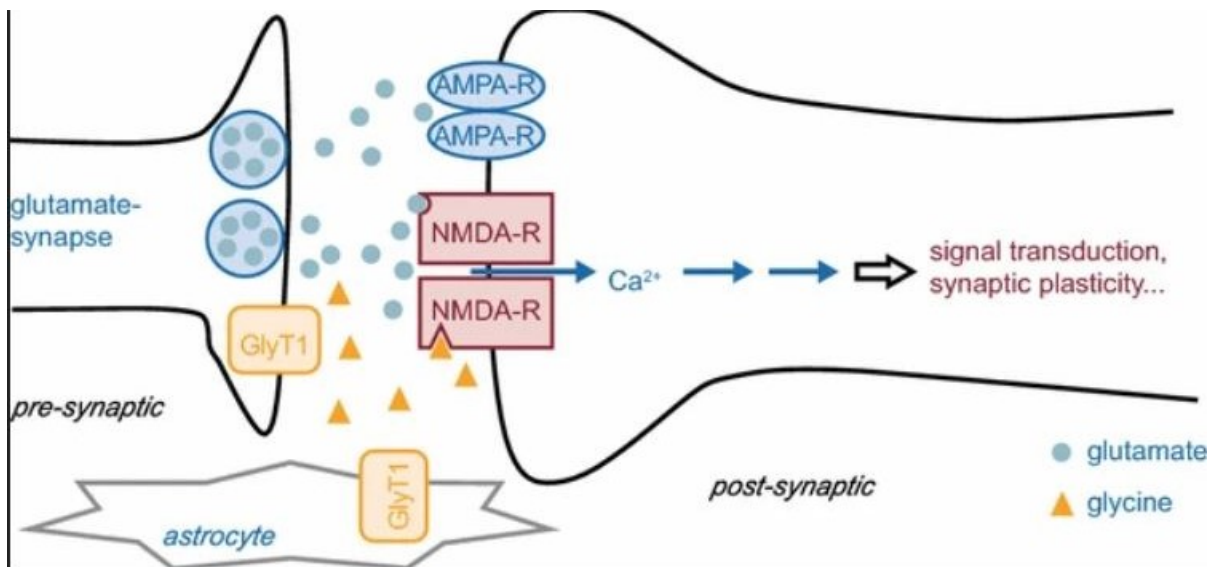


Figure 3: Mécanisme d'action de l'inhibition de GlyT1 (Moschetti et al., 2018).

La glycine est un co-agoniste du récepteur glutamatergique NMDA (JohnsonAscher, 1987; Kleckner et al., 1988), donc sa liaison au site GlyB du récepteur NMDA est nécessaire à la fois pour l'ouverture du canal ionique et pour l'internalisation du récepteur (Nong et al., 2003). GlyT1 est impliqué dans la modulation de la fonction du récepteur NMDA via un contrôle sur la disponibilité de la glycine au site GlyB (Musante et al., 2011). Plusieurs études biochimiques et électrophysiologiques ont démontré la fonction modulatrice de GlyT1 sur le récepteur

NMDA (Bergeron et al., 1998; Depoortère et al., 2005). Il a été montré que le blocage de GlyT1 par les inhibiteurs de GlyT1 entraîne l'augmentation de la concentration extracellulaire de glycine, qui s'accompagne d'une augmentation sélective de l'amplitude de courants médiés par le récepteur NMDA sans affecter les courants médiés par les récepteurs AMPA (Martina et al., 2004). Cependant, le blocage ou la régulation à la baisse de GlyT1 ne devrait améliorer la fonction du récepteur NMDA que si le site GlyB n'est pas saturé en conditions physiologiques (Thompson et al., 1992).

1.5. Bitopertin

1.5.1. Pharmacologie de bitopertin

Une étude a rapporté que le bitopertin est un inhibiteur sélectif de GlyT1 (Alberati et al., 2012). Le bitopertin ne possède aucune activité pour 86 cibles telles que les récepteurs glycinergiques, dopaminergiques, glutamatergiques, sérotoninergiques et GABAergiques (Alberati et al., 2012). *In vitro*, le bitopertin inhibe l'absorption de [³H]glycine dans les cellules transfectées avec l'ADN complémentaire (ADNc) GlyT1 humain et murin, avec une concentration inhibitrice semi-maximale (IC₅₀) de 25 nM et 22 nM, respectivement (Alberati et al., 2012). En revanche, le bitopertin n'a montré aucun effet sur l'absorption de [³H]glycine dans les cellules transfectées avec GlyT2 humain (Alberati et al., 2012). Le bitopertin a une forte affinité pour le GlyT1 humain car il est en mesure de déplacer la liaison de [³H]ORG2459 avec une constante d'inhibition (K_i) de 8,1 nM, ce qui est similaire aux affinités observées chez d'autres espèces (rat, souris, singe et chien) (Alberati et al., 2012). Le bitopertin n'inhibe pas les enzymes telles

que MAO et COMT et n'a aucun effet sur les fonctions des transporteurs de dopamine, sérotonine et noradrénaline (Alberati et al., 2012).

Dans des tranches d'hippocampe de rat, le bitopertin à 10 nM et 100 nM a induit une potentialisation à long terme dépendante du NMDA de 213% et 269%, respectivement, qui a duré plus de 30 minutes (Alberati et al., 2012). Dans une expérience de microdialyse, le bitopertin (1-30 mg/kg, p.o.) a augmenté de manière dose-dépendante les niveaux de glycine mais pas de D,L-sérine dans le liquide céphalo-rachidien et dans le striatum chez le rat, qui a duré jusqu'à 3h après l'administration du médicament (Alberati et al., 2012).

Pour ce qui est de la pharmacocinétique, une dose unique de le bitopertin produit une augmentation dose-dépendante de la glycine dans le liquide céphalo-rachidien de patients sains, avec une augmentation maximale de ~ 2,5 fois par rapport aux niveaux de prétraitement (Hofmann et al., 2016). Le niveau d'augmentation de la glycine dans le liquide céphalo-rachidien du rat prélevé dans la citerne magna est très similaire à l'augmentation observée dans l'espace extracellulaire strié à la même dose et au même moment (Alberati et al., 2012). La plupart des études pharmacocinétiques rapportées ont administré le bitopertin par voie orale avec une biodisponibilité, allant de faible à modéré, avec 23 à 78% chez le rat et 55% chez le macaque [*Macaca fascicularis*] (Pinard et al., 2010). D'une part, l'absorption de bitopertin est de plus de 90% chez l'humain à des doses inférieures à 80 mg (Parrott et al., 2013). D'autre part, l'absorption est moins proportionnelle à des doses supérieures à 50 mg en raison de la faible solubilité et de l'absorption incomplète de la dose (Parrott et al., 2013). Près de 90% de la dose administrée de bitopertin est éliminée par métabolisme oxydatif, principalement par le

cytochrome P450 (CYP) 3A4, et moins de 0,1% est éliminé dans l'urine sous forme inchangée (Boetsch et al., 2016).

Dans l'ensemble, le bitopertin s'est avéré être un inhibiteur de GlyT1 puissant, sélectif, non-compétitif et réversible (Alberati et al., 2012). L'augmentation extracellulaire de la glycine dans le striatum et le liquide céphalo-rachidien causée par le bitopertin induit une augmentation de l'activité du récepteur NMDA, qui pourrait avoir un effet facilitateur sur la transmission dopaminergique et glutamatergique (Alberati et al., 2012).

1.5.2. Études cliniques

Schizophrénie

Le bitopertin est le seul inhibiteur de GlyT1 qui est passé aux essais cliniques de phase III en tant que traitement concomitant aux antipsychotiques pour la schizophrénie (Bugarski-Kirola et al., 2017). Cependant, la recherche dans ce domaine a été suspendue, principalement en raison d'une inefficacité dans six essais cliniques différents (Bugarski-Kirola et al., 2017; Bugarski-Kirola et al., 2016). Une étude multicentrique appelée SearchLyte était composée de 3 essais randomisés, en double aveugle, en groupes parallèles, contrôlés contre placebo, de phase III: TwiLyte (N = 505), NightLyte (N = 517) et MoonLyte (N = 506) et a examiné l'effet du bitopertin comme traitement concomitant aux antipsychotiques actuels sur les symptômes positifs et négatifs de la schizophrénie (Bugarski-Kirola et al., 2016). Seule l'étude NightLyte a atteint le critère d'évaluation principal où le bitopertin à 10 mg a diminué de manière significative les symptômes positifs à la semaine 12 par rapport au placebo, ce qui suggère que le bitopertin peut apporter un bénéfice mineur aux patients qui répondent de façon sous-

optimale aux antipsychotiques (Bugarski-Kirola et al., 2016). Aucune des études n'a produit d'amélioration des symptômes négatifs et cognitifs par rapport au placebo.

Ces résultats sont conformes à un essai de phase II/III randomisé, en double aveugle, contrôlé contre placebo [N = 301] (Bugarski-Kirola et al., 2014). Ce dernier a étudié l'efficacité du bitopertin en monothérapie chez des patients présentant une exacerbation aiguë de la schizophrénie. Sur le critère d'efficacité, ni le bitopertin à 10 ou 30 mg/kg ni l'olanzapine à 15 mg/kg, témoin positif, ne se sont différenciés du placebo. Néanmoins, le bitopertin à 10 ou 30 mg/kg a amélioré les symptômes positifs et atténué la sévérité de la maladie (Bugarski-Kirola et al., 2014). Dans l'ensemble, il est possible que l'inhibition de GlyT1 améliore les symptômes positifs, mais d'autres études mieux contrôlées sont nécessaires pour confirmer son effet thérapeutique sur les symptômes positifs comme critère d'évaluation primaire.

Trouble obsessionnel-compulsif

Dans le cas du trouble obsessionnel-compulsif (TOC), plusieurs molécules affectant la biodisponibilité de la glycine ont été testées (Greenberg et al., 2009; Wu et al., 2011). En effet, dans une étude en double aveugle contrôlée contre placebo, la glycine a stabilisé le TOC lorsqu'elle était associée à des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) chez des patients atteints de TOC (N = 24), mais des effets secondaires gastro-intestinaux ont limité son effet thérapeutique (Greenberg et al., 2009). Cela a conduit à penser à une alternative comme les inhibiteurs de GlyT1. En effet, un essai ouvert (N = 25) a montré que l'association de la sarcosine avec un ISRS améliore le contrôle des symptômes du TOC chez huit patients (Wu et al., 2011). Une étude multicentrique, randomisée, en double aveugle, en groupes

parallèles et contrôlée contre placebo a étudié l'efficacité et l'innocuité du bitopertin (10 mg ou 30 mg) en association avec des ISRS chez des patients atteints de TOC (N = 99) (Goodman et al., 2021; Singer et al., 2017). Malheureusement, le bitopertin n'a pas réussi à augmenter la réponse des ISRS à partir de la semaine 12 par rapport au placebo.

Anémie β -thalassémie

La glycine est un substrat essentiel pour produire l'hème et la globine (Nathan et al., 1961). L'inhibition de GlyT1 par le bitopertin dans les cellules érythroïdes réduit la disponibilité de la glycine intracellulaire, interférant ainsi avec la synthèse de l'hème (Winter et al., 2016). Une étude de phase II a étudié l'innocuité, la tolérabilité, l'efficacité, les profils pharmacocinétiques et pharmacodynamiques après l'administration orale quotidienne de bitopertin (30-90 mg) chez des adultes atteints de β -thalassémie non dépendants des transfusions (Taher et al., 2018; Taher et al., 2021). Cependant, lors de l'analyse préliminaire de huit semaines, l'hémoglobine totale moyenne a été réduite chez les patients, ce qui a conduit à réduire la posologie (30 mg/j) pour éviter une suppression sévère de la biosynthèse de l'hème et de la production de chaînes de globine, mais la baisse de l'hémoglobine totale moyenne a persisté (Taher et al., 2021).

1.6. ALX-5407

1.6.1. Pharmacologie d'ALX-5407

Une étude a rapporté que le ALX-5407 est un puissant inhibiteur sélectif de la famille GlyT1 avec une K_i de 5 nM pour GlyT1 (Atkinson et al., 2001; Kopec et al., 2010; Yang et al., 2008). Le ALX-5407 possède des activités hors cible au niveau du transporteur de la sérotonine, du récepteur de la neurokinine NK3 et du récepteur de la sérotonine 5HT2A, mais ces activités sont relativement faibles par rapport aux valeurs IC_{50} de 0.9 nM pour l'inhibition de GlyT1 (Kopec et al., 2010). Le ALX-5407 ne reconnaît pas d'autres sites à glycine, y compris le site GlyB ou le récepteur GlyA (Atkinson et al., 2001). Des expériences de microdialyse in vivo ont montré que l'ALX-5407 peut augmenter les concentrations de glycine dans le cortex préfrontal du rat d'au moins 40% à une dose qui peut représenter l'occupation de seulement 50% des sites GlyT1 disponibles (Atkinson et al., 2001). De plus, il n'y a eu aucun signe de cytotoxicité ou de convulsions lors de l'administration d'ALX-5407. L'ALX-5407 n'est pas transporté dans les cellules et ne devrait donc pas s'accumuler à l'intérieur de celles-ci (Herdon et al., 2010; Zeng et al., 2008). Bref, l'ALX-5407 est un inhibiteur de GlyT1 hautement sélectif et qui est sécuritaire lors de l'administration chez des modèles animaux.

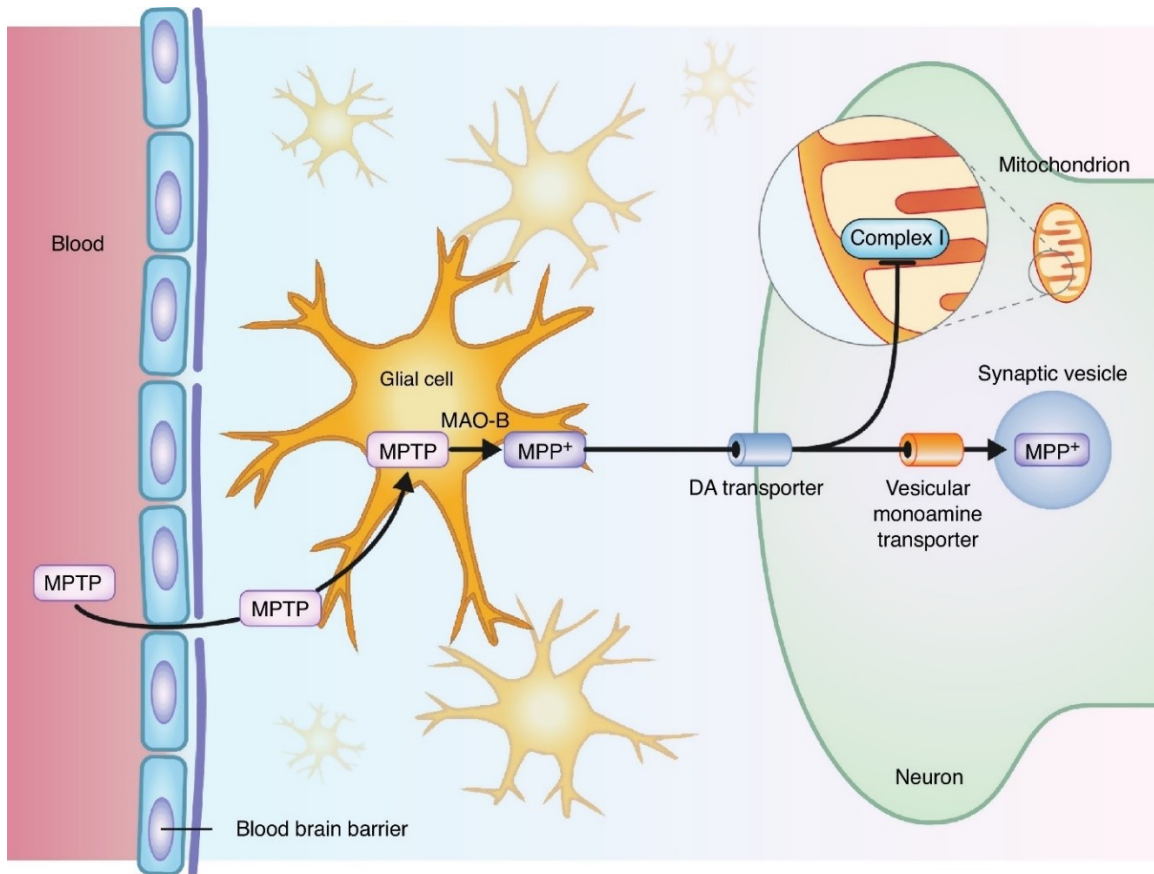
1.7. Modèles animaux de la maladie de Parkinson

La plupart de nos connaissances actuelles sur les mécanismes pathogéniques et physiopathologiques potentiels de la MP proviennent d'innombrables études menées au cours des cinq dernières décennies sur des modèles animaux de MP. Ces modèles ont été un outil

important pour mieux comprendre la maladie. En effet, ils ont été utiles à l'industrie du développement des médicaments, car ils permettent l'évaluation des effets thérapeutiques de diverses molécules avant d'atteindre les stades cliniques. De tels modèles ont été classiquement basés sur l'utilisation de neurotoxines capables de reproduire la plupart des caractéristiques pathologiques et/ou phénotypiques de la MP (Bentea et al., 2017; Deumens et al., 2002; Nisticò et al., 2011; Smeyne et al., 2005). Au cours des deux dernières décennies, l'avènement de « l'ère génétique » de la MP a fourni un enrichissement phénoménal des possibilités expérimentales, avec un certain nombre de modèles transgéniques qui ont été mis à la disposition de la communauté scientifique (Gandhi et al., 2012; Visanji et al., 2016; Yue et al., 2011). Les deux classes de modèles animaux de la MP ont leurs propres spécificités et limites et l'indication d'utiliser un modèle ou l'autre dépend donc des objectifs spécifiques poursuivis. Dans le cadre de cette thèse, seuls les modèles faisant appel à une lésion par une neurotoxine seront discutés.

1.7.1. Lésion au MPTP

Le MPTP est l'outil fréquemment utilisé pour les études sur les mécanismes impliqués dans la mort des neurones dopaminergiques dans la MP (Ferrucci et al., 2021; Porras et al., 2011). Le MPTP s'est avéré toxique pour les neurones dopaminergiques d'un large éventail d'espèces. Les espèces les plus populaires sont le primate et la souris, en revanche le rat est résistant à cette toxine (Giovanni et al., 1994). Chez les deux espèces, le MPTP cause principalement des dommages à la voie dopaminergique nigrostriée avec une perte importante de neurones dopaminergiques de la SNpc (Przedborski et al., 2001).



Drug Discovery Today: Disease Models

Figure 4: Mécanisme d'action du MPTP (Philippens, 2017).

Tel que présenté dans la Figure 3, le MPTP est hautement lipophile et après administration systémique, il traverse rapidement la barrière hémato-encéphalique [BHE] (Przedborski et al., 1998). Après avoir traversé la BHE, le MPTP est transformé par la MAO-B en son métabolite actif, l'ion 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP⁺), qui est ensuite transporté par le transporteur de la dopamine dans les neurones dopaminergiques de la SNpc (Gainetdinov et al., 1997), où il bloque l'activité du complexe mitochondrial I (Mizuno et al., 1987), entraînant la libération de ROS ainsi qu'une réduction de la production d'adénosine triphosphate [ATP] (PrzedborskiJackson-Lewis, 1998; PrzedborskiVila, 2001). Cette découverte a indiqué que les

mitochondries des neurones dopaminergiques étaient une cible préférentielle de toxicité, ouvrant la voie à des myriades d'études explorant la fonction mitochondriale dans la MP, et fournissant un précieux modèle animal de la MP.

Le MPTP est principalement utilisé chez les primates non-humains et les souris, mais a également été utilisé chez de nombreuses autres espèces telles que les chiens et les chats (Schneider et al., 1991; Wilson et al., 1987). Pour des raisons inconnues, les rats sont résistants au MPTP et les souches de souris varient considérablement dans leur sensibilité à la toxine (Giovanni et al., 1994). Le MPTP peut être administré sur plusieurs jours ou semaines selon divers schémas thérapeutiques, mais la forme la plus courante et la plus reproductible reste l'injection systémique (sous-cutanée ou intraveineuse) (Giovanni et al., 1994). Le MPTP peut également être administré via une mini-pompe osmotique pour une libération continue sur plusieurs jours voire semaines (Alvarez-Fischer et al., 2008; Fornai et al., 2005). Lorsque le MPTP est administré à des primates non-humains, ils présentent des similitudes comportementales et neuroanatomiques avec la condition humaine montrant un syndrome parkinsonien bilatéral (Fox et al., 2010a). Une autre voie utilisée est l'injection intracarotidienne unilatérale (Bankiewicz et al., 1986). Cela provoque le plus souvent un syndrome parkinsonien unilatéral.

Habituellement, les primates sont traités avec de fortes doses de MPTP pendant une courte période (modèle aigu). Cependant, d'autres régimes ont introduit des doses plus faibles de la neurotoxine pendant de plus longues périodes (subaiguës à chroniques) pour reproduire plus fidèlement la pathologie humaine (Perez-Otano et al., 1994). D'autres études ont tenté de développer un modèle plus progressif de MP (Bezard et al., 2001; Meissner et al., 2003). De

plus, des modèles sont en cours de développement pour étudier les mécanismes de compensation ou de récupération (Blesa et al., 2010; Mounayar et al., 2007). Ces modèles utilisent des doses faibles à administration intermittente, soit une ou deux fois par semaine (Mounayar et al., 2007). Il est bien connu que les primates présentent une variabilité de la sensibilité au MPTP et que les primates plus âgés sont souvent plus sensibles au MPTP (Ovadia et al., 1995). Les primates traités au MPTP répondent bien aux traitements antiparkinsoniens comme la L-DOPA ou l'apomorphine et, comme la pathologie humaine, après une administration chronique de L-DOPA, ils développent des dyskinésies (Boraud et al., 2001; Kwan et al., 2020). Récemment, certaines études ont été menées afin d'étudier et d'évaluer les symptômes non moteurs de la maladie en utilisant ce modèle (Barth et al., 2020; Choudhury et al., 2018; Shi et al., 2020).

Le modèle de primate lésé au MPTP est principalement utilisé pour discerner les composantes comportementales et symptomatiques de la MP et représente également le dernier niveau de recherche préclinique sur le traitement de la MP avant que tout traitement ne soit administré à l'humain. En effet, le modèle de primate non-humain lésé au MPTP présente des avantages concurrentiels sur tous les autres modèles neurotoxiques tels qu'une intoxication ciblée des structures dopaminergiques, et des symptômes pratiquement identiques à ceux observés dans la MP (PrzedborskiVila, 2001). Au cours des dernières années, le principal rôle du modèle lésé au MPTP a été d'améliorer la compréhension des mécanismes neuronaux impliqués dans la MP et la dyskinésie induite par la L-DOPA (Di Monte et al., 2000; Masilamoni et al., 2011; Nuzzo et al., 2019; Samadi et al., 2008). Cependant, les corps de Lewy ne sont pas observés chez les primates lésés au MPTP, ni chez les personnes intoxiquées au MPTP, bien que des inclusions intra-neurales aient été décrites (Forno et al., 1993).

Dans le cadre de cette thèse, des doses élevées de MPTP ont été administrées de façon aiguë à des ouistitis, produisant une déplétion nigrostriatale élevée, et reflétant ainsi un stade avancé de la MP. En effet, avec le régime utilisé dans cette étude (MPTP 2 mg/kg s.c. pour 5 jours), une perte de plus de 95 % des neurones dopaminergiques dans la SNpc des ouistitis traités peut être observée, ce qui présente un stade avancé de la maladie chez l'humain (Iravani et al., 2001; Van Vlieta et al., 2008). Le ouistiti lésé au MPTP montre une réduction des mouvements avec une posture déformée, une perte de vocalisation, une rigidité des membres et occasionnellement des tremblements posturaux de tout le corps (ChoudhuryDaadi, 2018). Après une administration chronique de L-DOPA, le ouistiti développe des dyskinésies de type chorée et dystonie ainsi que des comportements de type psychotiques tels que des stéréotypies, des hallucinations visuelles, un nettoyage excessif et de l'hyperactivité (Fox et al., 2010b; Pearce et al., 1995). Les échelles d'évaluation de la sévérité du parkinsonisme, de la dyskinésie et des comportements de type psychotiques sont bien établies et validées chez le ouistiti lésé au MPTP (Fox et al., 2010b; Frouni et al., 2021b; Nuara et al., 2020; Visanji et al., 2006).

1.7.2. Lésion à la 6-OHDA

Comme le MPTP, la 6-OHDA est une neurotoxine catécholaminergique sélective qui est principalement utilisée pour générer des lésions dans les neurones dopaminergiques nigrostriés chez le rat (Glinka et al., 1997). La 6-OHDA est un analogue hydroxylé de la dopamine avec une forte affinité pour le transporteur dopaminergique, qui transporte la toxine à l'intérieur des neurones dopaminergiques (Ding et al., 2004). Le mécanisme d'action de la 6-OHDA est essentiellement lié à ses propriétés pro-oxydantes (Glinka et al., 1997; Soto-Otero et al., 2000).

Une fois dans le neurone, la 6-OHDA s'accumule dans le cytosol et subit une auto-oxydation rapide, favorisant un taux élevé de formation de peroxyde d'hydrogène (Gee et al., 1989; Glinka et al., 1997; Soto-Otero et al., 2000). La 6-OHDA peut également s'accumuler dans les mitochondries, où elle inhibe l'activité du complexe I (Glinka et al., 1996).

L'injection intracérébrale de la 6-OHDA est nécessaire car elle ne traverse pas la BHE (Schober, 2004). Après injection dans le SNpc ou dans le faisceau médian du télencéphale qui transporte les fibres efférentes des corps cellulaires nigraux vers le striatum, la 6-OHDA provoque une dégénérescence antérograde massive de la voie nigrostriée (Schober, 2004). Une injection de la 6-OHDA dans le striatum, quant à elle, provoque une dégénérescence rétrograde de la voie nigrostriée (Schober, 2004). Les neurones de la SNpc commencent à mourir dans les 12 premières heures après l'injection, tandis qu'une lésion marquée des terminaisons dopaminergiques striatales, parallèlement à une déplétion dopaminergique, s'établit dans les 2 à 3 jours (Faull et al., 1969). Cette procédure produit une perte de cellules nigrales et une déplétion striatale de dopamine pouvant aller de 90 à 100% (Barneoud et al., 1995; Frouni et al., 2019a; Kwan et al., 2020). Une injection unilatérale de la 6-OHDA dans un hémisphère donné est couramment effectuée pour avoir un modèle hémi-parkinsonien, laissant le côté non lésé comme contrôle interne (Betarbet et al., 2002; Ungerstedt et al., 1970). De plus, une injection bilatérale est associée à un taux de mortalité élevé (UngerstedtArbuthnott, 1970).

Comme le modèle lésé au MPTP, les animaux lésés à la 6-OHDA présentent des limitations pathologiques et comportementales. Tout d'abord, la 6-OHDA induit uniquement la mort des neurones dopaminergiques sans affecter les neurones non dopaminergiques. En effet, la 6-OHDA n'affecte pas les autres zones cérébrales impliquées dans la MP, tel que le locus coeruleus (Betarbet et al., 2002). De plus, la 6-OHDA ne produit pas de corps de Lewy tel

qu'observé chez les patients de la MP (Betarbet et al., 2002; Lindgren et al., 2012; Walker et al., 2019). La plus grande limitation de ce modèle est qu'il induit exclusivement une neurodégénérescence aigue, ce qui diffère significativement de la pathologie lentement progressive de la MP humaine (Betarbet et al., 2002).

Dans le cadre de cette étude, la 6-OHDA a été injectée unilatéralement dans le faisceau médian du télencéphale. Cela a pour effet d'entraîner une dégénérescence totale des cellules des zones A9 et A10, entraînant une déplétion dopaminergique dans le striatum ipsilatéral et une hypersensibilité des récepteurs dopaminergiques postsynaptiques à la suite de la dénervation dans le striatum ipsilatéral (Deumens et al., 2002; Perese et al., 1989). Après la lésion à la 6-OHDA, les rats ont tendance à se tourner préférentiellement vers le côté ipsilatéral. De plus, l'administration systémique de la L-DOPA, d'agonistes des récepteurs de la dopamine ou de composés libérant de la dopamine (tel que l'amphétamine) induit une rotation asymétrique (Hefti et al., 1980).

Dans l'ensemble, le modèle de rat lésé à la 6-OHDA a été largement utilisé comme modèle préclinique pour évaluer les effets antiparkinsoniens et anti-dyskinétiques des nouvelles thérapies pharmacologiques (Athari et al., 2022; Frouni et al., 2019b; Hamadjida et al., 2020; Huot et al., 2015; Jiang et al., 2022; Kwan et al., 2021a; Lenda et al., 2021).

2. PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

2.1 Problématique

Aucun médicament n'est disponible actuellement pour le traitement de l'ensemble des symptômes de la MP. Les traitements disponibles sont souvent symptomatiques et visent à atténuer un symptôme en particulier tel que la L-DOPA qui a pour but d'atténuer les problèmes moteurs. Bien que la L-DOPA soit le principal traitement prescrit aux patients, son efficacité est limitée et son administration chronique est corrélée avec une très grande prévalence de développement de dyskinésies ou de psychoses. Peu de traitements sont disponibles pour réduire efficacement ces complications et certains interfèrent avec l'effet thérapeutique de la L-DOPA, alors que d'autres induisent des effets secondaires potentiellement dangereux pour la vie des patients. Il est donc crucial de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques. Des études cliniques et précliniques ont montré que le site à glycine du récepteur NMDA est une cible thérapeutique prometteuse pour les problèmes moteurs de la MP. La glycine est un co-agoniste essentiel des récepteurs NMDA, où elle se lie avec le site de liaison à la glycine (KlecknerDingledine, 1988). L'activation de ce site est nécessaire pour l'activation des récepteurs NMDA par le glutamate (Lester et al., 1993). Bien que l'augmentation directe de la signalisation glutamatergique comporte le risque de provoquer une excitotoxicité ou des convulsions (Choi et al., 1987), son activation indirecte par l'élévation des taux de glycine en inhibant GlyT1 semble être une approche plus sécuritaire. Dans ce projet, nous chercherons à caractériser les potentiels anti-dyskinétique et antiparkinsonien de l'inhibition sélective du GlyT1 avec le bitopertin.

2.2 Hypothèses

- Le profil pharmacocinétique du bitopertin, après une administration sous-cutanée ou intraveineuse chez des rats femelles, nous permettra d'atteindre une exposition plasmatique comparable à celle obtenue chez l'humain;
- L'inhibition de GlyT1 réduira la sévérité des dyskinésies induites par la L-DOPA et atténuera leur développement sans produire de tolérance chez des rats lésés au 6-OHDA;
- L'inhibition de GlyT1 exercera un effet antiparkinsonien et améliorera l'effet thérapeutique de la L-DOPA chez des rats lésés au 6-OHDA;
- L'inhibition de GlyT1 réduira la sévérité des dyskinésies induites par la L-DOPA et des psychoses chez les ouistitis lésés au MPTP sans interférer avec l'effet antiparkinsonien de la L-DOPA.

2.3 Objectifs

- Chez le rat lésé à la 6-OHDA
 1. Déterminer le profil pharmacocinétique du bitopertin;
 2. Déterminer l'effet de l'administration d'une dose unique du bitopertin sur l'expression des dyskinésies;
 3. Déterminer l'effet de l'administration de novo du bitopertin sur le développement des dyskinésies au fil du temps;
 4. Déterminer l'effet de l'administration chronique du bitopertin sur la tolérance au traitement;
 5. Déterminer l'effet de l'administration d'une dose unique du bitopertin sur le parkinsonisme;

6. Déterminer l'effet de l'administration d'une dose unique du bitopertin sur l'action antiparkinsonienne de la L-DOPA.
- Chez le ouistiti lésé au MPTP
 1. Déterminer l'effet de l'administration d'une dose unique d'ALX-5407 sur l'expression des dyskinésies;
 2. Déterminer l'effet de l'administration d'une dose unique d'ALX-5407 sur l'expression des psychoses;
 3. Déterminer l'effet de l'administration d'une dose unique d'ALX-5407 sur l'action antiparkinsonienne de la L-DOPA.

2.4 Articles

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse ont mené à la rédaction de quatre articles scientifiques.

Chapitre 1: Méthode de détection du bitopertin dans le plasma de rat et ouistiti à la suite d'une administration sous-cutané et intraveineuse.

Imane Frouni, Fleur Gaudette, Dominique Bédard, Stephen G Nuara, Cynthia Kwan, Adjia Hamadjida, Jim C Gourdon, Francis Beaudry, Philippe Huot. Development and validation of a sensitive HPLC-HESI-MS/MS method for quantitative determination of bitopertin in rat and marmoset plasma. *MNI Open Research* (2020). <https://doi.org/10.12688/mniopenres.12850.1>

Imane Frouni a réalisé les expériences, analysé les données, rédigé le manuscrit et géré le processus de soumission et d'édition. Fleur Gaudette a réalisé les expériences, analysé les données, puis rédigé et révisé le manuscrit. Dominique Bédard, Stephen G Nuara et Cynthia

Kwan ont réalisé les expériences et révisé le manuscrit. Adjia Hamadjida et Jim C Gourdon ont supervisé et organisé les expériences et révisé le manuscrit. Francis Beaudry a organisé les expériences, analysé les données et révisé le manuscrit. Philippe Huot a conçu le projet, supervisé et organisé les expériences, et révisé le manuscrit.

Chapitre 2: Profil pharmacocinétique du bitopertin chez le rat

Imane Frouni, Dominique Bédard, Élodie Bourgeois-Cayer, Adjia Hamadjida, Fleur Gaudette, Francis Beaudry, Philippe Huot. Pharmacokinetic profile of bitopertin, a selective GlyT1 inhibitor, in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (2023). <https://doi.org/10.1007/s00210-022-02378-1>

Imane Frouni a réalisé les expériences, analysé les données, rédigé le manuscrit et géré le processus de soumission et d'édition. Dominique Bédard, Élodie Bourgeois-Cayer et Fleur Gaudette ont réalisé les expériences et révisé le manuscrit. Adjia Hamadjida a supervisé et organisé les expériences et révisé le manuscrit. Francis Beaudry a organisé les expériences, analysé les données et révisé le manuscrit. Philippe Huot a conçu le projet, supervisé et organisé les expériences, et révisé le manuscrit.

Chapitre 3: Effet de l'inhibition de GlyT1 sur les dyskinésies induites par la L-DOPA chez le modèle de rat lésé à la 6-hydroxydopamine

Imane Frouni a réalisé les expériences, analysé les données, rédigé le manuscrit et géré le processus de soumission et d'édition. Woojin Kang, Dominique Bédard, Sébastien Belliveau, Cynthia Kwan, Shadi Hadj-Youssef, Élodie Bourgeois-Cayer, Leanne Ohlund ont réalisé les expériences et révisé le manuscrit. Lekha Sleno et Adjia Hamadjida ont supervisé et organisé

les expériences et révisé le manuscrit. Philippe Huot a conçu le projet, supervisé et organisé les expériences, et révisé le manuscrit.

Imane Frouni, Woojin Kang, Dominique Bédard, Sébastien Belliveau, Cynthia Kwan, Shadi Hadj-Youssef, Élodie Bourgeois-Cayer, Leanne Ohlund, Lekha Sleno, Adjia Hamadjida, Philippe Huot. Effect of glycine transporter 1 inhibition with bitopertin on parkinsonism and L-DOPA induced dyskinesia in the 6-OHDA-lesioned rat. *European Journal of Pharmacology* (2022). <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.175090>

Chapitre 4: Effet de l'inhibition de GlyT1 sur les dyskinésies et les psychoses induites chez le modèle de ouistiti lésé au MPTP

Imane Frouni a réalisé les expériences, analysé les données, rédigé le manuscrit et géré le processus de soumission et d'édition. Sébastien Belliveau a réalisé les expériences et révisé le manuscrit. Shawn Maddaford a organisé les expériences et révisé le manuscrit. Stephen G Nuara a réalisé les expériences. Jim C Gourdon a organisé les expériences et révisé le manuscrit. Philippe Huot a conçu le projet, supervisé et organisé les expériences, et révisé le manuscrit.

Imane Frouni, Sébastien Belliveau, Shawn Maddaford, Stephen G Nuara, Jim C Gourdon, Philippe Huot. Effect of the glycine transporter 1 inhibitor ALX-5407 on dyskinesia, psychosis-like behaviours and parkinsonism in the MPTP-lesioned marmoset. *European Journal of Pharmacology* (2021). <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174452>

3. RÉSULTATS

Chapitre 1: Méthode de détection du bitopertin dans le plasma de rat et ouistiti à la suite d'une administration sous-cutané et intraveineuse.

Article publié dans **MNI Open Research** en 2020

Accès: <https://doi.org/10.12688/mniopenres.12850.1>

Titre en français:

Développement et validation d'une méthode HPLC-HESI-MS/MS sensible pour la détermination quantitative du bitopertin dans le plasma de rat et de ouistiti à la suite d'une administration sous-cutanée.

Résumé en français:

Le bitopertin est un puissant inhibiteur du transporteur de la glycine 1 (GlyT1) qui a fait l'objet de plusieurs essais cliniques et présente un profil pharmacocinétique (PK) bien documenté chez l'humain. Même si des études précliniques ont démontré des effets thérapeutiques potentiels sur la cognition et la douleur neuropathique, le profil PK de bitopertin chez le rat n'a été que partiellement caractérisé et aucune étude rapportant son profil PK chez le ouistiti n'a été publiée. Le but de cette étude était de développer et de valider une méthode de chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem à ionisation par électrobulbion thermique (HPLC-HESI-MS/MS) pour quantifier le bitopertin (1,0 mg/kg en sous-cutanée) dans le plasma du rat et du ouistiti. La méthode analytique consistait en une précipitation des protéines suivie d'une HPLC-HESI-MS/MS. La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne analytique Thermo Scientific Aquasil C18 (100 × 2.1 mm I.D., 5.0 µm) à 50°C en utilisant de l'acétonitrile et de l'eau, tous deux enrichis à 0,1% (v/v) avec de l'acide formique au rapport 55 : 45, comme phase mobile et avec un débit constant de 250 µL/min. La fonction d'étalonnage était

linéaire dans l'intervalle de 0,3 à 200,0 ng/mL dans le plasma du rat. La précision et l'exactitude intra-journalière et inter-journalière étaient dans la limite acceptable de $\pm 15\%$ à toutes les concentrations. La limite de détection (LD) et de quantification (LQ) dans le plasma du rat étaient de 0,08 et 0,3 ng/mL, respectivement. La sensibilité et la spécificité de la méthode ont été démontrées. Grâce à cette méthode, le bitopertin a été quantifié dans le plasma du rat et du ouistiti, ce qui a permis l'étude de ses propriétés PK chez les deux espèces.

Development and validation of a sensitive HPLC-HESI-MS/MS method for quantitative determination of bitopertin in rat and marmoset plasma following sub-cutaneous administration.

Authors: Imane Frouni^{1,2*}, Fleur Gaudette^{3*}, Dominique Bédard¹, Cynthia Kwan¹, Adjia Hamadjida¹, Francis Beaudry⁴ and Philippe Huot^{1,2,5,6}

*: premier co-auteur

¹Neurodegenerative Disease Group, Montreal Neurological Institute, 3801 University St., Montreal, QC, Canada, H3A 2B4

²Département de Pharmacologie et Physiologie, Université de Montréal, C.P.6128 Succ Centre-ville, Montreal, QC, Canada, H3C 3J7

³Plateforme de Pharmacocinétique, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), 900 Saint-Denis St., Montreal, QC, Canada, H2X OA9

⁴Groupe de Recherche en Pharmacologie Animal du Québec, Département de Biomédecine Vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire Université de Montréal, 3200 Sicotte St. Saint-Hyacinthe, QC, Canada, J2S 2M2

⁵Department of Neurology and Neurosurgery, McGill University, 3801 University St., Montreal, QC, Canada, H3A 2B4

⁶Division of Neurology, McGill University Health Centre, 3801 University St., Montreal, QC, Canada, H3A 2B4

Abstract

Bitopertin is a potent glycine transporter 1 (GlyT1) inhibitor that has undergone several clinical trials for diverse disorders and has a well-documented pharmacokinetic (PK) profile in humans. Even though pre-clinical studies have demonstrated potential therapeutic effects on cognition and neuropathic pain, the PK profile of bitopertin in the rat has been partly disclosed and no study reporting its PK profile in the common marmoset has been published. The aim of this study was to develop and validate a sensitive and selective high-performance liquid chromatography coupled with heat assisted electrospray ionisation tandem mass spectrometry (HPLC-HESI-MS/MS) assay to quantify bitopertin in the rat and marmoset plasma after sub-cutaneous administration of 1.0 mg/kg. The analytical method consisted of protein precipitation followed by HPLC-HESI-MS/MS. Chromatographic separation was carried out on a Thermo Scientific Aquasil C18 analytical column (100 × 2.1 mm I.D., 5.0 µm) operating at 50°C using acetonitrile and water both fortified at 0.1% (v/v) with formic acid at ratio 55:45 as mobile phase with a constant flow rate of 250 µL/min. The calibration function was linear in the range of 0.3-200.0 ng/mL in rat plasma. The intra-day and inter-day precision and accuracy were within the acceptable criterion of ± 15% at all concentrations. The limit of detection (LOD) and quantitation (LOQ) in rat plasma were 0.08 and 0.3 ng/mL, respectively. This method has demonstrated high sensitivity and specificity, was successfully applied to quantify bitopertin in rat and marmoset plasma and allowed the investigation of PK properties in both species.

Keywords: Bitopertin; rat plasma; marmoset plasma; bioanalysis; HPLC- MS/MS

1. Introduction

In the last decade, glycine transporter 1 (GlyT1) inhibition has been strongly pursued as a therapeutic strategy in numerous neuro-psychiatric disorders (Bugarski-Kirola et al., 2017; D'Souza et al., 2018; Dunayevich et al., 2017; Lane et al., 2010; Nations et al., 2012; Wu et al., 2011). Also referred to as RG1678 or RO-4917838, bitopertin, by blocking GlyT1, increases levels of synaptic glycine, and since glycine acts as a co-agonist to the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor, promotes the potentiation of the receptor's activity (Gabernet et al., 2004; Kinney et al., 2003; Lim et al., 2004; Sur & Kinney, 2007). Bitopertin is a highly selective GlyT1 inhibitor that underwent several clinical trials, notably for the treatment of negative symptoms associated with schizophrenia (Bugarski-Kirola et al., 2017; Hirayasu et al., 2016; Kantrowitz et al., 2018; Rofail et al., 2016), obsessive-compulsive disorder (Roche, 2012) and β -thalassaemia (Roche, 2017; Taher et al., 2018). Moreover, recent pre-clinical studies suggested that bitopertin could have a therapeutic potential at managing neuropathic pain and improving cognition (Armbruster et al., 2018; Castner et al., 2014).

The known pharmacokinetic (PK) profile of bitopertin in animals is limited, with published PK experiments reporting parameters following administration of few doses in rat (2 mg/kg, intravenously (i.v.); 3 mg/kg, orally (p.o.)) or cynomolgus macaque (0.5 mg/kg i.v.; 3 mg/kg p.o.), limiting dose-concentration response relationship needed in pre-clinical evaluations (Parrott et al., 2013; Pinard et al., 2010). To the best of our knowledge, there are no published validated assays to quantify bitopertin in the common marmoset (*Callithrix jacchus*).

Most of the published PK studies employed high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) to measure bitopertin in plasma, urine or cerebro-

spinal fluid samples (Hofmann et al., 2016; Parrott et al., 2013; Pinard et al., 2010). Although, HPLC-MS/MS is an attractive method to characterise the PK profile of drugs as lower limits of quantitation (LLOQ) can be achieved, there are no published assays that could detect trace concentrations of bitopertin in animals. The LLOQs reached in plasma were 10 ng/mL in rat and 2.5 ng/mL in cynomolgus macaque (Parrott et al., 2013; Pinard et al., 2010), while a lower LLOQ was achieved in human plasma (0.25 ng/mL) (Hofmann et al., 2016; Parrott et al., 2013). None of the publications provided a detailed description of the analytical methodology utilised pertaining to chromatography, mass spectrometry and sample preparation techniques.

Here, we aimed to develop and validate a highly sensitive HPLC-MS/MS assay to quantify bitopertin in rat and marmoset plasma following administration of 1.0 mg/kg subcutaneously (s.c.).

2. Methods

2.1 Chemicals and reagents

Bitopertin was purchased from Tocris Bioscience through Cedarlane Laboratories (Burlington, ON, Canada). Blank drug free rat and marmoset plasma containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) as anticoagulant was obtained from BioIVT (Westbury, NY, USA). Glibenclamide, dimethyl sulfoxide (DMSO) and formic acid were purchased from Sigma Aldrich (St-Louis, MO, USA). Ammonium formate, acetonitrile, methanol and water were acquired from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA).

2.2 Calibration standards and quality control samples preparation

Stock solutions (1.0 mg/mL) of bitopertin and glibenclamide were prepared by dissolving accurately weighed reference compound into DMSO and methanol, respectively. Standard working

solutions of bitopertin were obtained by further dilutions in DMSO. Because of the rarity and expensiveness of marmoset plasma, calibration standards were prepared solely in blank rat plasma by spiking with the standard working solutions at 2% (v/v) to achieve an analytical scope from 0.300 – 200 ng/mL. Quality control samples were prepared in both rat and marmoset plasma. The internal standard working solution (ISWS) consisted of 5.00 ng/mL of glibenclamide in methanol.

2.3 Extraction procedure

Five hundred μL of ISWS was used as the precipitating agent and was added to an aliquot of 25 μL of plasma sample (rat or marmoset) in a conical polypropylene tube. The sample was vortexed for 5 sec and let stand for 10 min, after which it was centrifuged at $16,000 \times g$ for 10 min. To diminish sample dilution to a minimum, the supernatant was pipetted into a clean 13×100 mm borosilicate tube and evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream at 40°C . The dried extract was reconstituted with 100 μL of 40:60 methanol: 0.1% (v/v) formic acid in water, after which it was placed into an injection vial for analysis.

2.4 Chromatographic and mass spectrometric conditions

A Thermo Scientific TSQ Quantiva Triple Quadrupole mass spectrometer (San Jose, CA, USA) was interfaced with a Thermo Scientific UltiMate 3000 XRS UHPLC system (San Jose, CA, USA) using a pneumatic assisted heated electrospray ion source. Positive ion mode was used to conduct MS detection, employing multiple reaction monitoring (MRM). Standard solutions of bitopertin and glibenclamide were used to tune the mass spectrometer to obtain optimum analyte detection. The resulting parameters were nitrogen, used for the sheath, and auxiliary gases set to 50 and 15 arbitrary units, HESI electrode was set to 3,500 V, capillary temperature was set to 350°C , while vaporiser temperature was set to 400°C . The collision gas was argon, at a pressure of 2.5 mTorr.

The MRM transitions were set to 544.1→[199.0 + 295.1] for bitopertin and 494.2→ 169.0 for glibenclamide. The collision energies (Elab) were set to 40, 26 and 34 eV for product ions 199.0, 295.1 and 169.0, respectively. Total cycle time was 0.25 sec. The mass spectrometer was calibrated utilising an automated Thermo Scientific algorithm; peak widths of Q1 and Q3 were set to 0.7 full width half mass (FWHM). The separation was achieved with isocratic elution consisting of acetonitrile and water fortified at 0.1% (v/v) with formic acid at a 55:45 ratio on a Thermo Scientific Aquasil C18 analytical column (100 × 2.1 mm I.D., 5.0 µm) kept at 50°C. The flow rate was 250 µL/min, bitopertin and glibenclamide were eluted at 5.3 and 2.9 min. Five µL of the extracted sample was injected. Acquisition and analysis of data were conducted using the Xcalibur 4.0 software (San Jose, CA, USA). Each calibration curve was comprised of a double blank (matrix without analyte or internal standard), zero standard and 8 calibration points. Calibration curves were computed from the equation $y = ax + b$, based on the weight of the calibration lines created from the peak-area ratios of drug relative to the internal standard.

2.5 Stability evaluation

For freeze/thaw stability, quality control samples underwent three freeze and thaw cycles. In each of these cycles, the samples were let thaw at room temperature, after which they were refrozen for 24 h at -80°C. For short-term stability, stability samples remained at room temperature for a duration greater than the maximum time expected to conduct the sample preparation (5 h). For auto sampler stability, quality control samples were left in the auto sampler for 148 h. The stability sample concentrations were obtained against a freshly prepared rat plasma calibration curve.

2.6 Bioanalytical method validation

The method was validated according to the FDA regulatory guidelines (Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry, 2018) for the following parameters: selectivity, sensitivity, linearity, precision and accuracy, stability, matrix effect and recovery. The method selectivity was evaluated by processing rat and marmoset plasma from six individual sources as detailed above in the extraction procedures. The peak area response at the retention time of the analyte was compared to the peak area response of the rat plasma standard spiked at the LLOQ. As per the FDA recommendations, the analyte levels in the blank sample should be less than 20% of the LLOQ. For sensitivity, the LLOQ was set to the concentration of the lowest calibration standard resulting in an analyte response greater than 5 times the blank response with acceptable precision and accuracy (within 20%). To assess linearity, the calibration curve using the simplest model to adequately describe the concentration-response relationship was analysed. The best fit was achieved with least-squares linear regression analysis of the peak area ratio (analyte/IS) versus theoretical concentration of the calibration standard with a weighing factor of $(1/x)$. The calibration curve encompassed a blank (no analyte, no IS), a zero standard (no analyte with IS), as well as eight non-zero standards. The precision and accuracy across the analytical range were evaluated by detecting bitopertin at the LLOQ, low, medium, and high-quality control (QC) concentrations for rat plasma. Because of matrix limitations, precision and accuracy in marmoset plasma were evaluated at low, medium and high QC concentrations in six replicates per QC level in three independent runs. The intra- and inter-run precision was determined as relative standard deviation (RSD) and must be less than 15%, except at the LLOQ (within 20%, as mentioned above). The intra- and inter-run accuracy was expressed as relative error (RE) and should be smaller than 15%, or 20% at the LLOQ. The chemical stability of bitopertin was measured under several conditions. The effects of freeze and thaw, short-term and auto-sampler were assessed by back-calculating the stability at low, medium and high concentrations in both rat and marmoset plasma, against a freshly

generated rat calibration curve. The recovery was determined by extracting replicates (n=5) at low, medium and high concentrations in both rat and marmoset plasma and comparing the intensities of the extracted samples with those garnered from blank extracts reconstituted with pure reference solution at the same corresponding amount, which corresponded to 100% recovery.

2.7 Animals

Animal experiments were approved by the Montreal Neurological Institute Animal Care Committee and McGill University Animal Care and Use Committee and performed in agreement with the regulations defined by the Canadian Council on Animal Care. All efforts were made to avoid causing any suffering to animals; we worked in close collaboration with the Animal Care Committees and veterinary teams to improve animal's conditions. All experiments were conducted in specific experimental rooms around 09:00 am.

Six female Sprague-Dawley rats (225–250 g; Charles River, Saint-Constant, QC, Canada) were group-housed (3 per cage) under controlled settings of temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), humidity (55%), light (12-h light/dark cycle, lights on at 07:00 a.m.), with unlimited access to food and water. After arrival, rats were left undisturbed for one week to adapt to the new environment. The number of animals was determined based on previous studies (Maiti et al., 2007; Park et al., 2019).

Six (5 males and 1 female) common marmosets (McGill University breeding colony; 340-530g and aged between 3 and 6 years old at the time of experiments) were group-housed (2 per cage) under controlled conditions of temperature ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), humidity ($50 \pm 5\%$) and a 12 h light/dark cycle (07:15 a.m. lights on). Animals had unrestricted access to food, fresh fruits and water. The home cages were enhanced with nestboxes, primate toys and perches. The number of animals is in agreement with previous PK studies in the marmoset (Fernandez et al., 2019; Toda et al., 2018).

2.8 Application of the method

Bitopertin was dissolved in sterile 0.9% NaCl containing 0.3% (v/v) Tween 80 and injected s.c. to drug naïve Sprague Dawley rats or common marmosets at a dose of 1.0 mg/kg body weight (BW). Two min were allowed between each administration between rat subjects and five min between marmoset subjects. Blood samples (150 µL) were collected by jugular vein puncture in rats and tail vein puncture in marmosets at the following time points: predose, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 144 h and 216 h, as previously described (Gaudette et al., 2017; Gaudette et al., 2018; Hamadjida et al., 2018). A sparse sampling technique was utilised in marmoset (n=3 per time point), to limit the number of animals used, as previously reported (Frouni et al., 2019; Gaudette et al., 2018). Samples were transferred into K 3EDTA-coated tubes, delicately inverted, centrifuged at $1,500 \times g$ for 10 min at 4°C, then stored at -80 °C until analysis.

3. Results and discussion

3.1 Method development

Appropriate sample preparation is a critical element of quantitative bioanalysis. Protein precipitation technique (PPT) is abundantly employed since it offers a quick, generic and simple way to prepare samples. We evaluated different organic solvents, e.g. acetonitrile, acetone and methanol to precipitate proteins. Methanol was selected as it was the least expensive and provided the best recovery. The overall average recoveries were higher than 94.2% and 91.7% in rat and marmoset plasma, respectively (Table 1). The analysis of supernatant from plasma PPT samples

may at times result in matrix effects, a decrease or increase in ion signal caused by the presence of salts and/or endogenous material within the sample (Gosetti et al., 2010; Zhou et al., 2017). To assess possible matrix effect, we utilised a post extraction addition protocol (Zhou et al., 2017) at low, medium and high concentrations in six different donors in rat and, because of matrix limitations, five different donors in marmoset. The matrix effect was determined quantitatively by comparing the response of the analyte at low, medium and high levels in neat solution to the response of a post extract spiked with the analyte at the same concentration. No significant difference was encountered between the different plasma lots tested in each species (Table 2).

3.2 Tandem mass spectrometry

Positive ion mode was employed to acquire bitopertin and glibenclamide precursor and product ion spectra. Bitopertin and glibenclamide precursor ion spectra showed a strong signal for the protonated molecules ($[M+H]^+$) at m/z 544 and 494, respectively (Figure 1A and 1B). The product ion spectra of bitopertin revealed fragment ions at m/z 147, 184, 199, 277, 295 and 524, whereas glibenclamide displayed fragment ions at m/z 169, 288, 352, 369 and 395 (Figure 1C and D). Figure 2 depicts fragment ion structures for the MS/MS transitions of bitopertin and glibenclamide. For bitopertin, the mass spectrometer was set to MRM mode for best sensitivity, MS/MS transition were set to m/z 544 \rightarrow [199+295]. For glibenclamide, the mass spectrometer was programmed for best selectivity and the MS/MS transition inputted was 494 \rightarrow 169.

3.3 Selectivity, sensitivity and calibration curve analysis

For rat and marmoset matrices, interference was evaluated in each individual blank sample ($n=6$), and selectivity was assessed at the LLOQ. Absence of interfering components is adequate when

the blank sample response is no greater than 20% of LLOQ for the analyte and smaller than 5% for the internal standard. Interference caused by endogenous elements was not observed in any blank plasma evaluated in either species. The limit of detection (LOD), defined as the amount of analyte required to obtain at least 3 times the signal response of the blank response, was evaluated at 100 fg injected on column for both matrices. LLOQ was 0.3 ng/mL in rat plasma. Figure 3 depicts examples of chromatograms of extracted blank plasma in rodent and primate matrices, as well as a LLOQ sample in rat plasma and an overlay of extracted blank sample and a zero standard. A linear regression (1/x) modelled the concentration–detector relationship most accurately. The calculated coefficients of correlation (r) were higher than 0.9975 for an analytical range spanning 0.30 to 200 ng/mL in rat plasma.

3.4 Precision and accuracy

The method's reproducibility was determined by analysing six replicate plasma samples at three bitoperin concentrations 1.20, 4.80 and 60.0 ng/mL in rat and marmoset plasma within an analytical run (intra) and between three individual runs (inter). Precisions better than 13% and accuracies within the 93.2-112.8% range were obtained. Table 3 presents the intra- and inter-batch precision and accuracy of statistical analyses.

3.5 Stability

The stability of bitopertin under typical sample storage and analysis in the two species was assessed by conducting stability experiments. Stability results were determined by back-calculating the concentration of the stability samples (low, medium and high concentrations) compared to newly generated rat plasma calibration curve. Stability data were considered adequate when the average

accuracy value was within $\pm 15\%$ of the nominal value and the %RSD of the replicate (n=5) was less than 15%. Stability was measured for freeze and thaw, short-term and auto sampler. Bitopertin remained stable for at least three freeze/thaw cycles, 5 h short-term and 148 h in the auto sampler. Table 4 reports stability results.

3.6 Sample analysis

The analytical method described here is suitable for pre-clinical PK experiments as demonstrated by the analysis of bitopertin in rat and marmoset plasma after performing a pilot study where s.c. administration of 1.0 mg/kg BW was performed. Figure 4 illustrates the plasma concentration-time profiles in rat and marmoset.

Conclusion

We developed and validated a sensitive and selective HPLCHESI-MS/MS method for the quantitation of bitopertin in rat and marmoset plasma. The assay meets all conditions of specificity, sensitivity, linearity, precision, accuracy and stability generally accepted in bioanalytical chemistry. The method was suitable for the determination of PK parameters after a s.c. administration of 1.0 mg/kg BW in rats and marmosets.

ACKNOWLEDGEMENTS

Philippe Huot has research support from: Parkinson Canada (# 2017-1182, role: none), Fonds de Recherche Québec—Santé (# 34608, role: none), The Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (# RGPIN-2014-05993, role: main funding source.), The Michael J Fox Foundation for Parkinson’s Research (# 15166, role: none), Healthy Brains for Healthy Lives (# none, role: none), and The Weston Brain Institute (# TR150146, role: none). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

DATA AVAILABILITY

Underlying data

Open Science Framework: Development and validation of a sensitive HPLC-HESI-MS/MS method for quantitative determination of bitopertin in rat and marmoset plasma,

<https://doi.org/10.17605/OSF.IO/8U7VG> (Frouni, 2020)

This project contains the following underlying data:

- Validation raw data
- Chromatography raw data
- Spectrum raw data
- Figure 1: Raw data
- Figure 3: Raw data

- Figure 4: Raw data
- Table 1: Recovery data
- Table 2: Matrix affect data
- Table 3: Intra-Inter data
- Table 4: Stability data

Reporting guidelines

Open Science Framework: ARRIVE Guidelines Checklist for ‘Development and validation of a sensitive HPLC-HESI-MS/MS method for quantitative determination of bitopertin in rat and marmoset plasma’, <https://doi.org/10.17605/OSF.IO/8U7VG> (Frouni, 2020)

Data are available under the terms of the Creative Commons Zero "No rights reserved" data waiver (CC0 1.0 Public domain dedication).

References

- Armbruster, A., Neumann, E., Kötter, V., Hermanns, H., Werdehausen, R., & Eulenburg, V. (2018). The GlyT1 inhibitor bitopertin ameliorates allodynia and hyperalgesia in animal models of neuropathic and inflammatory pain. *Frontiers in molecular neuroscience, 10*, 438.
- Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry.* (2018). <https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm064964.htm>
- Bugarski-Kirola, D., Blaettler, T., Arango, C., Fleischhacker, W. W., Garibaldi, G., Wang, A., . . . Lawrie, S. (2017). Bitopertin in negative symptoms of schizophrenia—results from the phase III FlashLyte and DayLyte studies. *Biological psychiatry, 82*(1), 8-16.
- Castner, S., Murthy, N., Ridler, K., Herdon, H., Roberts, B., Weinzimmer, D., . . . Gunn, R. (2014). Relationship between glycine transporter 1 inhibition as measured with positron emission tomography and changes in cognitive performances in nonhuman primates. *Neuropsychopharmacology, 39*(12), 2742.
- D'Souza, D. C., Carson, R. E., Driesen, N., Johannesen, J., Ranganathan, M., Krystal, J. H., . . . Deaso, E. (2018). Dose-related target occupancy and effects on circuitry, behavior, and neuroplasticity of the glycine transporter-1 inhibitor PF-03463275 in healthy and schizophrenia subjects. *Biological psychiatry, 84*(6), 413-421.
- Dunayevich, E., Buchanan, R. W., Chen, C.-Y., Yang, J., Nilsen, J., Dietrich, J. M., . . . Marder, S. (2017). Efficacy and safety of the glycine transporter type-1 inhibitor

- AMG 747 for the treatment of negative symptoms associated with schizophrenia. *Schizophrenia research*, 182, 90-97.
- Gabernet, L., Pauly-Evers, M., Schwerdel, C., Lentz, M., Bluethmann, H., Vogt, K., . . . Boison, D. (2004). Enhancement of the NMDA receptor function by reduction of glycine transporter-1 expression. *Neuroscience letters*, 373(1), 79-84.
- Gaudette, F., Hamadjida, A., Bedard, D., Nuara, S. G., Beaudry, F., & Huot, P. (2017). Development and validation of a high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method to quantify LY-354,740 in rat and marmoset plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 1061-1062, 392-398. doi:10.1016/j.jchromb.2017.07.007
- Gaudette, F., Hamadjida, A., Bedard, D., Nuara, S. G., Gourdon, J. C., Michaud, V., . . . Huot, P. (2018). Development of a selective and sensitive high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay to support pharmacokinetic studies of LY-487,379 in rat and marmoset. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 1093-1094, 1-7. doi:10.1016/j.jchromb.2018.06.036
- Gosetti, F., Mazzucco, E., Zampieri, D., & Gennaro, M. C. (2010). Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1217(25), 3929-3937. doi:10.1016/j.chroma.2009.11.060
- Hamadjida, A., Nuara, S. G., Bedard, D., Gaudette, F., Beaudry, F., Gourdon, J. C., & Huot, P. (2018). The highly selective 5-HT_{2A} antagonist EMD-281,014 reduces dyskinesia and psychosis in the l-DOPA-treated parkinsonian marmoset. *Neuropharmacology*, 139, 61-67. doi:10.1016/j.neuropharm.2018.06.038

- Hirayasu, Y., Sato, S.-I., Takahashi, H., Iida, S., Shuto, N., Yoshida, S., . . . Higuchi, T. (2016). A double-blind randomized study assessing safety and efficacy following one-year adjunctive treatment with bitopertin, a glycine reuptake inhibitor, in Japanese patients with schizophrenia. *BMC psychiatry*, *16*(1), 66.
- Hofmann, C., Pizzagalli, F., Boetsch, C., Alberati, D., Ereshefsky, L., Jhee, S., . . . Martin-Facklam, M. (2016). Effects of the glycine reuptake inhibitors bitopertin and RG7118 on glycine in cerebrospinal fluid: results of two proofs of mechanism studies in healthy volunteers. *Psychopharmacology*, *233*(13), 2429-2439.
- Kantrowitz, J. T., Epstein, M. L., Lee, M., Lehrfeld, N., Nolan, K. A., Shope, C., . . . Javitt, D. C. (2018). Improvement in mismatch negativity generation during d-serine treatment in schizophrenia: correlation with symptoms. *Schizophrenia research*, *191*, 70-79.
- Kinney, G. G., Sur, C., Burno, M., Mallorga, P. J., Williams, J. B., Figueroa, D. J., . . . Conn, P. J. (2003). The glycine transporter type 1 inhibitor N-[3-(4'-fluorophenyl)-3-(4'-phenylphenoxy) propyl] sarcosine potentiates NMDA receptor-mediated responses in vivo and produces an antipsychotic profile in rodent behavior. *Journal of Neuroscience*, *23*(20), 7586-7591.
- Lane, H.-Y., Lin, C.-H., Huang, Y.-J., Liao, C.-H., Chang, Y.-C., & Tsai, G. E. (2010). A randomized, double-blind, placebo-controlled comparison study of sarcosine (N-methylglycine) and D-serine add-on treatment for schizophrenia. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *13*(4), 451-460.

- Lim, R., Hoang, P., & Berger, A. J. (2004). Blockade of glycine transporter-1 (GLYT-1) potentiates NMDA receptor-mediated synaptic transmission in hypoglossal motoneurons. *Journal of neurophysiology*, 92(4), 2530-2537.
- Nations, K. R., Smits, J., Tolin, D. F., Rothbaum, B. O., Hofmann, S. G., Tart, C. D., . . . Xue, D. (2012). Evaluation of the glycine transporter inhibitor Org 25935 as augmentation to cognitive-behavioral therapy for panic disorder: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *The Journal of clinical psychiatry*, 73(5), 647-653.
- Parrott, N., Hainzl, D., Alberati, D., Hofmann, C., Robson, R., Boutouyrie, B., & Martin-Facklam, M. (2013). Physiologically based pharmacokinetic modelling to predict single-and multiple-dose human pharmacokinetics of bitopertin. *Clinical pharmacokinetics*, 52(8), 673-683.
- Pinard, E., Alanine, A., Alberati, D., Bender, M., Borroni, E., Bourdeaux, P., . . . Hainzl, D. (2010). Selective GlyT1 inhibitors: discovery of [4-(3-fluoro-5-trifluoromethylpyridin-2-yl) piperazin-1-yl][5-methanesulfonyl-2-((S)-2, 2, 2-trifluoro-1-methylethoxy) phenyl] methanone (RG1678), a promising novel medicine to treat schizophrenia. *Journal of medicinal chemistry*, 53(12), 4603-4614.
- Rofail, D., Regnault, A., Le Scouiller, S., Berardo, C. G., Umbricht, D., & Fitzpatrick, R. (2016). Health-related quality of life in patients with prominent negative symptoms: results from a multicenter randomized Phase II trial on bitopertin. *Quality of Life Research*, 25(1), 201-211.

A Study of Bitopertin (RO4917838) in Adults With Non-Transfusion-Dependent (NTD) Beta-Thalassemia. In: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03271541>.

A Study of Bitopertin (RO4917838) in Combination With Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRIs) in Participants With Obsessive-Compulsive Disorder (OCD). In: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT01674361>.

Sur, C., & Kinney, G. G. (2007). Glycine transporter 1 inhibitors and modulation of NMDA receptor-mediated excitatory neurotransmission. *Current drug targets*, 8(5), 643-649.

Taher, A., Viprakasit, V., Cappellini, M. D., Kraus, D., Cech, P., Dietmar, V., . . . Dukart, J. (2018). Phase 2 Clinical Trial Results for Bitopertin, an Oral Glycine Transporter 1 Inhibitor, in Patients with Non-Transfusion Dependent Beta-Thalassemia. In: Am Soc Hematology.

Wu, P.-L., Tang, H.-S., Lane, H.-Y., Tsai, C.-A., & Tsai, G. E. (2011). Sarcosine therapy for obsessive compulsive disorder: a prospective, open-label study. *Journal of clinical psychopharmacology*, 31(3), 369-374.

Zhou, W., Yang, S., & Wang, P. G. (2017). Matrix effects and application of matrix effect factor. *Bioanalysis*, 9(23), 1839-1844. doi:10.4155/bio-2017-0214

List of figures

- Figure 1** Positive-mode ESI-MS and ESI-MS/MS spectra of bitopertin and glibenclamide produced after direct infusion on a triple quadrupole mass spectrometer (A) and (B) are precursor ion spectra showing singly charged bitopertin and glibenclamide ions at m/z 544 and 494 (C) and (D) are product ion spectra produced by collision-induced dissociation.
- Figure 2** Chemical structures and fragmentation ions for bitopertin (A) and glibenclamide (B)
- Figure 3** Reconstructed ion chromatograms for bitopertin and glibenclamide. (A) MRM transition at m/z 544 \rightarrow [199 +295] of an extracted rat blank sample (red line), an extracted marmoset blank sample (black line) and an extracted LLOQ plasma sample (blue line), (B) SRM transition m/z 494 \rightarrow 169 of an extracted rat blank sample (red line), an extracted marmoset blank sample (black line) and extracted blank with internal standard (blue line).
- Figure 4** Concentration-time profile for bitopertin in rat and marmoset plasma (mean \pm SD; $n = 6$ for rat, $n=3$ per timepoint for marmoset)

Figure 1

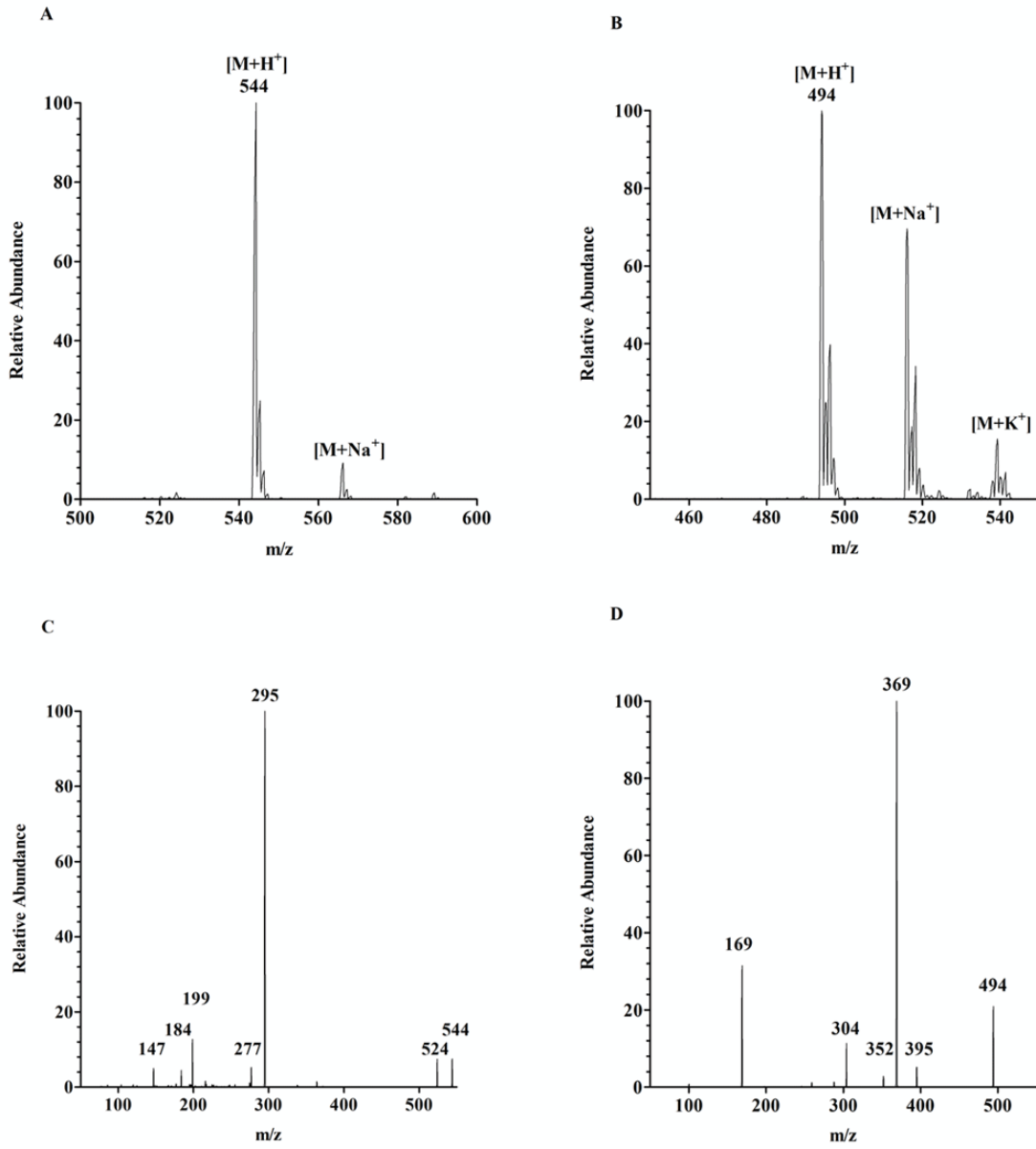


Figure 2:

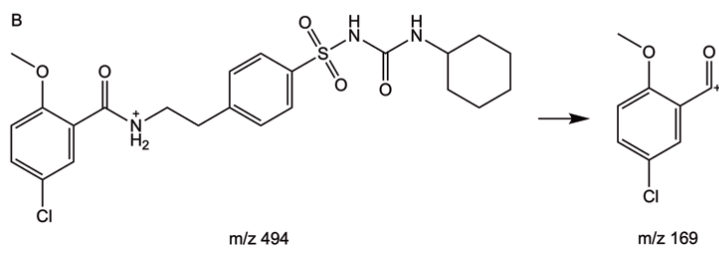
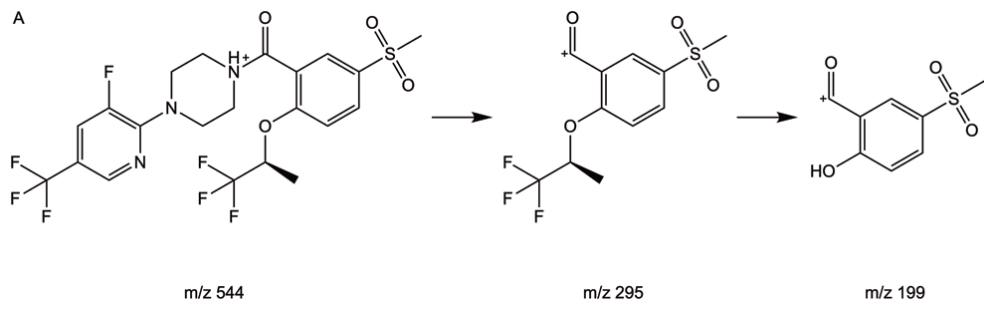
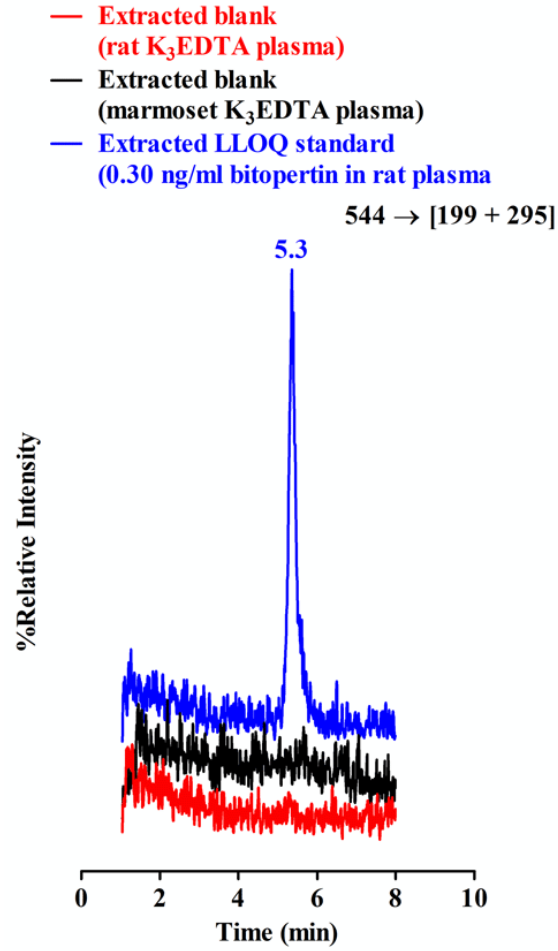


Figure 3:

A



B

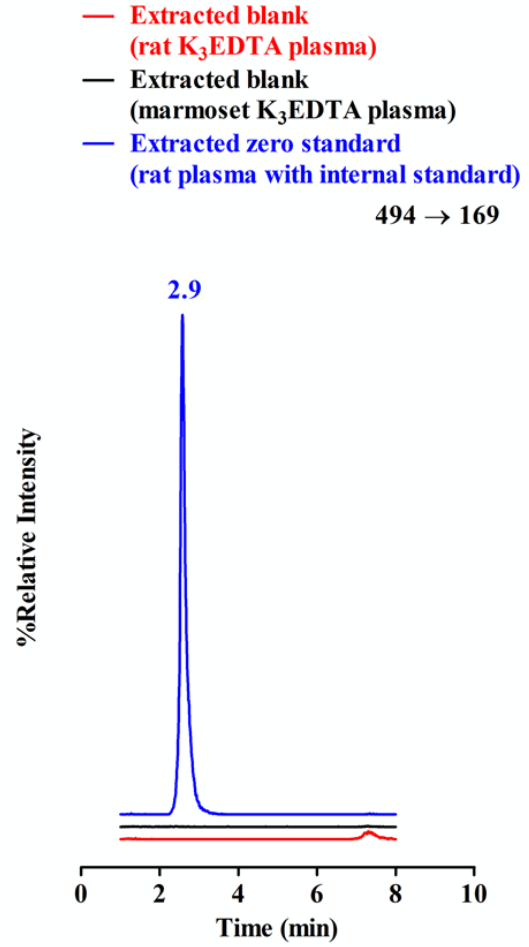


Figure 4:

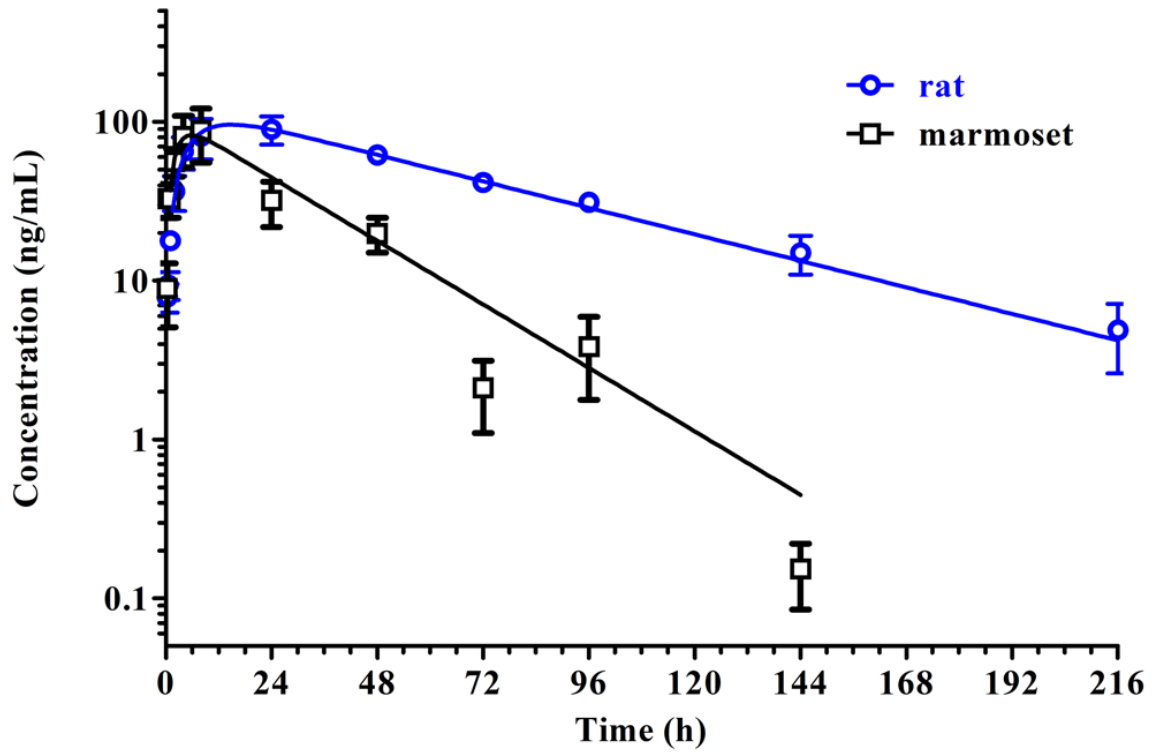


Table 1 Bitopertin recovery in rat and marmoset plasma. Recovery results are presented as percentage of the pure reference sample fortified in the blank extract (mean \pm SD; n=5).

species	bitopertin concentration (ng/mL)	% recovery
rat	1.20	102.4 \pm 10.4
	4.80	97.2 \pm 0.8
	60.0	94.2 \pm 6.9
marmoset	1.20	94.7 \pm 10.5
	4.80	93.7 \pm 0.9
	60.0	89.4 \pm 6.7

Table 2 Matrix effect of bitopertin at low, medium and high concentrations in different rat and marmoset plasma lots. (Percent nominal, mean \pm SD; n = 3)

species	bitopertin concentration (ng/mL)	lot-01	lot-02	lot-03	lot-04	lot-05	lot-06
rat	1.20	88.1 \pm 4.3	103.3 \pm 10.4	96.4 \pm 4.7	100.1 \pm 2.2	110.9 \pm 9.0	100.8 \pm 1.1
	4.80	95.8 \pm 2.9	105.6 \pm 9.3	99.5 \pm 4.3	103.1 \pm 3.6	103.1 \pm 1.1	101.5 \pm 3.3
	60.0	94.8 \pm 1.8	100.0 \pm 5.5	95.3 \pm 1.2	101.0 \pm 1.3	104.5 \pm 1.2	101.3 \pm 3.5
marmoset	1.20	93.7 \pm 5.8	105.5 \pm 4.8	94.5 \pm 2.9	99.7 \pm 7.3	97.6 \pm 3.8	
	4.80	99.4 \pm 4.3	106.0 \pm 3.9	100.1 \pm 1.7	99.5 \pm 4.5	99.0 \pm 2.7	
	60.00	98.3 \pm 0.8	96.4 \pm 0.0	99.6 \pm 2.4	98.1 \pm 3.8	98.3 \pm 3.2	

Table 3: Intra- and inter-batch precision and accuracy data for bitopertin in rat and marmoset plasma. (6 replicates per level (intra) in 3 individual runs (inter)).

species	bitopertin concentration (ng/mL)	intra (n=6)			inter (n=18)		
		mean \pm SD (ng/mL)	RSD (%)	RE (%)	mean \pm SD (ng/mL)	RSD (%)	RE (%)
rat	0.30	0.325 \pm 0.008	2.6	8.5	0.331 \pm 0.012	3.7	10.4
	1.20	1.30 \pm 0.02	1.8	8.5	1.17 \pm 0.09	8.1	-2.6
	4.80	5.35 \pm 0.10	1.7	11.5	4.66 \pm 0.50	10.8	-2.9
	60.0	67.7 \pm 1.9	2.9	12.8	64.1 \pm 5.4	8.4	6.8
marmoset	1.20	1.12 \pm 0.10	8.7	-6.8	1.17 \pm 0.12	10.1	-2.7
	4.80	4.57 \pm 0.59	13.0	-4.8	4.65 \pm 0.51	11.0	-3.2
	60.0	62.2 \pm 6.4	10.4	3.7	64.9 \pm 6.1	9.4	8.1

RSD = relative standard deviation, RE = relative error

Table 4: Freeze and thaw and short-term and auto sampler stability results for bitopertin in rat and marmoset plasma. (Percent nominal \pm SD; n = 3).

species	bitopertin concentration (ng/mL)	freeze/thaw (3 cycles)	short-term (5h)	auto sampler (148h)
rat	1.20	90.6 \pm 3.4	110.3 \pm 3.1	91.0 \pm 3.9
	4.80	89.5 \pm 6.2	110.0 \pm 6.1	86.1 \pm 5.5
	60.0	102.9 \pm 6.7	102.9 \pm 6.5	107.0 \pm 5.1
marmoset	1.20	108.0 \pm 5.3	108.0 \pm 5.3	92.8 \pm 4.7
	4.80	106.4 \pm 3.0	106.4 \pm 3.0	94.1 \pm 9.4
	60.0	112.5 \pm 6.8	112.4 \pm 6.8	104.1 \pm 11.9

Chapitre 2: Profil pharmacocinétique du bitopertin chez le rat

Article publié dans *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* en 2023

Accès: <https://doi.org/10.1007/s00210-022-02378-1>

Titre en français:

Profil pharmacocinétique du bitopertin, un inhibiteur sélectif de GlyT1, chez le rat.

Résumé en français:

Le bitopertin, un inhibiteur sélectif du transporteur de la glycine 1 (GlyT1), a été largement étudié pour le traitement de la schizophrénie, avec des profils d'innocuité et de tolérabilité connus en clinique. Alors que plusieurs expériences sur des rongeurs ont été rapportées, le profil pharmacocinétique (PK) du bitopertin chez les rats n'a pas été extensivement caractérisé, car seules deux études ont révélé des paramètres PK limités chez les rats mâles après administration orale. Ici, nous avons déterminé le profil PK de bitopertin chez des rates Sprague-Dawley. Des échantillons de sang ont été prélevés en série, avant et après administration sous-cutanée (0,03, 0,1, 0,3, 1 et 3 mg/kg) ou intraveineuse (0,1 mg/kg). Les niveaux plasmatiques ont été déterminés par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem à ionisation par électronébulisation thermique (HPLC-HESI MS/MS). Ensuite, les paramètres PK, y compris l'aire sous la courbe (AUC), le temps (T_{max}) jusqu'à la concentration plasmatique maximale (C_{max}), la clairance (CL), le volume de distribution (V_z), ainsi que la demi-vie ($T_{1/2}$), ont été calculés à l'aide d'une analyse non compartimentale. Après injection sous-cutanée, le bitopertin a présenté une $AUC_{0-\infty}$ (439,6–34 018,9 ng/mL) et un T_{max} (3,7–24,0 h) dépendants de la dose, une très longue $T_{1/2}$ terminale (35,06–110,32 h) et une faible CL (0,07– 0,13 L/h/kg), suggérant que le bitopertin est lentement absorbé et éliminé chez le rat. La relation observée entre la dose et l'étendue de

l'exposition au médicament (AUC) était linéaire. Après l'administration de toutes les doses sous-cutanées, les taux plasmatiques de bitopertin mesurés étaient comparables aux taux atteints avec les doses déjà administrées en clinique. Ces résultats pourront être utiles dans la conception d'expériences précliniques dans lesquelles ce médicament sera éventuellement administré par voie sous-cutanée.

Pharmacokinetic profile of bitopertin, a selective GlyT₁ inhibitor, in the rat

Authors: Imane Frouni ^{1,2}, Dominique Bédard ², Élodie Bourgeois-Cayer ², Adjia Hamadjida ², Fleur Gaudette ³, Francis Beaudry ^{4,5}, Philippe Huot ^{1,2,6,7}

¹ Département de pharmacologie et physiologie, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

² Neurodegenerative Disease Group, Montreal Neurological Institute-Hospital (The Neuro), Montreal, QC, Canada

³ Plateforme de Pharmacocinétique, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

⁴ Département de Biomédecine Vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada.

⁵ Centre de recherche sur le cerveau et l'apprentissage (CIRCA), Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

⁶ Movement Disorder Clinic, Division of Neurology, Department of Neurosciences, McGill University Health Centre, Montreal, QC, Canada

⁷ Department of Neurology and Neurosurgery, McGill University, Montreal, QC, Canada

Abstract

Bitopertin, a selective glycine transporter 1 (GlyT₁) inhibitor, has been extensively studied for the treatment of schizophrenia, with known safety and tolerability profiles in the clinic. Whereas several rodent experiments have been reported, the pharmacokinetic (PK) profile of bitopertin in rodents has not been extensively reported, as only two studies disclosed limited PK parameters in male rats after oral administration. Here, we determined the PK profile of bitopertin in female Sprague-Dawley rats. Blood samples were taken serially, before and after sub-cutaneous (0.03, 0.1, 0.3, 1, and 3 mg/kg) or intra-venous (0.1 mg/kg) administration. Plasma levels were determined by high-performance liquid chromatography coupled with heat-assisted electrospray ionisation tandem mass spectrometry (HPLC-HESI MS/MS). Subsequently, PK parameters were calculated using non-compartmental analysis, including area under the curve (AUC), time (T_{\max}) to maximal plasma concentration (C_{\max}), clearance (CL), volume of distribution (V_z), as well as half-life ($T_{1/2}$). Following sub-cutaneous injection, bitopertin exhibited dose-dependent $AUC_{0-\infty}$ (439.6–34,018.9 ng/mL) and T_{\max} (3.7–24.0 h), a very long terminal $T_{1/2}$ (35.06–110.32 h) and low CL (0.07–0.13 L/h/kg), suggesting that bitopertin is slowly absorbed and eliminated in the rat. The observed relationship between dose and the extent of drug exposure (AUC) was linear. Following administration of all sub-cutaneous doses, measured bitopertin plasma levels were comparable to levels achieved with doses already administered in the clinic. We hope that our results will be useful in the design of pre-clinical experiments in which this drug will eventually be administered sub-cutaneously.

Keywords: bitopertin, glycine transporter 1 inhibitor, rat plasma, pharmacokinetics, HPLC-HESI-MS/MS

Introduction

Glycine is a small amino acid that can be produced endogenously (Jackson 1991). Intracellular levels of glycine are mainly controlled by 2 glycine transporters (GlyT): GlyT1 and GlyT2 (Eulenburg et al. 2005). GlyT1 is expressed on glial cells and neurons, while GlyT2 is expressed on glycinergic neurons in the spinal cord, brainstem, and cerebellum (Zafra et al. 1995). The main function of GlyT1 is to regulate glycine levels at excitatory synapses (Johnson et al. 2003). GlyT1 is encountered in close proximity with synapses enriched with N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, suggesting a role in modulation of glutamatergic transmission (Cubelos et al. 2005). Indeed, inhibiting GlyT1 has become an appealing way to enhance NMDA receptor activity, leading to several clinical trials with drugs such as sarcosine, Org-25,935, or bitopertin targeting neurological disorders (Wu et al. 2011; Bugarski-Kirola et al. 2017; Nations et al. 2012).

Bitopertin (Fig. 1) is a potent and highly selective GlyT1 inhibitor (Alberati et al. 2012) that has been widely assessed as a potential treatment for schizophrenia, but generally with negative outcomes (Hirayasu et al. 2016; Kantrowitz et al. 2018; Rofail et al. 2016; Bugarski-Kirola et al. 2017). Despite the lack of positive outcomes in schizophrenia, bitopertin has been investigated for other potential clinical indications such as obsessive-compulsive disorder (NCT01674361) and anaemia of β -thalassaemia (Taher et al. 2018) but demonstrated negative results. A phase 2, double-blind, and placebo-controlled trial is currently investigating bitopertin safety, tolerability, and efficacy profile in patients with erythropoietic protoporphyria (NCT05308472). Pre-clinical investigations also revealed that bitopertin may elicit therapeutic benefits in the management of neuropathic pain and improve cognition (Armbruster et al. 2018; Castner et al. 2014).

Previous studies have provided only a partial picture of bitopertin pharmacokinetic (PK) profile in the rat; for instance, they estimated the clearance and volume at steady state (V_{ss}) in the rat after intra-venous (i.v.) administration, and comparable results were observed in the cynomolgus macaque (Pinard et al. 2010; Parrott et al. 2013). Almost 90% of the administered dose of bitopertin is eliminated by oxidative metabolism, mainly by cytochrome P450 (CYP)3A4, and less than 0.1% of total clearance is eliminated in the urine as unchanged drug (Boetsch et al. 2016).

So far, most reported PK studies administered bitopertin orally with poor to mild bioavailability with 23 to 78% in the rat and 55% in the cynomolgus macaque (Pinard et al. 2010). In the present study, we sought to determine the PK profile of bitopertin in the rat following sub-cutaneous (s.c.) and i.v. administration. Drug plasma concentration was determined using high-performance liquid chromatography coupled with heat-assisted electrospray ionisation tandem mass spectrometry (HPLC-HESI MS/MS) assay. We then discuss our results in light of the published pre-clinical studies with bitopertin in the rat, with a focus on plasma exposure and how their findings may translate into the clinic.

Material and methods

Chemicals

Bitopertin (also known as RG1678 and RO-4917838) was purchased from Cedarlane Laboratories (Burlington, ON, Canada). Dimethyl sulfoxide (DMSO), formic acid and Tween 80 were purchased from MilliporeSigma (Oakville, ON, Canada). Other chemicals, including methanol, ammonium formate, acetonitrile, and water, were purchased from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA). Drug-free rat plasma containing K3EDTA as anticoagulant was acquired from BioIVT

(Westbury, NY, USA). Solutions were prepared by dissolving bitopertin in DMSO at 100 mg/mL and then diluted to appropriate concentration in 0.03% Tween 80. Bitopertin was completely dissolved and was not in suspension.

Animals

Experiments were conducted on female Sprague–Dawley rats (250–275 g; Charles River, Saint-Constant, QC, Canada; N = 6/dose, total 36 rats). Rats were housed in groups of 3 under conditions of controlled temperature (21 ± 1 °C), humidity (55%), and light (12 h light-dark cycle, 07:00 lights on), with ad libitum access to food and water. All animals were cared for in accordance with a protocol approved by the Montreal Neurological Institute-Hospital (The Neuro) and McGill University (Animal Use Protocol 2017–7922), in compliance with the regulations defined by the Canadian Council on Animal Care.

Extraction procedure

The methodology employed for extraction and chromatography was described in detail previously (Frouni et al. 2020). Bitopertin was extracted from rat plasma using protein precipitation. Five hundred μ L of internal standard (5.00 ng/mL glibenclamide in methanol) were added to an aliquot of 25 μ L of rat plasma sample, vortexed for 5 s, allowed to rest for 10 min, and then centrifuged at $16,000 \times g$ for 10 min. The supernatant was dried at 40 °C under a gentle stream of nitrogen. The dried extract was resuspended with 100 μ L of 40:60 methanol:0.1% (v/v) formic acid in water and transferred into an injection vial for analysis.

Chromatography and mass spectrometry

A Thermo Scientific TSQ Quantiva Triple Quadrupole mass spectrometer (San Jose, CA, USA) was connected to a Thermo Scientific UltiMate 3000 XRS UHPLC system (San Jose, CA, USA) using a pneumatic-assisted heated electrospray ion source. MS detection was carried out in positive ion mode, with multiple reaction monitoring (MRM). The MRM transitions were set to $544.1 \rightarrow [199.0 + 295.1]$ for bitopertin. The separation was performed using isocratic elution with acetonitrile and water both fortified at 0.1% (v/v) with formic acid in a 55:45 ratio on a Thermo Scientific Aquasil C18 analytical column (100×2.1 mm I.D., $5.0 \mu\text{m}$) maintained at 50°C . The flow rate was $250 \mu\text{L}/\text{min}$, and bitopertin was eluted at 5.3 min. Five μL of the extracted sample were injected. The Xcalibur 4.0 software was used for data acquisition and analysis (San Jose, CA, USA). The method satisfied all the standard requirements for selectivity, sensitivity, linearity, precision and accuracy, and stability in bioanalytical chemistry (Frouni et al. 2020; FDA 2018). The reproducibility of the method was measured within an analytical run (intra-day) and between 3 individual runs (inter-day). Precisions were better than 13%, and accuracies were in the 92.7–112.8% range.

Plasma PK study

The method used to perform bitopertin quantification was previously published in detail (Frouni et al. 2020). Briefly, bitopertin was administered s.c. at 0.03, 0.1, 0.3, 1, and 3 mg/kg body weight (BW), and i.v. at 0.1 mg/kg BW. Following s.c. administration of bitopertin, we collected blood samples ($150 \mu\text{L}$) at each of the following time points: baseline (pre-dose), 15 min, 30 min, 1 h, 2

h, 3 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 144 h, and 216 h, as previously described (Frouni et al. 2020). All rats underwent sampling at each of these time points. After i.v. administration of bitopertin, blood samples were collected at the following time points: 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, and 48 h. All samples were collected by jugular vein puncture, transferred into K3EDTA-coated tubes, gently inverted, centrifuged at $1500 \times g$ for 10 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. Plasma concentrations of bitopertin were determined by HPLC-HESI MS/MS, as previously described (Frouni et al. 2020). The lower limit of quantitation (LLOQ) reached was 0.3 ng/mL in rat plasma.

Data analysis

Bitopertin plasma levels were determined from the mean concentration value at each time point by a non-compartmental analysis method using PKSolver (Zhang et al. 2010; Derendorf and Schmidt 2019) and were expressed as mean \pm standard deviation (SD). The linear trapezoidal rule was used to calculate the area under the curve (AUC) from the time of dosing to the final measured concentration (AUC_{0-t}) using Eq. 1. The AUC extrapolated to infinity ($\text{AUC}_{0-\infty}$) was calculated using Eq. 2, where C_{last} was the last measurable plasma concentration, and λ_z was the elimination rate constant calculated by using a minimum of 3 measurable plasma concentrations. Peak plasma concentration (C_{max}) and time to reach C_{max} (T_{max}) were determined. The elimination half-life ($T_{1/2}$) was calculated using Eq. 3. Clearance (CL) was determined using Eq. 4, and the volume of distribution (V_z) was calculated using Eq. 5. For i.v. administration, the extrapolated concentration (C_0) was the resulting concentration at $T = 0$. The steady-state volume of distribution (V_{ss}) was

determined using Eq. 6, where D is the drug dose and MRT (Eq. 7) is the mean residence time. Equation 8 provides the bioavailability (F) calculation.

$$AUC_{0-t_{last}} = \sum_1^n \frac{C_n + C_{n+1}}{2} (t_{n+1} - t_n) \text{ (Equation 1)}$$

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + \frac{C_{last}}{\lambda_z} \text{ (Equation 2)}$$

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda_z} \text{ (Equation 3)}$$

$$CL = \frac{DOSE}{AUC_{0-\infty}} \text{ (Equation 4)}$$

$$V_z = \frac{DOSE}{AUC_{0-\infty} \times \lambda_z} \text{ (Equation 5)}$$

$$V_{ss} = \left(\frac{DOSE}{AUC_{0-\infty}} \right) MRT \text{ (Equation 6)}$$

$$MRT = \frac{AUMC_{0-\infty}}{AUC_{0-\infty}} \text{ (Equation 7)}$$

$$\%F = \frac{AUC_{sc0-\infty}}{AUC_{iv0-\infty}} \times \frac{DOSE_{iv}}{DOSE_{sc}} \times 100 \text{ (Equation 8)}$$

Results

A total of 36 rats were used in the study, which were randomly divided into two groups (s.c. and i.v. administration). The first group received a single s.c. dose of bitopertin dissolved in DMSO and diluted with 0.03% Tween 80 (0.03, 0.1, 0.3, 1, or 3 mg/kg), with an injection volume of 1 mL/kg. The second group had a single i.v. dose of bitopertin (0.1 mg/kg). All groups had the same sampling time points for blood. No specific (visually distinguished) adverse effects (including local damage and redness at the site of administration) were observed in any of the rats after administration of bitopertin s.c. or i.v. All pre-dose samples for all doses showed no detectable

peak except for 1 rat administered the 0.3 mg/kg dose, which showed a concentration equivalent to LLOQ.

Pharmacokinetic profile of bitopertin in the rat after s.c. administration

As presented in Table 1 and Fig. 2, plasma concentrations of bitopertin were quantifiable up to 218 h following 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, or 3.0 mg/kg s.c. administration. Bitopertin (0.03, 0.1, 0.3, 1.0, or 3.0 mg/kg s.c.) was detected in the plasma as early as 5 min, with T_{max} values of 3.67 ± 0.82 , 3.67 ± 0.82 , 9.33 ± 7.45 , 18.67 ± 8.26 , and 24 ± 0.00 h, and $T_{1/2}$ values of 35.06 ± 10.03 , 35.32 ± 4.49 , 44.21 ± 9.17 , 44.55 ± 10.48 , and 110.32 ± 48.64 h, respectively, suggesting that bitopertin exhibited slow absorption and elimination. In addition, bitopertin plasma concentrations did not increase in a dose-dependent manner leading to C_{max} values of 9.18 ± 1.17 , 22.55 ± 3.34 , 46.76 ± 7.36 , 91.46 ± 19.19 , and 189.25 ± 33.91 ng/mL for 0.03, 0.1, 0.3, 1, and 3 mg/kg doses, respectively. The mean $AUC_{0-\infty}$ values calculated in plasma were comparable to the mean AUC_{0-t} values, suggesting that the extrapolated AUC was relatively small. MRT values of 51.50 ± 13.67 , 49.23 ± 5.79 , 62.10 ± 6.40 , 72.24 ± 15.58 , and 166.74 ± 60.01 h were obtained, respectively. The calculated MRT implied that the average time that bitopertin stays in the rat body following a s.c. administration is long and increases in a dose-dependent manner, indicating slower absorption, clearance, or both, thus impacting the potential duration of the drug effect following a single dose. CL/F values were 0.07 ± 0.01 , 0.09 ± 0.02 , 0.09 ± 0.01 , 0.13 ± 0.01 , and 0.09 ± 0.01 L/h/kg, while V_z/F values of 3.18 ± 0.79 , 4.55 ± 0.67 , 5.84 ± 1.15 , 8.23 ± 2.29 , and 13.88 ± 5.13 L/kg were found, respectively. The F observed was 100.3% when comparing s.c. and i.v. administration of bitopertin at 0.1 mg/kg, suggesting a complete drug absorption.

Pharmacokinetic profile of bitopertin in the rat after i.v. administration

Plasma PK parameters obtained following i.v. administration of bitopertin 0.1 mg/kg in the rat are summarised in Table 2 and illustrated in Fig. 3. Plasma concentrations of bitopertin were quantifiable up to 48 h with values above the LLOQ of this method published previously (Frouni et al. 2020). Bitopertin 0.1 mg/kg i.v. was rapidly detected in the plasma, with C₀ value of 55.29 ± 8.95 ng/mL. The mean AUC_{0–t} value represented 59.7% of mean AUC_{0–∞}; thus, the extrapolated AUC was notably high compared to AUC_{0–∞}, which implies that more sampling might be needed for an accurate estimate of the observed AUC. As reported in Table 2, T_{1/2} is very high with a value of 36.52 ± 5.52 h and MRT value of 52.09 ± 8.12 h. CL was 0.09 ± 0.01 L/h/kg, while V_Z and V_{ss} values of 4.64 ± 0.67 L/kg and 4.58 ± 0.66 L/kg were obtained, respectively. Despite the different routes of administration, bitopertin showed high values for V_Z, suggesting a significant drug tissue distribution.

Discussion

In this study, we sought to determine the plasma PK profile of bitopertin in healthy female rats. Female rats were selected, because their weight tends to remain stable over time. The PK profile of bitopertin in humans has been extensively studied (Parrott et al. 2013, 2014; Feng et al. 2016; Boetsch et al. 2016), but to the best of our knowledge, despite this extensive characterisation in human subjects, this is the first study reporting the PK profile of bitopertin in the rat following s.c. administration.

S.c. administration of bitopertin (0.03, 0.1, 0.3, 1, and 3 mg/kg) to female rats resulted in a slow absorption, with T_{max} varying from 3.7 to 24 h, slow elimination rate, with T_{1/2} ranging from 35

to 110 h, and dose-dependent C_{max} from 9 to 189 ng/mL. A previous study summarily reported the PK profile of bitopertin in male rats following oral (p.o.) administration. After p.o. administration of bitopertin 3 mg/kg, C_{max} reached 721 ± 93.73 ng/mL with a T_{max} of 1 h (Pinard et al. 2010). These results suggest a faster absorption of bitopertin after p.o. compared to s.c. administration in the rat. Another possibility is that bitopertin might be absorbed faster in male rats compared to female rats, although this is difficult to ascertain, as the routes of administration were also different. Of note, previous studies in humans did not discover differences in the PK of bitopertin between female and male individuals, which implies that our findings may translate to both men and women in the clinic. That being said, we must emphasise that, because the experiments were only performed on female rats, our findings, or portions of them, may not be relevant to male rats.

We also note that the T_{max} was dose-dependent in our studies. Whereas speculative, it may be because s.c. administration leads to a relatively slow, sustained release of the drug. S.c. rate of absorption into the blood is also perfusion-limited, and the adipose tissue layer is acting like a drug reservoir. Collectively, these 2 possibilities may explain why it took longer for higher bitopertin doses to achieve T_{max} .

In our study, after a single administration of bitopertin 0.1 mg/kg i.v. to female rats, V_z was 4.64 ± 0.67 L/kg, which is in agreement with the literature data in male rats, in which bitopertin 2 mg/kg i.v. had a lower V_z , at 3.58 ± 0.50 L/kg (Pinard et al. 2010).

We believe that bitopertin exhibits a linear PK profile in the rat. Thus, following a thorough examination of derived plasma PK parameters following s.c. administration of bitopertin, we observed a linear relationship of individual AUC values versus doses. However, the terminal $T_{1/2}$

does not remain constant, which may suggest drug elimination saturation. However, against this possibility, saturation of drug elimination should have translated into a significant change in relative drug clearance (Cl/F), which was not observed. Furthermore, since following a s.c. administration, absorption, distribution, and elimination may simultaneously occur for an extended period of time, we cannot be certain that we are observing a pure elimination phase, particularly at higher dosing regimen.

From a translational perspective, plasma concentrations of bitopertin in human after acute administration of ≈ 700 ng/mL were reported to be well tolerated, which is well above the C_{max} we obtained here (189 ± 33.91 ng/mL) (Hofmann et al. 2012). To the best of our knowledge, bitopertin has not been administered s.c. to other species.

In the next paragraphs, we will discuss our results in light of the previously published literature in the rat for indications pertaining to schizophrenia and anaemia, which are conditions for which bitopertin was assessed in this rodent species.

Schizophrenia

In rat models of schizophrenia, bitopertin generally produced beneficial results. The effects of amphetamine on locomotor activity in rodents has been extensively used to replicate positive symptoms of schizophrenia, while the NMDA antagonist phencyclidine (PCP) mimics negative symptoms such as social withdrawal (Gururajan et al. 2010; Enomoto et al. 2007; Van Den Buuse et al. 2005; Jentsch and Roth 1999). Administration of amphetamine (1 mg/kg intra-peritoneally [i.p.]) to male rats induced significant hyperlocomotion in rats treated chronically with vehicle or PCP (5 mg/kg i.p.). Adding bitopertin (1, 3, and 10 mg/kg p.o.) dose dependently suppressed hyperlocomotion in PCP-injected rats, while only bitopertin 10 mg/kg reduced amphetamine-

induced hyperlocomotion in vehicle-treated rats (Alberati et al. 2012). In another study, bitopertin (0.3, 1, and 3 mg/kg, p.o.) did not reverse social withdrawal induced by PCP administration in male Wistar rats (Deiana et al. 2014). Of note, in these studies, plasma levels reached with the effective doses were likely in the upper range of the well-tolerated doses in clinical settings with 721 ng/mL for 3 mg/kg in the rat versus 700 ng/mL in healthy patients (Parrott et al. 2013; Pinard et al. 2010). Lastly, bitopertin (1-10 mg/kg p.o.) reversed the deleterious effects of dopamine D2 antagonism on effort-related decisions, possibly benefitting patients who are treated with such drugs (Yohn et al. 2017).

However, the translational potential of the effect achieved with bitopertin 10 mg/kg on hyperlocomotion remains uncertain, as it is unclear that corresponding plasma exposure would have been well tolerated in the clinic. In addition, in the clinic, U-shaped dose-response curves have been observed, with maximal benefit being conferred by lower doses and, as a correlate, lower plasma exposure (Hirayasu et al. 2016; Umbricht et al. 2014).

Anaemia

Glycine is an essential substrate to produce haem and globin (Nathan et al. 1961). GlyT1 inhibition by bitopertin in erythroid cells reduces intracellular glycine availability, thereby interfering with haem synthesis (Winter et al. 2016). Whereas bitopertin was not assessed for the treatment of anaemia per se in rats, it was discovered that it may induce microcytic anaemia. In female rats, daily administration of bitopertin (1-15 mg/kg, p.o.) led to a reduction of the mean erythrocyte corpuscular haemoglobin, reticulocyte haemoglobin (Ret-Y), and mean corpuscular volume, but only Ret-Y count reached complete normalisation after treatment discontinuation (Winter et al.

2016). Thus, inhibition of GlyT1 with bitopertin disrupted haemoglobin synthesis by causing microcytic hypochromic regenerative anaemia.

In addition, rats treated with bitopertin (1-15 mg/kg, p.o) presented a significant increase in iron-stained regions such as the spleen and a moderate increase in the mean serum ferritin levels, confirming iron retention (Winter et al. 2016). Discontinuation of bitopertin restored normal mean serum ferritin levels, thus normalising haem biosynthesis (Winter et al. 2016).

Similarly, in a phase II clinical trial intended to investigate the safety, tolerability, efficacy, PK, and pharmacodynamic profiles following daily p.o. administration of bitopertin (30-90 mg) in adults with non-transfusion-dependent β -thalassaemia, mean total haemoglobin was reduced in patients after 8 weeks, which led to lowering the dosage (30 mg/day) to avoid severe suppression of haem biosynthesis and globin chain production, but the outcomes remained unchanged (Taher et al. 2021).

Given that the lowest reported dose leading to anaemia in the rat is 1 mg/kg p.o., and that the reported plasma levels for a dose of 3 mg/kg p.o. is 721 ng/mL, we speculate that the plasma levels after the administration of 1 mg/kg p.o. to be around 240 ng/mL. When comparing bitopertin plasma levels leading to anaemia in healthy male volunteers, 200-300 ng/mL, to those inducing anaemia in rat, it is striking to note that the plasma levels at which blood dyscrasia occurs are similar in both species and are also lower than the upper end of the well tolerated plasma concentrations of bitopertin in the clinic (Pinard et al. 2010; Parrott et al. 2013). These results suggest that anaemia might be an indissociable feature of bitopertin administration, in both rat and human, at least with the plasma exposures discussed above. Whether lower plasma concentrations of bitopertin would also lead to anaemia remains to be determined.

Conclusion

In summary, we have determined the PK profile of bitopertin in the rat after s.c. and i.v. administration. PK-related differences between rat and human have been discussed, hopefully leading to high translational success between rodents and humans when bitopertin is administered s.c. in pre-clinical studies conducted in the rat. Metabolic studies are required to determine whether the rat PK parameters may be extrapolated to other species such as non-human primates and humans.

References

- Administration, F. a. D. (2018). Bioanalytical method validation guidance for industry. Retrieved from <https://www.fda.gov/media/70858/download>
- Alberati, D., Moreau, J.-L., Lengyel, J., Hauser, N., Mory, R., Borroni, E., . . . Hainzl, D. (2012). Glycine reuptake inhibitor RG1678: a pharmacologic characterization of an investigational agent for the treatment of schizophrenia. *Neuropharmacology*, *62*(2), 1152-1161.
- Armbruster, A., Neumann, E., Kötter, V., Hermanns, H., Werdehausen, R., & Eulenburg, V. (2018). The GlyT1 inhibitor bitopertin ameliorates allodynia and hyperalgesia in animal models of neuropathic and inflammatory pain. *Frontiers in molecular neuroscience*, *10*, 438.
- Barrow, P., Parrott, N., Alberati, D., Paehler, A., & Koerner, A. (2016). Preclinical reproductive and developmental toxicity profile of a glycine transporter type 1 (Glyt1) inhibitor. *Birth Defects Research Part B: Developmental Reproductive Toxicology*, *107*(3), 148-156.
- Boetsch, C., Parrott, N., Fowler, S., Poirier, A., Hainzl, D., Banken, L., . . . Hofmann, C. (2016). Effects of cytochrome P450 3A4 inhibitors—ketoconazole and erythromycin—on bitopertin pharmacokinetics and comparison with physiologically based modelling predictions. *Clinical pharmacokinetics*, *55*(2), 237-247.
- Bugarski-Kirola, D., Blaettler, T., Arango, C., Fleischhacker, W. W., Garibaldi, G., Wang, A., . . . Lawrie, S. (2017). Bitopertin in negative symptoms of schizophrenia—results from the phase III FlashLyte and DayLyte studies. *Biological psychiatry*, *82*(1), 8-16.
- Castner, S., Murthy, N., Ridler, K., Herdon, H., Roberts, B., Weinzimmer, D., . . . Gunn, R. (2014). Relationship between glycine transporter 1 inhibition as measured with positron emission

- tomography and changes in cognitive performances in nonhuman primates. *Neuropsychopharmacology*, 39(12), 2742.
- Correll, C. U., Kim, E., Sliwa, J. K., Hamm, W., Gopal, S., Mathews, M., . . . Saklad, S. R. (2021). Pharmacokinetic characteristics of long-acting injectable antipsychotics for schizophrenia: an overview. *CNS drugs*, 1-21.
- Cubelos, B., Giménez, C., & Zafra, F. (2005). Localization of the GLYT1 glycine transporter at glutamatergic synapses in the rat brain. *Cerebral cortex*, 15(4), 448-459.
- Deiana, S., Rosenbrock, H., & Arban, R. (2014). Effects of Clozapine, Aripiprazole and Bitopertin in Rats Social Withdrawal Assessed in an Automatic Social Interaction Test. *Measuring Behavior*.
- Disc Medicine, I. (2022). Study of Bitopertin to Evaluate the Safety, Tolerability, Efficacy, and PPIX Concentrations in Participants With EPP. In: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT05308472>.
- Enomoto, T., Noda, Y., & Nabeshima, T. (2007). Phencyclidine and genetic animal models of schizophrenia developed in relation to the glutamate hypothesis. *Methods findings in experimental clinical Pharmacology Therapeutics*, 29(4), 291-302.
- Eulenburg, V., Arnsen, W., Betz, H., & Gomeza, J. (2005). Glycine transporters: essential regulators of neurotransmission. *Trends in biochemical sciences*, 30(6), 325-333.
- Feng, S., Shi, J., Parrott, N., Hu, P., Weber, C., Martin-Facklam, M., . . . Peck, R. (2016). Combining ‘bottom-up’ and ‘top-down’ methods to assess ethnic difference in clearance: bitopertin as an example. *Clinical pharmacokinetics*, 55(7), 823-832.
- Fonseca-Rodrigues, D., Amorim, D., Almeida, A., & Pinto-Ribeiro, F. (2021). Emotional and cognitive impairments in the peripheral nerve chronic constriction injury model (CCI) of neuropathic pain: A systematic review. *Behavioural brain research*, 399, 113008.

- Frouni, I., Gaudette, F., Bédard, D., Nuara, S. G., Kwan, C., Hamadjida, A., . . . Huot, P. (2020). Development and validation of a sensitive HPLC-HESI-MS/MS method for quantitative determination of bitopertin in rat and marmoset plasma. *MNI Open Research*, 4, 2.
- Gururajan, A., Taylor, D. A., & Malone, D. T. (2010). Current pharmacological models of social withdrawal in rats: relevance to schizophrenia. *Behavioural pharmacology*, 21(8), 690-709.
- Hirayasu, Y., Sato, S.-I., Takahashi, H., Iida, S., Shuto, N., Yoshida, S., . . . Higuchi, T. (2016). A double-blind randomized study assessing safety and efficacy following one-year adjunctive treatment with bitopertin, a glycine reuptake inhibitor, in Japanese patients with schizophrenia. *BMC psychiatry*, 16(1), 66.
- Hofmann, C., Banken, L., Hahn, M., Swearingen, D., Nagel, S., & Martin-Facklam, M. (2012). Evaluation of the effects of bitopertin (RG1678) on cardiac repolarization: a thorough corrected QT study in healthy male volunteers. *Clinical therapeutics*, 34(10), 2061-2071.
- Jackson, A. (1991). The glycine story. *European journal of clinical nutrition*, 45(2), 59-65.
- Jentsch, J. D., & Roth, R. H. (1999). The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 20(3), 201-225.
- Johnson, K. W., CLEMENS-SMITH, A., Nomikos, G., Davis, R., Phebus, L., Shannon, H., . . . Bymaster, F. (2003). In vivo characterization of changes in glycine levels induced by GlyT1 inhibitors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1003(1), 412-414.
- Kantrowitz, J. T., Epstein, M. L., Lee, M., Lehrfeld, N., Nolan, K. A., Shope, C., . . . Javitt, D. C. (2018). Improvement in mismatch negativity generation during d-serine treatment in schizophrenia: correlation with symptoms. *Schizophrenia research*, 191, 70-79.

- Lu, Y., Dong, H., Gao, Y., Gong, Y., Ren, Y., Gu, N., . . . Ji, R.-R. (2013). A feed-forward spinal cord glycinergic neural circuit gates mechanical allodynia. *The Journal of clinical investigation*, 123(9), 4050-4062.
- Nathan, D. G., Piomelli, S., & Gardner, F. H. (1961). The synthesis of heme and globin in the maturing human erythroid cell. *The Journal of clinical investigation*, 40(6), 940-946.
- Nations, K. R., Smits, J. A., Tolin, D. F., Rothbaum, B. O., Hofmann, S. G., Tart, C. D., . . . Xue, D. (2012). Evaluation of the glycine transporter inhibitor Org 25935 as augmentation to cognitive-behavioral therapy for panic disorder: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *The Journal of clinical psychiatry*, 73(5), 6751.
- Parrott, N., Hainzl, D., Alberati, D., Hofmann, C., Robson, R., Boutouyrie, B., & Martin-Facklam, M. (2013). Physiologically based pharmacokinetic modelling to predict single-and multiple-dose human pharmacokinetics of bitopertin. *Clinical pharmacokinetics*, 52(8), 673-683.
- Parrott, N., Hainzl, D., Scheubel, E., Krimmer, S., Boetsch, C., Guerini, E., & Martin-Facklam, M. (2014). Physiologically based absorption modelling to predict the impact of drug properties on pharmacokinetics of bitopertin. *The AAPS journal*, 16(5), 1077-1084.
- Pinard, E., Alanine, A., Alberati, D., Bender, M., Borroni, E., Bourdeaux, P., . . . Hainzl, D. (2010). Selective GlyT1 inhibitors: discovery of [4-(3-fluoro-5-trifluoromethylpyridin-2-yl)piperazin-1-yl][5-methanesulfonyl-2-((S)-2, 2, 2-trifluoro-1-methylethoxy) phenyl] methanone (RG1678), a promising novel medicine to treat schizophrenia. *Journal of medicinal chemistry*, 53(12), 4603-4614.
- Prescott, S. A. (2015). Synaptic inhibition and disinhibition in the spinal dorsal horn. *Progress in molecular biology translational science*, 131, 359-383.

- Quirós Cognuck, S., Reis, W. L., Silva, M., Debarba, L. K., Mecawi, A. S., de Paula, F. J., . . . Antunes-Rodrigues, J. (2020). Sex differences in body composition, metabolism-related hormones, and energy homeostasis during aging in Wistar rats. *Physiological Reports*, 8(20), e14597.
- Roche, H.-L. (2017). A Study of Bitopertin (RO4917838) in Combination With Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRIs) in Participants With Obsessive-Compulsive Disorder (OCD). In: <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT01674361>.
- Rofail, D., Regnault, A., Le Scouiller, S., Berardo, C. G., Umbricht, D., & Fitzpatrick, R. (2016). Health-related quality of life in patients with prominent negative symptoms: results from a multicenter randomized Phase II trial on bitopertin. *Quality of Life Research*, 25(1), 201-211.
- Rowland, M., & Tozer, T. N. (1980). *Clinical pharmacokinetics concepts and applications* (L. Febiger Ed.). Philadelphia.
- Taher, A., Viprakasit, V., Cappellini, M. D., Kraus, D., Cech, P., Dietmar, V., . . . Dukart, J. (2018). Phase 2 Clinical Trial Results for Bitopertin, an Oral Glycine Transporter 1 Inhibitor, in Patients with Non-Transfusion Dependent Beta-Thalassemia. In: Am Soc Hematology.
- Taher, A. T., Viprakasit, V., Cappellini, M. D., Kraus, D., Cech, P., Volz, D., . . . Khwaja, O. (2021). Haematological effects of oral administration of bitopertin, a glycine transport inhibitor, in patients with non-transfusion-dependent β -thalassaemia. *British journal of haematology*.
- Umbricht, D., Alberati, D., Martin-Facklam, M., Borroni, E., Youssef, E. A., Ostland, M., . . . Santarelli, L. (2014). Effect of bitopertin, a glycine reuptake inhibitor, on negative symptoms of schizophrenia: a randomized, double-blind, proof-of-concept study. *JAMA Psychiatry*, 71(6), 637-646. doi:10.1001/jamapsychiatry.2014.163

- Van Den Buuse, M., Garner, B., Gogos, A., & Kusljic, S. (2005). Importance of animal models in schizophrenia research. *Australian New Zealand Journal of Psychiatry*, 39(7), 550-557.
- Watson, R. E., DeSesso, J. M., Hurtt, M. E., & Cappon, G. D. (2006). Postnatal growth and morphological development of the brain: a species comparison. *Birth Defects Research Part B: Developmental Reproductive Toxicology*, 77(5), 471-484.
- Winter, M., Funk, J., Körner, A., Alberati, D., Christen, F., Schmitt, G., . . . Singer, T. (2016). Effects of GlyT1 inhibition on erythropoiesis and iron homeostasis in rats. *Experimental hematology*, 44(10), 964-974.
- Wu, P.-L., Tang, H.-S., Lane, H.-Y., Tsai, C.-A., & Tsai, G. E. (2011). Sarcosine therapy for obsessive compulsive disorder: a prospective, open-label study. *Journal of clinical psychopharmacology*, 31(3), 369-374.
- Yohn, S., Alberati, D., Correa, M., & Salamone, J. (2017). Assessment of a glycine uptake inhibitor in animal models of effort-related choice behavior: implications for motivational dysfunctions. *Psychopharmacology*, 234.
- Zafra, F., Aragon, C., Olivares, L., Danbolt, N. C., Gimenez, C., & Storm-Mathisen, J. (1995). Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *Journal of Neuroscience*, 15(5), 3952-3969.
- Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., & Xie, S. (2010). PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Computer methods programs in biomedicine.*, 99(3), 306-314.

Statement and Declarations

Funding: No specific funding was received for this project.

Competing interest: There are no conflicts of interest. PH has received payments from Neurodiem, AbbVie, Sanford Burnham Prebys, Sunovion, adMare BioInnovations, ConSynance Therapeutics and Throughline Strategy.

Author contribution

1) Research project: A. Conception, B. Organisation, C. Execution.

2) Manuscript: A. Writing of the first draft, B. Review and Critique.

IF: 1B, 1C, 2A, 2B; DB: 1B, 1C, 2B; EBC: 1C, 2B; AH: 1B; 2B; FG: 1A, 1B, 1C, 2B; FB: 1A, 1B, 1C, 2B; PH: 1A, 1B, 2B.

Ethics approval: This study was approved by the ethics committee of McGill University and the Montreal Neurological Institute-Hospital (The Neuro, Animal Use Protocol 2017-7922) in accordance with the regulations defined by the Canadian Council on Animal Care.

Data and materials availability: Available upon written request to the corresponding author.

Table 1. Derived plasma PK parameters following s.c. administration of bitopertin in the rat

parameters	0.03 mg/kg (mean±SD)	0.1 mg/kg (mean±SD)	0.3 mg/kg (mean±SD)	1 mg/kg (mean±SD)	3 mg/kg (mean±SD)
AUC _{0-t} (ng/mL•h)	454.69±90.88	1117.31±293.91	3183.00±362.37	7550.98±676.98	25179.53±3995.96
AUC _{0-∞} (ng/mL•h)	479.58±96.71	1150.75±290.95	3291.11±384.39	7892.31±555.17	34018.87±4293.23
C _{max} (ng/mL)	9.18±1.17	22.55±3.34	46.76±7.36	91.46±19.19	189.25±33.91
T _{max} (h)	3.67±0.82	3.67±0.82	9.33±7.45	18.67±8.26	24.00±0.00
T _{1/2} (h)	35.06±10.03	35.32±4.49	44.21±9.17	44.55±10.48	110.32±48.64
CL/F (L/h/kg)	0.07±0.01	0.09±0.02	0.09±0.01	0.13±0.01	0.09±0.01
V _z /F (L/kg)	3.18±0.79	4.55±0.67	5.84±1.15	8.23±2.29	13.88±5.13
MRT (h)	51.50±13.67	49.23±5.79	62.10±6.40	72.24±15.58	166.74±60.09

AUC: area under the curve; CL: clearance; C_{max}: maximal plasma concentration; F: bioavailability; MRT: mean residence time; s.c.: subcutaneous; T_{1/2}: terminal half-life; T_{max}: time to maximal plasma concentration; V_z: volume of distribution. *N* = 6 per dose.

Table 2. Derived plasma PK parameters following i.v. administration of bitopertin 0.1 mg/kg in the rat

parameters	0.1 mg/kg (mean±SD)
AUC _{0-t} (ng/mL•h)	684.69±90.54
AUC _{0-∞} (ng/mL•h)	1147.43±201.59
C ₀ (ng/mL)	55.29±8.95
T _{max} (h)	0.08±0.00
T _{1/2} (h)	36.52±5.52
CL (L/h/kg)	0.09±0.01
V _z (L/kg)	4.64±0.67
MRT (h)	52.09±8.12
V _{ss} (L/kg)	4.58±0.66

AUC: area under the curve; C_{max}: maximal plasma concentration; C₀: extrapolated concentration at T = 0; CL: clearance; F: bioavailability; i.v.: intravenous; s.c.: subcutaneous; T_{max}: time to maximal plasma concentration; T_{1/2}: terminal half-life; V_z: volume of distribution; V_{ss}: volume of distribution at steady state; MRT: mean residence time. N = 6 per dose.

Figure legends

Figure 1: Chemical structure of bitopertin.

Figure 2: Mean (\pm SD) concentration-time profile of bitopertin (0.03, 0.1, 0.3, 1 or 3 mg/kg) in rat ($N = 6$ /dose) following s.c. administration.

Figure 3: Mean (\pm SD) concentration-time profile of bitopertin 0.1 mg/kg in rat ($N = 6$) following i.v. administration.

Figure 1

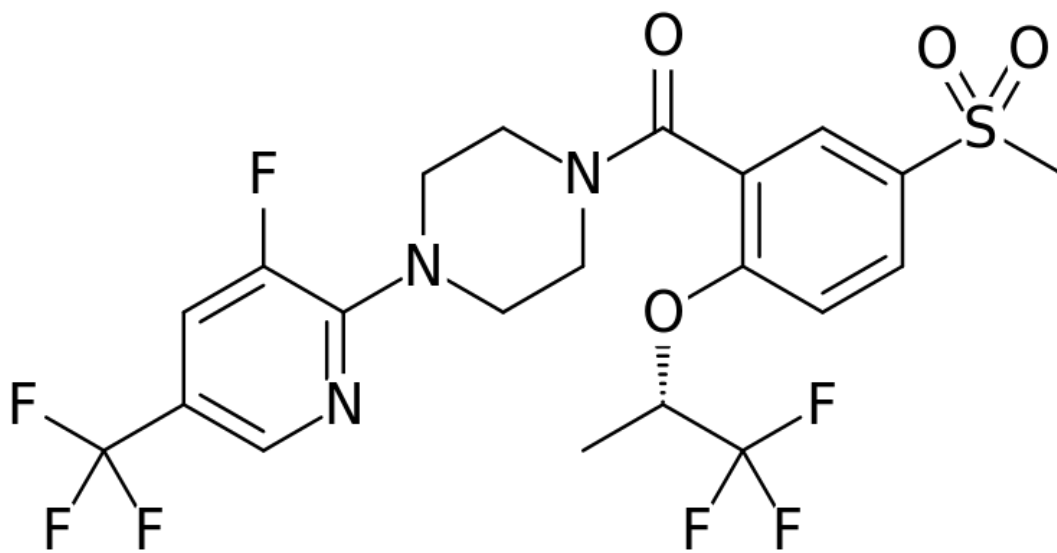


Figure 2

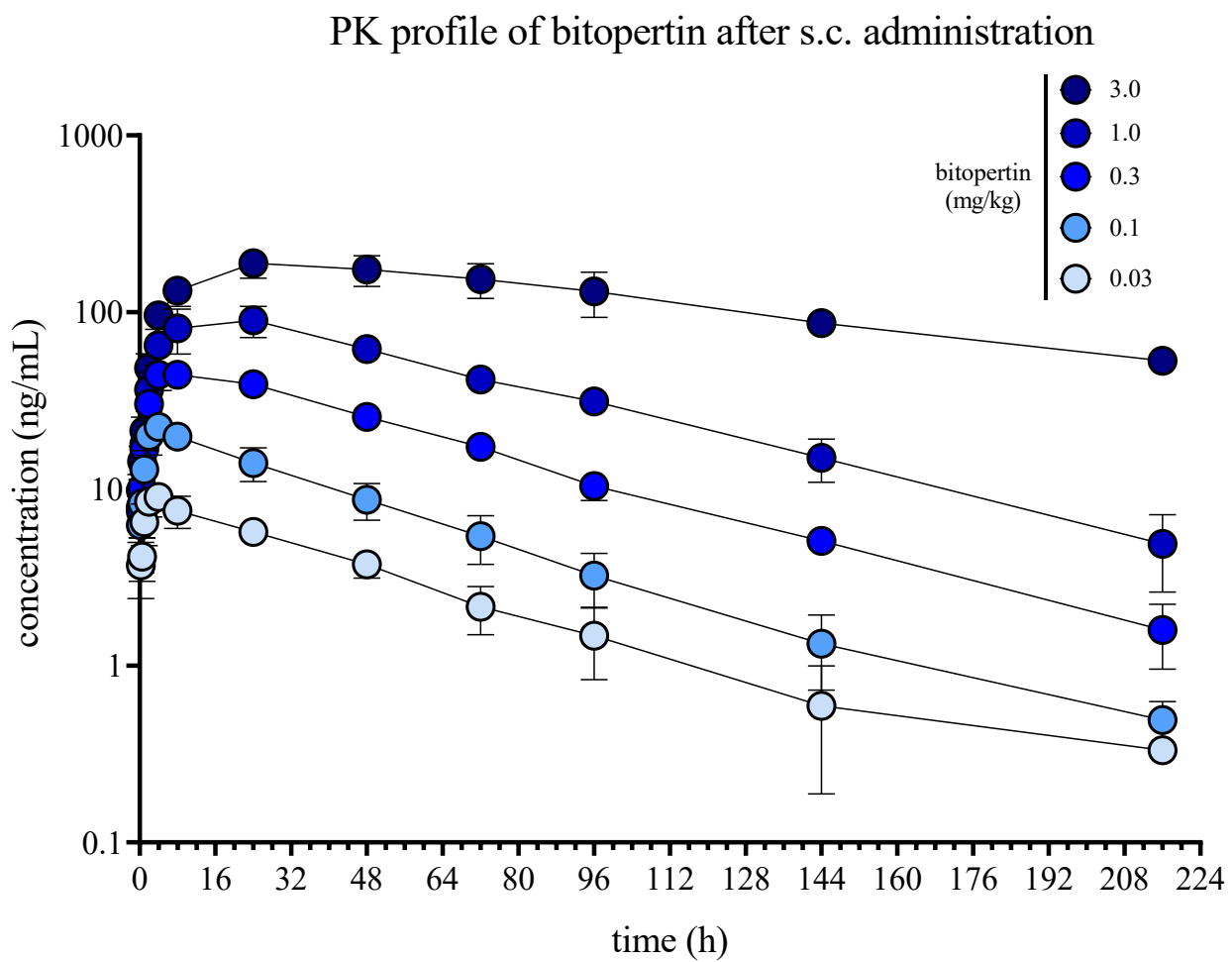


Figure 3

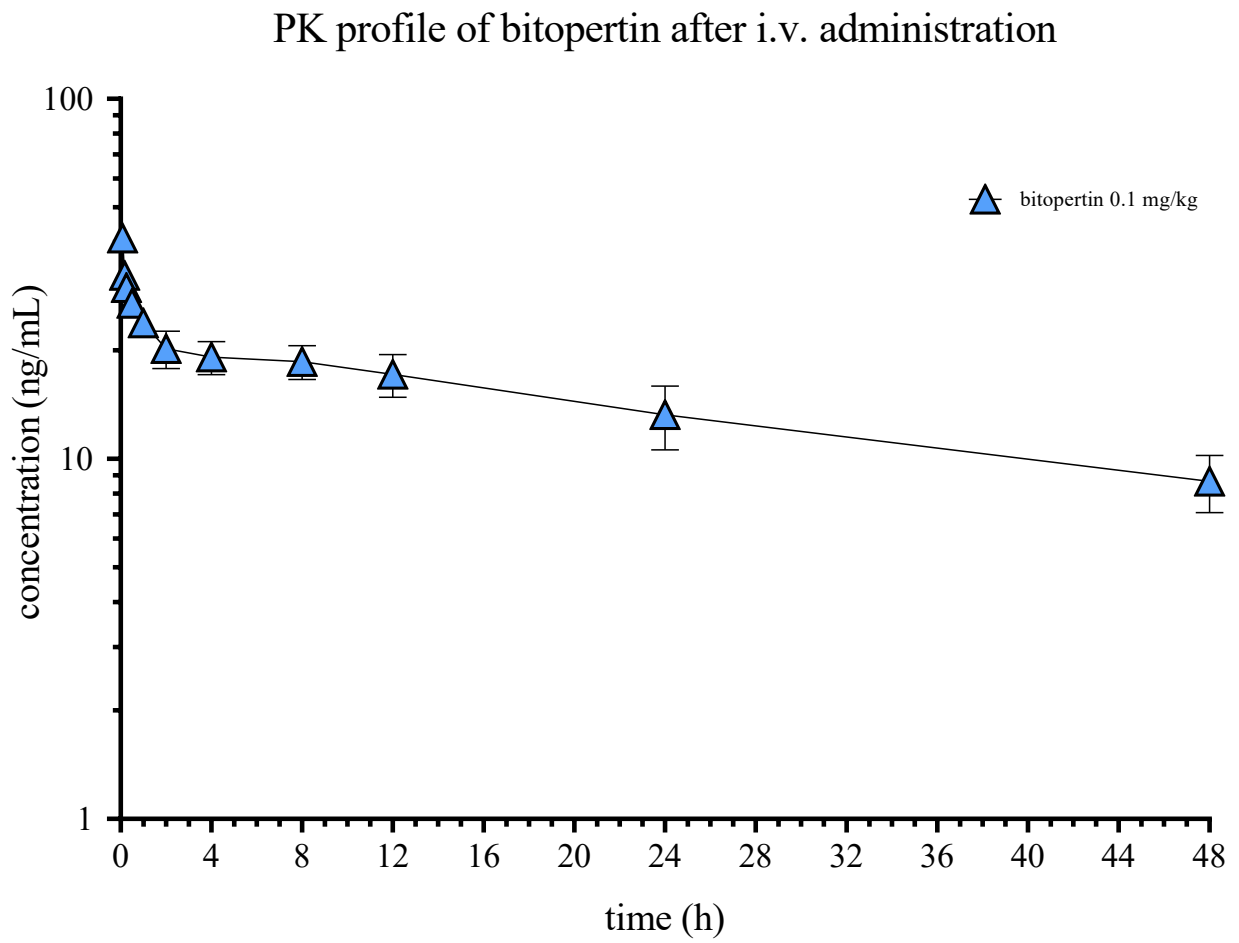


Table S1. Derived plasma PK parameters following s.c. administration of bitopertin 0.03 mg/kg in the rat

parameter	unit	rat-01	rat-02	rat-03	rat-04	rat-05	rat-06	mean	SD	%CV
AUC _{0-t}	ng/mL•h	590.862	396.830	442.076	358.376	538.945	401.071	454.693	90.884	20.0%
AUC _{0-∞}	ng/mL•h	610.198	415.694	450.180	364.363	583.525	453.542	479.584	96.710	20.2%
C _{max}	ng/ml	7.839	8.536	10.150	9.793	10.645	8.107	9.178	1.169	12.7%
T _{max}	h	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	2.000	3.667	0.816	22.3%
λ _z	1/h	0.017	0.021	0.028	0.030	0.017	0.014	0.021	0.007	30.5%
T _{1/2}	h	40.313	33.054	24.388	23.119	41.108	48.401	35.064	10.027	28.6%
Cl/F	L/h/kg	0.049	0.072	0.067	0.082	0.051	0.066	0.065	0.013	19.5%
V _z /F	L/kg	2.859	3.441	2.345	2.746	3.049	4.619	3.177	0.793	25.0%
MRT _{0-∞}	h	68.578	45.549	37.301	37.523	54.274	65.747	51.495	13.673	26.6%

AUC: area under the curve; CL: clearance; C_{max}: maximal plasma concentration; F: bioavailability; MRT: mean residence time; s.c.: subcutaneous; T_{1/2}: terminal half-life; T_{max}: time to maximal plasma concentration; V_z: volume of distribution.

Table S2. Derived plasma PK parameters following s.c. administration of bitopertin 0.10 mg/kg in the rat

parameter	unit	rat-01	rat-02	rat-03	rat-04	rat-05	rat-06	mean	SD	%CV
AUC _{0-t}	ng/mL•h	894.486	859.836	1538.681	1109.217	889.943	1411.701	1117.311	293.913	0.263
AUC _{0-∞}	ng/mL•h	945.202	896.009	1577.130	1131.281	920.035	1434.828	1150.747	290.947	0.253
C _{max}	ng/ml	19.296	19.324	27.332	22.211	21.327	25.778	22.545	3.343	0.148
T _{max}	h	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	2.000	3.667	0.816	0.223
λ _z	1/h	0.021	0.022	0.017	0.018	0.023	0.019	0.020	0.003	0.128
T _{1/2}	h	33.808	31.614	41.369	39.064	29.591	36.472	35.320	4.489	0.127
Cl/F	L/h/kg	0.106	0.112	0.063	0.088	0.109	0.070	0.091	0.021	0.229
V _z /F	L/kg	5.160	5.090	3.784	4.982	4.640	3.667	4.554	0.667	0.146
MRT _{0-∞}	h	48.545	44.022	56.576	52.554	41.217	52.473	49.231	5.785	0.118

AUC: area under the curve; CL: clearance; C_{max}: maximal plasma concentration; F: bioavailability; MRT: mean residence time; s.c.: subcutaneous; T_{1/2}: terminal half-life; T_{max}: time to maximal plasma concentration; V_z: volume of distribution.

Table S3. Derived plasma PK parameters following s.c. administration of bitopertin 0.30 mg/kg in the rat

parameter	unit	rat-01	rat-02	rat-03	rat-04	rat-05	rat-06	mean	SD	%CV
AUC _{0-t}	ng/mL•h	3410.847	3076.032	3674.190	2635.686	2992.049	3309.237	3183.007	362.374	11.4%
AUC _{0-∞}	ng/mL•h	3475.987	3284.340	3782.594	2672.485	3066.900	3464.377	3291.114	384.388	11.7%
C _{max}	ng/ml	41.289	46.632	60.256	39.407	44.958	48.021	46.761	7.362	15.7%
T _{max}	h	24.000	8.000	4.000	4.000	8.000	8.000	9.333	7.448	79.8%
λ _z	1/h	0.019	0.012	0.017	0.020	0.017	0.014	0.016	0.003	19.1%
T _{1/2}	h	37.090	59.040	41.995	34.514	41.702	50.905	44.208	9.172	20.7%
Cl/F	L/h/kg	0.086	0.091	0.079	0.112	0.098	0.087	0.092	0.012	12.5%
V _z /F	L/kg	4.618	7.780	4.805	5.590	5.885	6.360	5.840	1.154	19.8%
MRT _{0-∞}	h	59.156	72.816	61.797	55.810	56.992	66.003	62.096	6.395	10.3%

AUC: area under the curve; CL: clearance; C_{max}: maximal plasma concentration; F: bioavailability; MRT: mean residence time; s.c.: subcutaneous; T_{1/2}: terminal half-life; T_{max}: time to maximal plasma concentration; V_z: volume of distribution.

Table S4. Derived plasma PK parameters following s.c. administration of bitopertin 1.00 mg/kg in the rat

parameter	unit	rat-01	rat-02	rat-03	rat-04	rat-05	rat-06	mean	SD	%CV
AUC _{0-t}	ng/mL•h	8329.585	7525.795	6931.629	6693.488	8302.635	7522.739	7550.978	676.983	9.0%
AUC _{0-∞}	ng/mL•h	8466.186	7747.740	7348.351	7448.785	8692.200	7650.639	7892.317	555.170	7.0%
C _{max}	ng/ml	112.639	100.112	75.407	61.595	95.088	103.943	91.464	19.194	21.0%
T _{max}	h	8.000	24.000	24.000	24.000	24.000	8.000	18.667	8.262	44.3%
λ _z	1/h	0.020	0.017	0.014	0.011	0.015	0.020	0.016	0.003	21.5%
T _{1/2}	h	34.352	40.287	50.179	62.026	45.344	35.101	44.548	10.480	23.5%
Cl/F	L/h/kg	0.118	0.129	0.136	0.134	0.115	0.131	0.127	0.009	6.8%
V _z /F	L/kg	5.854	7.502	9.852	12.013	7.526	6.619	8.228	2.290	27.8%
MRT _{0-∞}	h	58.569	65.296	79.106	98.252	75.554	56.640	72.236	15.577	21.6%

AUC: area under the curve; CL: clearance; C_{max}: maximal plasma concentration; F: bioavailability; MRT: mean residence time; s.c.: subcutaneous; T_{1/2}: terminal half-life; T_{max}: time to maximal plasma concentration; V_z: volume of distribution.

Table S5. Derived plasma PK parameters following s.c. administration of bitopertin 3.00 mg/kg in the rat

parameter	unit	rat-01	rat-02	rat-03	rat-04	rat-05	rat-06	mean	SD	%CV
AUC _{0-t}	ng/mL•h	20582.361	21700.463	24422.238	30828.646	24645.172	28898.272	25179.525	3995.959	15.9%
AUC _{0-∞}	ng/mL•h	35895.516	27050.065	32364.259	36185.612	39636.957	32980.832	34018.873	4293.227	12.6%
C _{max}	ng/ml	139.515	167.975	179.270	230.360	198.221	220.137	189.246	33.912	17.9%
T _{max}	h	24.000	24.000	24.000	24.000	24.000	24.000	24.000	0.000	0.0%
λ _z	1/h	0.004	0.008	0.007	0.010	0.004	0.011	0.007	0.003	39.2%
T _{1/2}	h	173.761	87.247	99.714	67.231	168.036	65.923	110.319	48.638	44.1%
Cl/F	L/h/kg	0.084	0.111	0.093	0.083	0.076	0.091	0.089	0.012	13.6%
V _z /F	L/kg	20.951	13.960	13.335	8.041	18.348	8.651	13.881	5.132	37.0%
MRT _{0-∞}	h	253.923	133.687	154.911	118.788	228.334	110.814	166.743	60.090	36.0%

AUC: area under the curve; CL: clearance; C_{max}: maximal plasma concentration; F: bioavailability; MRT: mean residence time; s.c.: subcutaneous; T_{1/2}: terminal half-life; T_{max}: time to maximal plasma concentration; V_z: volume of distribution.

Table S6. Derived plasma PK parameters following i.v. administration of bitopertin 0.10 mg/kg in the rat

parameter	unit	rat-01	rat-02	rat-03	rat-04	rat-05	rat-06	mean	SD	%CV
AUC _{0-t}	ng/mL•h	612.671	727.692	829.682	604.490	720.920	612.671	684.688	90.543	13.2%
AUC _{0-∞}	ng/mL•h	1058.368	986.766	1507.462	1010.989	1262.621	1058.368	1147.429	201.586	17.6%
C ₀	ng/ml	65.319	44.558	57.432	46.916	52.175	65.319	55.287	8.953	16.2%
T _{max}	h	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.000	0.0%
λ _z	1/h	0.018	0.027	0.017	0.019	0.018	0.018	0.019	0.004	19.3%
T _{1/2}	h	37.599	25.696	41.304	37.344	39.572	37.599	36.519	5.520	15.1%
Cl	L/h/kg	0.094	0.101	0.066	0.099	0.079	0.094	0.089	0.014	15.2%
V _z	L/kg	5.125	3.757	3.953	5.329	4.522	5.125	4.635	0.665	14.3%
MRT _{0-∞}	h	54.117	36.287	59.389	52.281	56.346	54.117	52.090	8.116	15.6%
V _{ss}	L/kg	5.113	3.677	3.940	5.171	4.463	5.113	4.580	0.657	14.3%

AUC: area under the curve; C_{max}: maximal plasma concentration; C₀: extrapolated concentration at T = 0; CL: clearance; i.v.: intravenous; s.c.: subcutaneous; T_{max}: time to maximal plasma concentration; T_{1/2}: terminal half-life; V_z: volume of distribution; V_{ss}: volume of distribution at steady state; MRT: mean residence time.

Chapitre 3: Effet de l'inhibition de GlyT1 sur les dyskinésies induites par la L-DOPA chez le modèle de rat lésé à la 6-hydroxydopamine

Article publié dans **European Journal of Pharmacology** en 2022

Accès: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.175090>

Titre en français:

Effet de l'inhibition du transporteur de la glycine 1 avec bitopertin sur le parkinsonisme et la dyskinésie induite par la L-DOPA chez le rat lésé par la 6-OHDA.

Résumé en français:

À l'heure actuelle, aucun traitement n'est suffisamment efficace pour traiter la dyskinésie. Nous avons précédemment démontré que l'inhibition du transporteur de la glycine 1 (GlyT1) avec l'ALX-5407 réduit la dyskinésie et améliore légèrement le parkinsonisme dans le ouistiti lésé par le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP). Ici, nous avons cherché à déterminer l'effet du bitopertin un inhibiteur de GlyT1 testé cliniquement, sur le parkinsonisme et la dyskinésie chez le rat lésé par la 6-hydroxydopamine (6-OHDA). Pour ce faire, nous avons évalué l'effet du bitopertin en monothérapie sur le parkinsonisme et en concomitance avec une faible dose de L-3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA). Nous avons ensuite évalué l'efficacité anti-dyskinétique de bitopertin sur la dyskinésie à la suite d'administration aiguë et chronique. Enfin, nous avons évalué si un traitement *de novo* avec bitopertin, débutant en même temps que la L-DOPA, diminuerait le développement de la dyskinésie. Nous avons découvert que le bitopertin (0,3 mg/kg), administré seul, réduisait la sévérité du parkinsonisme de 35 % ($P < 0,01$). En combinaison d'une faible dose de L-DOPA, le bitopertin (3 mg/kg) a augmenté l'effet antiparkinsonien de la L-DOPA de 36 % ($P < 0,05$). De plus, l'administration aiguë de bitopertin (0,03 mg/kg) à la L-DOPA a réduit la sévérité

de la dyskinésie de 27 % ($P < 0,001$) et il n'y avait aucune tolérance au bénéfice anti-dyskinétique après 4 semaines d'administration quotidienne. Enfin, le bitopertin (0,03 mg/kg) administré en même temps que la L-DOPA, a atténué le développement de la dyskinésie de 33 % ($P < 0,01$) par rapport à la L-DOPA seule. Nos résultats suggèrent que l'inhibition de GlyT1 peut simultanément réduire la sévérité du parkinsonisme et de la dyskinésie induite par la L-DOPA, et représente une nouvelle approche possible pour traiter et éventuellement prévenir les complications motrices de la maladie de Parkinson.

Effect of glycine transporter 1 inhibition with bitopertin on parkinsonism and L-DOPA induced dyskinesia in the 6-OHDA-lesioned rat.

Authors: Imane Frouni ^{1,2}, Woojin Kang ², Dominique Bédard ², Sébastien Belliveau ², Cynthia Kwan ², Shadi Hadj-Youssef ², Élodie Bourgeois-Cayer ², Leanne Ohlund ⁴, Lekha Sleno ⁴, Adjia Hamadjida ², Philippe Huot ^{1,2,3,5}

¹ Département de Pharmacologie et Physiologie, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

² Neurodegenerative Disease Group, Montreal Neurological Institute-Hospital (The Neuro), Montreal, QC, Canada

³ Department of Neurology and Neurosurgery, McGill University, Montreal, QC, Canada

⁴ Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, Montreal, QC, Canada

⁵ Movement Disorder Clinic, Division of Neurology, Department of Neurosciences, McGill University Health Centre, Montreal, QC, Canada

Abstract

The treatment of dyskinesia remains an unmet need in Parkinson's disease (PD). We have previously demonstrated that glycine transporter 1 (GlyT1) inhibition with ALX-5407 reduces dyskinesia and slightly improves parkinsonism in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-lesioned marmoset. Here, we sought to determine the effect of bitopertin, a clinically-tested GlyT1 inhibitor, on parkinsonism and dyskinesia in the 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-lesioned rat. To do so, we assessed the effect of bitopertin on parkinsonism as monotherapy and as adjunct to a low dose of L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA). We then assessed the anti-dyskinetic efficacy of bitopertin on dyskinesia in the context of acute challenge and chronic administration studies. Lastly, we evaluated whether *de novo* treatment with bitopertin, started concurrently with L-DOPA, would diminish the development of dyskinesia. We discovered that bitopertin (0.3 mg/kg), when administered alone, reduced the severity of parkinsonism by 35% ($P < 0.01$). As adjunct to a low dose of L-DOPA, bitopertin (3 mg/kg) enhanced the anti-parkinsonian effect of L-DOPA by 36% ($P < 0.05$). Moreover, the acute addition of bitopertin (0.03 mg/kg) to L-DOPA reduced dyskinesia by 27% ($P < 0.001$), and there was no tolerance to the anti-dyskinetic benefit after 4 weeks of daily administration. Lastly, bitopertin (0.03 mg/kg) started concurrently with L-DOPA, also attenuated the development of dyskinesia, by 33% ($P < 0.01$), when compared to L-DOPA alone. Our results suggest that GlyT1 inhibition may simultaneously reduce parkinsonism and L-DOPA-induced dyskinesia and represents a possible novel approach to treat, possibly prevent, motor complications in PD.

Key words: Parkinson's disease, 6-OHDA-lesioned rat, L-DOPA, dyskinesia, parkinsonism, GlyT1, bitopertin

Introduction

The motor symptoms of Parkinson's disease (PD) are caused by a progressive degeneration of dopaminergic neurons of the substantia nigra compacta, thereby causing an imbalance within the cortico-basal ganglia circuit and the disruption of multiple neurotransmission systems (Migueluez et al., 2020; Werner et al., 2014). The standard treatment to reduce motor symptoms of PD is L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) (Fox et al., 2018). Following years of dopaminergic therapy with L-DOPA, disabling complications such as dyskinesia occur, contributing to the global burden of PD (Marras et al., 2004; Pechevis et al., 2005). Dyskinesia is a common complication of L-DOPA therapy, affecting up to 95% of PD patients after chronic administration (Ahlskog and Muentert, 2001; Hely, 2005), however few treatments are available clinically, with only amantadine being FDA-approved (Perez-Lloret and Rascol, 2018). Therefore, the discovery of novel, efficacious therapies for patients afflicted with PD is still a major unmet need.

Although the precise mechanisms underlying dyskinesia remain unknown, the glutamatergic system is widely regarded as a key target to alleviate dyskinesia (Perez-Lloret and Rascol, 2018). Accordingly, reduction of glutamatergic transmission is believed to be a mechanism whereby amantadine elicits its therapeutic effects (Rascol et al., 2021). However, induction of hallucinosis (Postma and Van Tilburg, 1975) and reports of tolerance suggest that amantadine may not be suitable for all patients (Thomas et al., 2004).

At odds with these beneficial effects of amantadine, there is evidence that an agonist effect at the glycine co-agonist binding site on *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors might also alleviate dyskinesia. Thus, a pilot clinical trial found that the co-agonist at the glycine-binding site

of NMDA receptors D-serine diminished the proportion of the day spent with dyskinesia (Gelfin et al., 2012). Recently, we have demonstrated that inhibition of glycine transporter 1 (GlyT1) with ALX-5407, a selective sarcosine-based GlyT1 inhibitor (Atkinson et al., 2001), decreased L-DOPA induced dyskinesia and improved parkinsonian disability in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-lesioned marmoset (Frouni et al., 2021). Unlike the NMDA receptor antagonists, inhibition of GlyT1 increases levels of extracellular glycine (Alexander et al., 2017), a required co-agonist of NMDA receptors, thereby enhancing glutamatergic transmission.

Here, we further investigated the effect of GlyT1 inhibition using bitopertin, a selective non-sarcosine-derived inhibitor (Alberati et al., 2012; Pinard et al., 2010), on the severity of parkinsonism as well as on the development and expression of dyskinesia in the 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-lesioned rat. Bitopertin was previously shown to increase glycine levels in the striatum and cerebral spinal fluid (CSF), whereby it could potentiate the activity of NMDA receptors (Alberati et al., 2012) and regulate dopaminergic and glutamatergic transmissions (Cepeda et al., 2009). Additionally, bitopertin has undergone several clinical trials for psychiatric indications (Bugarski-Kirola et al., 2017; Bugarski-Kirola et al., 2016; Umbricht et al., 2014) and may be fit for repurposing for PD-related endpoints, pending demonstration of efficacy in pre-clinical models.

Materials and Methods

Drugs and reagents

Bitopertin (also known as RG1678 and RO-4917838), was purchased from Cedarlane Laboratories (Burlington, ON, Canada). Bitopertin was dissolved in dimethyl sulfoxide at 100 mg/mL and then diluted to desired concentrations in 0.03% Tween 80. The doses of bitopertin,

ranging from 0.03 to 3 mg/kg, were selected based upon its pharmacokinetic (PK) profile in the rat (Pinard et al., 2010), to achieve plasma exposure that was shown to be well tolerated in human (Hofmann et al., 2012; Hofmann et al., 2016; Parrott et al., 2013).

Desipramine hydrochloride and pargyline hydrochloride were purchased from MilliporeSigma (Oakville, ON, Canada) and were dissolved in 0.9% NaCl. 6-OHDA hydrobromide was purchased from MilliporeSigma and was dissolved in 0.9% NaCl with 0.02% ascorbic acid. L-DOPA methyl ester hydrochloride and benserazide hydrochloride were both purchased from MilliporeSigma and dissolved in 0.9% NaCl with 0.1% ascorbic acid.

Dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), and homovanillic acid (HVA) standards were purchased from MilliporeSigma. Isotopically labelled (3,4-dihydroxyphenyl- d_3)acetic-2,2- d_2 acid (DOPAC- d_5) were purchased from CDN Isotopes (Pointe Claire, QC, Canada). Isotopically labelled homovanillic acid, 4-hydroxy-3-methoxyphenyl- d_3 -acetic- d_2 acid (HVA- d_5) were purchased from Cerilliant (subsidiary of MilliporeSigma). HPLC-grade acetonitrile, methanol, and acetic acid were also purchased from MilliporeSigma.

Animals

Ninety-seven female Sprague-Dawley rats (250-275 g, Charles River, Saint-Constant, QC, Canada) were housed in group of 3 under conditions of controlled temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), humidity (55%) and light (12-hour light/dark cycle, lights on at 07.00), with unrestricted access to food and water. Upon arrival, rats were left undisturbed for one week to acclimatise. All animal care and experimental procedures were carried in agreement with a protocol approved by McGill University and the Montreal Neurological Institute-Hospital (The Neuro) Animal Care

Committees (AUP 2017-7922), in accordance with the regulations defined by the Canadian Council on Animal Care.

Parkinsonism

Induction of parkinsonism

Rats were pre-treated with pargyline and desipramine (5 and 10 mg/kg sub-cutaneously (s.c.), respectively) to prevent noradrenergic neuron damage (Ungerstedt, 1968). After 30 minutes, rats were anaesthetised using isoflurane (2-4%) in 100% oxygen (1 L/min) and placed into a stereotaxic frame (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) with the incisor bar set 3.3 mm below ear bars (Huot et al., 2015). Then, rats were injected with 2.5 μ L of 6-OHDA hydrobromide at a rate of 0.5 μ L/min (7 μ g/ μ L) in the right medial forebrain bundle (Frouni et al., 2018; Huot et al., 2015) at the following co-ordinates: antero-posterior: -2.8 mm, medio-lateral: -2.0 mm, dorso-ventral: -9.0 mm relative to Bregma, according to the Paxinos and Watson's rat brain Atlas (Paxinos and Watson, 2017). At the end of the surgery, rats received s.c. injections of carprofen (10 mg/kg) and 0.9% NaCl (10 mL), to minimise post-surgical pain and avoid dehydration.

Assessment of parkinsonism

Three weeks post-surgery, the severity of parkinsonism was evaluated with the cylinder test, which quantifies rearing asymmetry by assessing the number of contacts each forepaw makes with the wall of a cylinder. The use of the forepaw ipsilateral to the lesion in $\geq 70\%$ of the rears corresponds to $\geq 88\%$ striatal dopamine depletion (Schallert et al., 2000) and this threshold was applied for animal selection. For the test, rats were placed in transparent cylinders (14 cm diameter

× 28 cm height) for 10 min, during which animals were recorded for *post hoc* behavioural analysis by a blinded rater (Frouni et al., 2018; Kwan et al., 2020).

Assessment of the effect of bitopertin on parkinsonian disability

To determine the anti-parkinsonian effect of bitopertin when administered as monotherapy, rats ($N = 12$) with a stable hemi-parkinsonian phenotype were administered bitopertin (0.03, 0.3 and 3 mg/kg s.c.) or vehicle, after which they entered the cylinder test, as described above. A minimum of one week separated each treatment. Behaviour was analysed by an observer blinded to the treatment.

To measure the effect of bitopertin on L-DOPA anti-parkinsonian action, rats were administered a low dose of L-DOPA/benserazide (3/15 mg/kg s.c.), which is sufficient to produce a mild reversal of parkinsonism, without eliciting dyskinesia (Frouni et al., 2018), in combination with vehicle or bitopertin (0.03, 0.3 and 3 mg/kg s.c.), after which they underwent the cylinder test. Treatments were randomised according to a within-subject design and behaviour was analysed by blinded rater. Here again, a minimum of one week separated each treatment.

Dyskinesia

Dyskinesia rating

Axial, limbs and oro-lingual (ALO) abnormal involuntary movements (AIMs), the rodent equivalent of dyskinesia, were rated by an experienced observer blinded to treatment, according to a protocol that evaluates time-based, *i.e.* “duration” and severity-based, *i.e.* “amplitude”, AIMs (Cenci and Lundblad, 2007). Both AIMs duration and amplitude were determined for each of the ALO body segments according to 0-4 scales, every 2 min, for 180 min (Cenci and Lundblad,

2007). On these scales, the lower the score, the lower the disability. ALO individual AIMs sub-scores were summed at any observation point to give the ALO AIMs score of this time point, for both duration and amplitude. The “cumulated” ALO AIMs score corresponds to the sum of ALO AIMs duration or ALO AIMs amplitude scores over the 180 min observation period. The “integrated” ALO AIMs score is defined as the product of ALO AIMs duration \times ALO AIMs amplitude, as previously described (Frouni et al., 2018; Ohlin et al., 2011).

Acute efficacy study

These studies sought to determine whether bitopertin would diminish ALO AIMs when administered as a single acute treatment. Parkinsonian rats were administered once daily injections of L-DOPA/benserazide (from now on referred to as L-DOPA, 10/15 mg/kg s.c.) for 15 days, to induce a stable and severe dyskinetic phenotype (Frouni et al., 2018; Huot et al., 2015).

On experimental days, 6-OHDA-lesioned rats with established ALO AIMs ($N = 23$) were administered an acute challenge of L-DOPA (6/15 mg/kg) in combination with bitopertin (0.03, 0.3 and 3 mg/kg s.c.) or vehicle. Treatments were randomised according to a within-subject design, in which all animals received all treatments. A 72-h interval was left between each treatment. The severity of AIMs was evaluated by a blinded rater, as described above.

Chronic study

These experiments aimed to assess whether the anti-dyskinetic effect of bitopertin would be maintained upon chronic administration or if tolerance would develop. Parkinsonian rats were administered once daily injections of L-DOPA 10/15 mg/kg s.c. for 15 days, to induce a stable and severe dyskinetic phenotype, as detailed above.

Twenty-seven 6-OHDA-lesioned rats with established ALO AIMs were randomised into 3 groups ($N = 9$ per group): L-DOPA (6/15 mg/kg) / vehicle, L-DOPA (6/15 mg/kg) / bitopertin

0.03 mg/kg and L-DOPA (6/15 mg/kg) / bitopertin 0.3 mg/kg. Animals were administered their respective treatment once daily, for 29 days. ALO AIMs were evaluated, as described above, on days 1, 15 and 29.

De novo study

In order to determine whether commencing bitopertin treatment concurrently with L-DOPA would attenuate the development of ALO AIMs, we conducted a *de novo* study. Thirty-five 6-OHDA-lesioned rats were randomised into 3 groups: L-DOPA (6/15 mg/kg) /vehicle ($N = 15$), L-DOPA (6/15 mg/kg) / bitopertin 0.03 mg/kg ($N = 11$) and L-DOPA (6/15 mg/kg) /bitopertin 0.3 mg/kg ($N = 9$). These treatments were begun concurrently and were administered once daily, for 29 days. ALO AIMs were evaluated on days 1, 8, 15, 22 and 29. Animals then entered a 3-day washout period during which no treatment was administered, after which they were all injected an acute challenge of L-DOPA (6/15 mg/kg) and ALO AIMs were assessed. The purpose of this acute L-DOPA challenge was to determine if a reduction of ALO AIMs observed during the induction phase was related to a symptomatic effect of bitopertin during the induction phase or a real interference with dyskinesia development.

Assessment of striatal dopamine metabolites levels

At the end of each of the behavioural experiments described above, rats were euthanised by isoflurane overdose (2-4%) and perfused trans-cardially with 0.9% NaCl. Brains were removed, and the left and right striata were dissected on ice before being flash-frozen in isopentane and kept at -80°C until further processing. Samples were extracted with 500 µL methanol:acetonitrile (2:1) per 100 mg tissue and bead beating for 2 min on medium setting using an Omni Bead Ruptor (Kennesaw, GA, USA). Internal standards were added before centrifugation at 14,000 revolutions

per min at 4°C. The supernatant was dried and then reconstituted in 150 µL of 2% acetic acid. Striatal levels of dopamine metabolites 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) were determined by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) with a positive-negative switching multiple reaction monitoring (MRM) method on a Shimadzu Nexera HPLC coupled to a Sciex QTRAP 5500 quadrupole-linear ion trap system (Concord, ON, Canada). Chromatographic separation was achieved on a Gemini-NX C18 column (2 × 150 mm, 3 µm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) with gradient elution using mobile phases of 2% acetic acid in water (A) and 100% methanol (B), at a flow rate of 0.2 mL/min. MRM transitions were monitored (with a total cycle time of 1.1 s) as detailed in Table S1. The TurboIonspray source was operated under the following conditions: ionisation voltages at 5,000 V (positive mode) and -4,500V (negative mode), curtain gas at 30 psi, GS1 and GS2 gases at 40 psi and temperature of 450°C. Raw data were processed with MultiQuant 1.3 (Sciex) for peak integration and quantitation of concentrations were calculated using peak area ratios with isotopically labelled internal standards for each analyte.

Statistical analysis

Cylinder test data are presented as the mean ± standard error of the mean (SEM) and were analysed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's *post hoc* tests when analysing the extent of the lesion data and analysed by one-way repeated measure (RM) ANOVA followed by Tukey's *post hoc* tests when analysing the monotherapy and the adjunct to L-DOPA data. Peak dose ALO AIMs scores in the acute and chronic efficacy studies are presented as the median with the semi-interquartile range and were analysed using Friedman followed by Dunn's *post hoc* tests. Global scores were analysed by computing the area under the curve (AUC) of the

ALO AIMs at each individual time point and are presented as the mean \pm SEM and was analysed by one way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* tests. ALO AIMs time course scores over the weeks in the chronic and *de novo* study are presented as the median and were analysed, following ranking of data in ascending order (Howell, 2006), by two-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* tests. Levels of dopamine metabolites are presented as mean \pm SEM and were analysed by unpaired Welch's unequal variances *t*-test. For all experiments reported here, statistical significance was set to $P < 0.05$. Statistical analyses were computed using GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA).

Results

Severity of parkinsonism and extent of striatal denervation

In the monotherapy study, 6-OHDA-lesioned rats exhibited marked rearing asymmetry [$F_{(2, 33)} = 285.1, P < 0.0001$, one-way ANOVA; Figure S1A], with preferential use of the right (un-lesioned) forepaw in $85.07 \pm 3.36\%$ of wall contacts, compared to $1.03 \pm 0.56\%$ ($P < 0.0001$, Tukey's *post hoc* test) with the left (lesioned) forepaw and $13.93 \pm 3.15\%$ ($P < 0.0001$, Tukey's *post hoc* test) with both forepaws, respectively, assessed by the cylinder test. Accordingly, as shown in Table 1, HPLC-MS/MS analysis revealed a significant reduction of dopamine metabolites DOPAC and HVA in the lesioned striata, when compared to the un-lesioned striata, by 96.02% [$t_{(11.10)} = 9.280, P < 0.0001$], and 88.39% [$t_{(14.89)} = 14.00, P < 0.0001$], respectively.

In the acute challenge study, 6-OHDA-lesioned rats exhibited marked rearing asymmetry [$F_{(2, 63)} = 383.6, P < 0.0001$, one-way ANOVA; Figure S1B], with preferential use of the right (un-lesioned) forepaw in $80.45 \pm 2.61\%$ of wall contacts, compared to $0.61 \pm 0.33\%$ ($P < 0.0001$,

Tukey's *post hoc* test) with the left (lesioned) forepaw and $18.95 \pm 2.60\%$ ($P < 0.0001$, Tukey's *post hoc* test) with both forepaws, respectively. Accordingly, as displayed in Table 1, HPLC-MS/MS analysis revealed a significant decrease of DOPAC and HVA levels in the lesioned striata, when compared to the un-lesioned striata, by 92.53% [$t_{(21.60)} = 12.33$, $P < 0.0001$] and 88.66% [$t_{(23.79)} = 12.76$, $P < 0.0001$], respectively.

In the chronic administration study, 6-OHDA-lesioned rats exhibited marked rearing asymmetry [$F_{(2, 78)} = 939.4$, $P < 0.0001$, one-way ANOVA; Figure S1C], with preferential use of the right (un-lesioned) forepaw in $87.89 \pm 1.93\%$ of wall contacts, compared to $0.24 \pm 0.14\%$ ($P < 0.0001$, Tukey's *post hoc* test) with the left (lesioned) forepaw and $11.87 \pm 1.87\%$ ($P < 0.0001$, Tukey's *post hoc* test) with both forepaws, respectively. In agreement with this rearing behaviour, as presented in Table 1, HPLC-MS/MS analysis revealed a significant loss of DOPAC and HVA in the lesioned striata, when compared to the un-lesioned striata, by 93.11 % [$t_{(24.30)} = 13.67$, $P < 0.0001$] and 83.88 % [$t_{(29.95)} = 24.38$, $P < 0.0001$], respectively.

Lastly, 6-OHDA-lesioned rats used in the *de novo* study also displayed marked rearing asymmetry [$F_{(2, 102)} = 1072$, $P < 0.0001$, one-way ANOVA; Figure S1D], with a preferential use of the right forepaw in $80.87 \pm 1.59\%$ of wall contacts, compared to $0.72 \pm 0.28\%$ ($P < 0.0001$, Tukey's *post hoc* test) with the left and $18.41 \pm 1.53\%$ ($P < 0.0001$, Tukey's *post hoc* test) with both forepaws. Correspondingly, in Table 1, HPLC-MS/MS analysis revealed a significant reduction of DOPAC and HVA in the lesioned striata, when compared to the un-lesioned striata, by 92.75% [$t_{(37.26)} = 11.49$, $P < 0.0001$] and 86.24% [$t_{(50.53)} = 16.39$, $P < 0.0001$], respectively.

Effect of bitopertin on parkinsonism

Bitopertin as monotherapy reduces the severity of parkinsonism

As shown in Figure 1, bitopertin reduced the preferential use of right (un-lesioned) forepaw ($F_{(2.654, 18.58)} = 5.19, P < 0.05$, one-way RM ANOVA). Thus, administering bitopertin 0.3 mg/kg reduced the right forepaw use by 35% ($P < 0.05$, Tukey's *post hoc* test) when compared to the lesioned state. No anti-parkinsonian effect was observed with the doses of 0.03 or 3 mg/kg.

Bitopertin enhances the anti-parkinsonian action of L-DOPA

As illustrated in Figure 2A, L-DOPA significantly reduced the preferential use of the right (un-lesioned) forepaw, whether it was administered alone or in combination with bitopertin ($F_{(2.379, 38.07)} = 13.93, P < 0.0001$, one-way RM ANOVA). Thus, adding bitopertin 3 mg/kg significantly enhanced the therapeutic action of L-DOPA, decreasing the right forepaw use by 36% ($P < 0.05$, Tukey's *post hoc* test) when compared to L-DOPA alone. The addition of bitopertin to L-DOPA also increased the use of the left (lesioned) forepaw ($F_{(2.761, 44.18)} = 5.330, P < 0.01$, one-way RM ANOVA; Figure 2B). Thus, bitopertin 0.3 and 3 mg/kg combined to L-DOPA significantly increased the left forepaw use by 21 and 23 folds (both $P < 0.05$, Tukey's *post hoc* test), respectively, when compared to the lesioned state, but did not reach significance when compared to L-DOPA/vehicle.

Effect of bitopertin on ALO AIMs

Acute administration of bitopertin attenuates the expression of established L-DOPA-induced ALO AIMs

Bitopertin significantly decreased the global severity of ALO AIMs duration ($F_{\text{treatment} (3, 52)} = 8.35, P < 0.0001$, one-way ANOVA; Figure 3A) and amplitude ($F_{\text{treatment} (3, 52)} = 8.34, P < 0.0001$, one-way ANOVA; Figure 3B). Accordingly, bitopertin 0.03 mg/kg and 3 mg/kg combined with L-DOPA reduced ALO AIMs duration by 18% when compared to L-DOPA/vehicle (both P

< 0.001, Tukey's *post hoc* test), while bitopertin 0.03 mg/kg and 3 mg/kg combined with L-DOPA reduced ALO AIMs amplitude by 16% when compared to L-DOPA/vehicle (both $P < 0.001$, Tukey's *post hoc* test). In addition, adding bitopertin to L-DOPA significantly reduced global integrated ALO AIMs ($F_{\text{treatment (3, 52)}} = 10.45$, $P < 0.0001$, one-way ANOVA; Figure 3C). Thus, bitopertin 0.03 mg/kg and 3 mg/kg combined with L-DOPA reduced global ALO AIMs by 27% and 24% ($P < 0.0001$ and $P < 0.001$, Tukey's *post hoc* test), respectively.

Furthermore, the addition of bitopertin to L-DOPA significantly reduced global integrated axial AIMs ($F_{\text{treatment (3, 52)}} = 8.00$, $P < 0.001$, one-way ANOVA; Figure 4A), providing reductions of 26% and 30% at the doses of 0.03 and 3 mg/kg ($P < 0.01$ and $P < 0.001$, Tukey's *post hoc* test), respectively. Additionally, bitopertin significantly decreased global integrated limbs AIMs ($F_{\text{treatment (3, 52)}} = 5.46$, $P < 0.01$, one-way ANOVA; Figure 4B), resulting in a reduction of 20% and 25% at the doses of 0.03 and 3 mg/kg, respectively, when compared to L-DOPA/vehicle ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, Tukey's *post hoc* test). Moreover, bitopertin significantly reduced global integrated oro-lingual AIMs ($F_{\text{treatment (3, 52)}} = 5.54$, $P < 0.01$, one-way ANOVA; Figure 4C), providing a reduction of 19% at the dose of 0.03 mg/kg when compared to L-DOPA/vehicle ($P < 0.01$, Tukey's *post hoc* test).

The anti-dyskinetic effect of bitopertin is maintained upon chronic administration

After demonstrating the anti-dyskinetic effect of bitopertin in the acute study, we wanted to verify if tolerance would occur to the effects of bitopertin after chronic administration.

Chronic administration of bitopertin significantly reduced ALO AIMs duration ($F_{\text{treatment (2, 24)}} = 6.05$, $P < 0.01$; $F_{\text{time (2, 48)}} = 13.29$, $P < 0.001$, $F_{\text{interaction (4, 48)}} = 3.51$, $P < 0.05$; two-way RM ANOVA; Figure 5A), ALO AIMs amplitude ($F_{\text{treatment (2, 24)}} = 9.60$, $P < 0.001$; $F_{\text{time (2, 48)}} = 10.06$,

$P < 0.001$, $F_{\text{interaction (4, 48)}} = 7.43$, $P < 0.0001$; two-way RM ANOVA; Figure 5B) and integrated ALO AIMS ($F_{\text{treatment (2, 24)}} = 6.96$, $P < 0.01$; $F_{\text{time (2, 48)}} = 18.58$, $P < 0.0001$, $F_{\text{interaction (4, 48)}} = 6.17$, $P < 0.001$ two-way RM ANOVA; Figure 5C) over the 4-week period. On day 29, ALO AIMS duration was 29% lower in the group treated with L-DOPA/bitopertin 0.03 mg/kg, compared to the group treated with L-DOPA alone ($P < 0.001$; Tukey's *post hoc* test). Similarly, ALO AIMS amplitude was 21% and 10% lower in the groups treated with L-DOPA and bitopertin 0.03 mg/kg and 0.3 mg/kg, when compared to the group treated with L-DOPA/vehicle ($P < 0.0001$ and $P < 0.01$, Tukey's *post hoc* test). In addition, chronic administration of bitopertin 0.3 mg/kg significantly reduced the severity of integrated ALO AIMS by 62% ($P < 0.01$, Tukey's *post hoc* test; Figure 5C), whereas the 0.03 mg/kg dose decreased the severity by 43%, but without reaching significance, when assessed on day 29 and when compared to vehicle. However, when compared to day 1, integrated ALO AIMS severity was also reduced when bitopertin 0.03 and 0.3 mg/kg were combined with L-DOPA, by 52% ($P < 0.0001$, Tukey's *post hoc* test) and 26% ($P < 0.05$, Tukey's *post hoc* test).

De novo administration of bitopertin attenuates the development of L-DOPA-induced ALO AIMS

Over a 4-week period, bitopertin significantly attenuated the development of ALO AIMS duration ($F_{\text{treatment (2, 32)}} = 2.05$, $P > 0.05$; $F_{\text{time (4, 128)}} = 18.12$, $P < 0.001$, $F_{\text{interaction (8, 128)}} = 3.55$, $P < 0.001$; two-way ANOVA; Figure 6A), ALO AIMS amplitude ($F_{\text{treatment (2, 32)}} = 0.54$, $P > 0.05$; $F_{\text{time (4, 128)}} = 20.73$, $P < 0.0001$, $F_{\text{interaction (8, 128)}} = 2.10$, $P < 0.05$; two-way ANOVA; Figure 6B) and integrated ALO AIMS ($F_{\text{treatment (2, 32)}} = 1.39$, $P > 0.05$; $F_{\text{time (4, 128)}} = 22.27$, $P < 0.0001$, $F_{\text{interaction (8, 128)}} = 2.97$, $P < 0.01$; two-way ANOVA; Figure 6C). Specifically, rats treated with L-DOPA/vehicle exhibited an increase in the severity of ALO AIMS duration of 222%, an increase in the severity of ALO AIMS amplitude of 132%, and a surge of the severity of integrated ALO

AIMs by up to 706 % (all, $P < 0.0001$; Tukey's *post hoc* test) when day 29 was compared to day 1. On the other hand, rats that were concurrently begun on L-DOPA/bitopertin 0.03 mg/kg showed no increase in ALO AIMs duration severity ($P > 0.05$; Tukey's *post hoc* test), a 50% ($P > 0.05$; Tukey's *post hoc* test) increase in ALO AIMs amplitude and a 72% ($P > 0.05$; Tukey's *post hoc* test) increase in integrated ALO AIMs when comparing day 29 to day 1. While rats treated with L-DOPA/bitopertin 0.3 mg/kg presented a 100% increase in ALO AIMs duration severity ($P < 0.001$; Tukey's *post hoc* test), a 52% ($P < 0.001$; Tukey's *post hoc* test) increase in ALO AIMs amplitude and a 242 % increase ($P < 0.0001$; Tukey's *post hoc* test) when comparing day 29 to day 1.

When comparing the different treatment groups between them, on day 29, L-DOPA/bitopertin 0.03 mg/kg significantly reduced the severity of ALO AIMs duration by 68% ($P < 0.05$, Tukey's *post hoc* test), attenuated ALO AIMs amplitude by 31% ($P > 0.05$, Tukey's *post hoc* test) and significantly decreased integrated ALO AIMs by 79% ($P < 0.05$, Tukey's *post hoc* test) when compared to L-DOPA/vehicle. L-DOPA/bitopertin 0.3 mg/kg also decreased different AIMs parameters, but without reaching statistical significance, *i.e.* the severity of duration ALO AIMs was decreased by 38% ($P > 0.05$, Tukey's *post hoc* test), amplitude was reduced by 31% ($P > 0.05$, Tukey's *post hoc* test) and integrated ALO AIMs was diminished by 57% ($P > 0.05$, Tukey's *post hoc* test), when compared to vehicle.

After a 3-day washout from the *de novo* experiment, we administered an acute challenge of L-DOPA to all animals. As illustrated in Figure 6, animals that were administered bitopertin in the induction phase showed milder global ALO AIMs duration ($F_{(2, 32)} = 9.32$, $P < 0.001$, one-way ANOVA; Figure 6D), global ALO AIMs amplitude ($F_{(2, 32)} = 4.62$, $P < 0.05$, one-way ANOVA; Figure 6E) and global integrated ALO AIMs ($F_{(2, 32)} = 6.43$, $P < 0.01$, one-way ANOVA; Figure

6F). Thus, animals primed with L-DOPA/bitopertin 0.03 mg/kg showed a 27% lower global ALO AIMs duration ($P < 0.001$; Tukey's *post hoc* test), a 16% lower ALO AIMs amplitude ($P < 0.05$; Tukey's *post hoc* test) and a 33% lower global integrated ALO AIMs ($P < 0.01$; Tukey's *post hoc* test), compared to rats treated with L-DOPA alone. No differences were observed in the animals primed with L-DOPA/bitopertin 0.3 mg/kg when compared to rats treated with L-DOPA alone.

Discussion

In this study, we evaluated the effects of the GlyT1 inhibitor bitopertin on parkinsonian symptoms and L-DOPA-induced dyskinesia in the 6-OHDA-lesioned rat. We have shown that bitopertin as monotherapy elicits a reversal of parkinsonian disability and enhances the anti-parkinsonian action of L-DOPA. Furthermore, bitopertin acutely and chronically reduces the severity of L-DOPA-induced dyskinesia, without development of tolerance. Lastly, *de novo* administration of bitopertin appears to interfere with the development of dyskinesia.

With the caveat that no head-to-head comparisons were conducted, the anti-parkinsonian action of bitopertin appears to compare to that obtained in rats with drugs with established anti-parkinsonian action in the clinic. Here, when administered as monotherapy, bitopertin decreased un-lesioned forepaw use by up to 35% in the cylinder test, indicating an improvement in parkinsonism. For instance, in experiments previously conducted by our group, a low dose of L-DOPA reduced by $\approx 35\%$ the use of the un-lesioned forepaw (Frouni et al., 2018; Kwan et al., 2020) and a 9% reduction with oral L-DOPA 50 mg/kg was obtained by another group (de Araújo et al., 2013).

Additionally, our results suggest that combining bitopertin with a low dose of L-DOPA confers up to 36% of additional anti-parkinsonian benefit. Although the experimental design was different, in a study performed in the 6-OHDA-lesioned rat, the monoamine oxidase B inhibitor selegiline, which is used in the clinic as adjunct to L-DOPA, increased the lesioned forepaw use by 33% (Malmlöf et al., 2015). Whereas the doses of L-DOPA administered differed, the percentages of improvement are relatively similar. Importantly, selegiline may trigger dyskinesia (Shoulson et al., 2002), while our data indicate that bitopertin alleviates it, which represents a potentially important advantage over a standard-of-care therapy. Whereas we did not examine this paradigm here, previous studies conducted in our group suggest that GlyT1 inhibition may also enhance the anti-parkinsonian action of an optimal dose of L-DOPA. Thus, in a recent study, we showed that the sarcosine-derived GlyT1 inhibitor ALX-5407 enhanced the anti-parkinsonian action of L-DOPA in the MPTP-lesioned marmoset (Frouni et al., 2021). Collectively, these studies indicate that GlyT1 inhibition may potentiate the anti-parkinsonian effect of sub-optimal and optimal doses of L-DOPA.

For dyskinesia however, the anti-dyskinetic effect of bitopertin is more difficult to compare to these of amantadine and clozapine, the only 2 drugs effective for the treatment of dyskinesia according to the International Parkinson and Movement Disorder Society (Fox et al., 2018). Indeed, we selected the doses of bitopertin so that we would achieve plasma levels known to be well tolerated in clinical settings. In contrast, the 6-OHDA-lesioned rat, doses of amantadine greater than 40 mg/kg have consistently reduced dyskinesia, but the same cannot be said of lower doses; doses of amantadine greater than 40 mg/kg lead to plasma levels greater than those achieved in the clinic (Brigham et al., 2018). It is possible that we would have obtained a greater effect on

dyskinesia if we had assessed the effects of higher doses of bitopertin, but the translational validity of our findings in such a case would have been questionable.

Similarly, clozapine 8 mg/kg alleviated dyskinesia in the 6-OHDA-lesioned rat (Lundblad et al., 2002), but plasma levels associated with this dose (Baldessarini et al., 1993) may be much higher than those used in the clinic with PD patients (Meltzer et al., 1995), making comparisons with the doses that we selected difficult.

Additionally, our findings suggest that GlyT1 inhibition may attenuate the development of dyskinesia when begun simultaneously with L-DOPA therapy. In the clinic, it is possible that amantadine, begun before L-DOPA introduction, might also reduce the incidence of dyskinesia (Kim et al., 2018), although further studies are needed to provide a definite answer. Collectively, these data suggest that glutamatergic modulation, through interaction with NMDA receptors, might alter the development of dyskinesia, although it is striking that both enhancing and dampening NMDA-mediated transmission would ultimately lead to the same outcome.

Paradoxically, antagonising the glycine-binding site on NMDA receptors with the noble gas xenon reduced dyskinesia in the MPTP-lesioned non-human primate (Baufreton et al., 2018), which is difficult to reconcile with the results that we have obtained here with bitopertin and previously with ALX-5407, but fits well overall with the effect of amantadine on NMDA receptors.

Although the specific mechanism underlying the effects of bitopertin and ALX-5407 on parkinsonism and dyskinesia remain unknown, they likely involve an interaction with NMDA receptors. Indeed, inhibiting GlyT1 with bitopertin increases the levels of glycine in the synaptic cleft, which in turn will increase its availability to interact with the glycine-binding site on NMDA receptors (Betz et al., 2006; Johnson and Ascher, 1987). According to the classic model of the

organisation of the basal ganglia, the thalamo-cortical synapse is hypo-active in PD (DeLong and Wichmann, 2007). It is possible that GlyT1 inhibition may counter-balance this state, resulting in an improvement of parkinsonism.

However, this mechanism would hardly explain the reduction of dyskinesia that we obtained. While it remains theoretical, an activating action along the hyperdirect pathway of the basal ganglia would ultimately result in less cortical activation and less dyskinesia (Nambu et al., 2002). It is therefore possible that GlyT1 inhibition normalises glutamatergic transmission within the cortex – basal ganglia -thalamus – cortex loop so that parkinsonian disability is improved and dyskinesias are diminished.

In summary, we have demonstrated that inhibition of GlyT1 with bitopertin in the 6-OHDA-lesioned rat significantly 1) improves parkinsonism when administered as monotherapy, 2) enhances the anti-parkinsonian action of a low dose of L-DOPA, 3) reduces the expression of dyskinesia after acute administration, 4) without evidence of tolerance after chronic treatment, and 5) attenuates the development of dyskinesia. Our results suggest GlyT₁ inhibition may be an efficacious strategy for the treatment of parkinsonism and motor complications. In the specific context of bitopertin, the drug has undergone extensive clinical testing, and a wealth of data regarding its safety and tolerability in human is available in the peer-reviewed literature, making it an attractive candidate for repurposing for the treatment of PD.

ACKNOWLEDGEMENT

We acknowledge support of the mass spectrometry platform at UQAM from the Centre d'Excellence de Recherche sur les Maladies Orphelines – Fondation Courtois (CERMO-FC) and the Canadian Foundation for Innovation.

FUNDING

PH has research support from Parkinson Canada, Parkinson Québec, Fonds de Recherche Québec – Santé, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, the Weston Brain Institute, the Michael J Fox Foundation for Parkinson's Research and Healthy Brains for Healthy Lives. This work was funded by the Michael J Fox Foundation for Parkinson's Research.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

1) Research project: A. Conception, B. Organisation, C. Execution;

2) Manuscript: A. Writing of the first draft, B. Review and Critique.

IF: 1B, 1C, 2A, 2B; WK: 1C, 2B; DB: 1C, 2B; SB: 1C, 2A, 2B; CK: 1C, 2B; SHY: 1C; EBC: 1C;

LQ:1C, 2A; LS: 1A, 1B, 1C, 2B; AH: 1B; 2B; PH: 1A, 1B, 2B.

COMPETING INTERESTS

None.

DATA AND MATERIALS AVAILABILITY

Available upon written request to the corresponding author.

References

- Ahlskog, J. E., & Muentner, M. D. (2001). Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Movement disorders, 16*(3), 448-458.
- Alberati, D., Moreau, J.-L., Lengyel, J., Hauser, N., Mory, R., Borroni, E., . . . Hainzl, D. (2012). Glycine reuptake inhibitor RG1678: a pharmacologic characterization of an investigational agent for the treatment of schizophrenia. *Neuropharmacology, 62*(2), 1152-1161.
- Alexander, S. P., Kelly, E., Marrion, N. V., Peters, J. A., Faccenda, E., Harding, S. D., . . . Davies, J. A. (2017). The concise guide to pharmacology 2017/18: Transporters. *British Journal of Pharmacology, 174*, S360-S446.
- Atkinson, B., Bell, S., De Vivo, M., Kowalski, L., Lechner, S., Ognyanov, V., . . . Ashton, D. (2001). ALX 5407: a potent, selective inhibitor of the hGlyT1 glycine transporter. *Molecular pharmacology, 60*(6), 1414-1420.
- Baldessarini, R. J., Centorrino, F., Flood, J. G., Volpicelli, S. A., Huston-Lyons, D., & Cohen, B. M. (1993). Tissue concentrations of clozapine and its metabolites in the rat. *Neuropsychopharmacology, 9*(2), 117-124.
- Baufreton, J., Milekovic, T., Li, Q., McGuire, S., Moraud, E. M., Porras, G., . . . Morin, S. (2018). Inhaling xenon ameliorates l-dopa-induced dyskinesia in experimental parkinsonism. *Movement Disorders, 33*(10), 1632-1642.
- Betz, H., Gomez, J., Arnsen, W., Scholze, P., & Eulenburg, V. J. B. S. T. (2006). Glycine transporters: essential regulators of synaptic transmission. *34*(1), 55-58.
- Brigham, E. F., Johnston, T. H., Brown, C., Holt, J. D., Fox, S. H., Hill, M. P., . . . Nguyen, J. T. (2018). Pharmacokinetic/pharmacodynamic correlation analysis of amantadine for

- levodopa-induced dyskinesia. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics*, 367(2), 373-381.
- Bugarski-Kirola, D., Blaettler, T., Arango, C., Fleischhacker, W. W., Garibaldi, G., Wang, A., . . . Lawrie, S. (2017). Bitopertin in negative symptoms of schizophrenia—results from the phase III FlashLyte and DayLyte studies. *Biological psychiatry*, 82(1), 8-16.
- Bugarski-Kirola, D., Iwata, N., Sameljak, S., Reid, C., Blaettler, T., Millar, L., . . . Kapur, S. (2016). Efficacy and safety of adjunctive bitopertin versus placebo in patients with suboptimally controlled symptoms of schizophrenia treated with antipsychotics: results from three phase 3, randomised, double-blind, parallel-group, placebo-controlled, multicentre studies in the SearchLyte clinical trial programme. *The Lancet Psychiatry*, 3(12), 1115-1128.
- Cenci, M. A., & Lundblad, M. (2007). Ratings of L-DOPA-induced dyskinesia in the unilateral 6-OHDA lesion model of Parkinson's disease in rats and mice. *Curr Protoc Neurosci*, Chapter 9, Unit 9 25. doi:10.1002/0471142301.ns0925s41
- de Araújo, D. P., De Sousa, C. N. S., Araújo, P. V. P., Menezes, C. E. d. S., Sousa Rodrigues, F. T., Escudeiro, S. S., . . . Viana, G. S. d. B. (2013). Behavioral and neurochemical effects of alpha-lipoic Acid in the model of Parkinson's disease induced by unilateral stereotaxic injection of 6-ohda in rat. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- DeLong, M. R., & Wichmann, T. (2007). Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Archives of neurology*, 64(1), 20-24.
- Fox, S. H., Katzenschlager, R., Lim, S. Y., Barton, B., De Bie, R. M., Seppi, K., . . . Committee, M. D. S. E. B. M. (2018). International Parkinson and movement disorder society evidence-

- based medicine review: update on treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 33(8), 1248-1266.
- Frouni, I., Belliveau, S., Maddaford, S., Nuara, S. G., Gourdon, J. C., & Huot, P. (2021). Effect of the glycine transporter 1 inhibitor ALX-5407 on dyskinesia, psychosis-like behaviours and parkinsonism in the MPTP-lesioned marmoset. *European journal of pharmacology*, 910, 174452.
- Frouni, I., Kwan, C., Bedard, D., Belliveau, S., Bourgeois-Cayer, E., Gaudette, F., . . . Huot, P. (2018). Effect of the selective 5-HT2A receptor antagonist EMD-281,014 on L-DOPA-induced abnormal involuntary movements in the 6-OHDA-lesioned rat. *Exp Brain Res*. doi:10.1007/s00221-018-5390-4
- Gelfin, E., Kaufman, Y., Korn-Lubetzki, I., Bloch, B., Kremer, I., Javitt, D. C., & Heresco-Levy, U. (2012). D-serine adjuvant treatment alleviates behavioural and motor symptoms in Parkinson's disease. *The The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 15(4), 543-549.
- Hely, M. A., Morris, J. G., Reid, W. G., Trafficante, R. (2005). Sydney Multicenter Study of Parkinson's disease: non-L-dopa-responsive problems dominate at 15 years. *Movement Disorders*, 20(2), 190-199. doi:10.1002/mds.20324
- Hofmann, C., Banken, L., Hahn, M., Swearingen, D., Nagel, S., & Martin-Facklam, M. (2012). Evaluation of the effects of bitopertin (RG1678) on cardiac repolarization: a thorough corrected QT study in healthy male volunteers. *Clinical therapeutics*, 34(10), 2061-2071.
- Hofmann, C., Pizzagalli, F., Boetsch, C., Alberati, D., Ereshefsky, L., Jhee, S., . . . Martin-Facklam, M. (2016). Effects of the glycine reuptake inhibitors bitopertin and RG7118 on

- glycine in cerebrospinal fluid: results of two proofs of mechanism studies in healthy volunteers. *Psychopharmacology*, 233(13), 2429-2439.
- Howell, D. C. (2006). *Statistical Methods for Psychology 6th Edition. Wadsworth Publishing, Belmont, 768p.*
- Huot, P., Johnston, T. H., Koprach, J. B., Espinosa, M. C., Reyes, M. G., Fox, S. H., & Brotchie, J. M. (2015). L-745,870 reduces the expression of abnormal involuntary movements in the 6-OHDA-lesioned rat. *Behav Pharmacol*, 26(1-2), 101-108.
doi:10.1097/FBP.0000000000000096
- Johnson, J., & Ascher, P. J. N. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *325(6104)*, 529-531.
- Kim, A., Kim, Y. E., Yun, J. Y., Kim, H.-J., Yang, H.-J., Lee, W.-W., . . . Kim, A. (2018). Amantadine and the risk of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease: an open-label, pragmatic trial. *Journal of movement disorders*, 11(2), 65.
- Kwan, C., Frouni, I., Bédard, D., Hamadjida, A., & Huot, P. (2020). Ondansetron, a highly selective 5-HT₃ receptor antagonist, reduces L-DOPA-induced dyskinesia in the 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease. *European Journal of Pharmacology*, 172914.
- Lundblad, M., Andersson, M., Winkler, C., Kirik, D., Wierup, N., & Cenci, M. A. (2002). Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience*, 15(1), 120-132.
- Mamlöf, T., Feltmann, K., Konradsson-Geuken, Å., Schneider, F., Alken, R.-G., Svensson, T. H., & Schilström, B. (2015). Deuterium-substituted l-DOPA displays increased behavioral potency and dopamine output in an animal model of Parkinson's disease: comparison with

- the effects produced by l-DOPA and an MAO-B inhibitor. *Journal of neural transmission*, 122(2), 259-272.
- Marras, C., Lang, A., Krahn, M., Tomlinson, G., Naglie, G., & Disorders, P. S. G. J. M. (2004). Quality of life in early Parkinson's disease: impact of dyskinesias and motor fluctuations. *19(1)*, 22-28.
- Meltzer, H. Y., Kennedy, J., Dai, J., Parsa, M., & Riley, D. (1995). Plasma clozapine levels and the treatment of L-DOPA-induced psychosis in Parkinson's disease: A high potency effect of clozapine. *Neuropsychopharmacology*, 12(1), 39-45.
- Migueluez, C., De Deurwaerdère, P., & Sgambato, V. J. F. i. P. (2020). Non-Dopaminergic Systems in Parkinson's Disease. *11*.
- Nambu, A., Tokuno, H., & Takada, M. (2002). Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal 'hyperdirect' pathway. *Neuroscience research*, 43(2), 111-117.
- Ohlin, K. E., Francardo, V., Lindgren, H. S., Sillivan, S. E., O'Sullivan, S. S., Luksik, A. S., . . . Cenci, M. A. (2011). Vascular endothelial growth factor is upregulated by L-dopa in the parkinsonian brain: implications for the development of dyskinesia. *Brain*, 134(8), 2339-2357.
- Parrott, N., Hainzl, D., Alberati, D., Hofmann, C., Robson, R., Boutouyrie, B., & Martin-Facklam, M. (2013). Physiologically based pharmacokinetic modelling to predict single-and multiple-dose human pharmacokinetics of bitopertin. *Clinical pharmacokinetics*, 52(8), 673-683.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2017). *The rat brain in stereotaxic coordinates: compact*: Academic press.

- Pechevis, M., Clarke, C., Vieregge, P., Khoshnood, B., Deschaseaux-Voinet, C., Berdeaux, G., . . . Neurology, T. S. G. J. E. J. o. (2005). Effects of dyskinesias in Parkinson's disease on quality of life and health-related costs: a prospective European study. *12*(12), 956-963.
- Perez-Lloret, S., & Rascol, O. (2018). Efficacy and safety of amantadine for the treatment of L-DOPA-induced dyskinesia. *Journal of Neural Transmission, 125*(8), 1237-1250.
- Pinard, E., Alanine, A., Alberati, D., Bender, M., Borroni, E., Bourdeaux, P., . . . Hainzl, D. (2010). Selective GlyT1 inhibitors: discovery of [4-(3-fluoro-5-trifluoromethylpyridin-2-yl)piperazin-1-yl][5-methanesulfonyl-2-((S)-2, 2, 2-trifluoro-1-methylethoxy) phenyl]methanone (RG1678), a promising novel medicine to treat schizophrenia. *Journal of medicinal chemistry, 53*(12), 4603-4614.
- Postma, J., & Van Tilburg, W. (1975). Visual hallucinations and delirium during treatment with amantadine (Symmetrel). *Journal of the American Geriatrics Society, 23*(5), 212-215.
- Rascol, O., Fabbri, M., & Poewe, W. (2021). Amantadine in the treatment of Parkinson's disease and other movement disorders. *20*(12), 1048-1056.
- Schallert, T., Fleming, S. M., Leasure, J. L., Tillerson, J. L., & Bland, S. T. (2000). CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology, 39*(5), 777-787. doi:S0028390800000058 [pii]
- Shoulson, I., Oakes, D., Fahn, S., Lang, A., Langston, J. W., LeWitt, P., . . . Kieburtz, K. (2002). Impact of sustained deprenyl (selegiline) in levodopa-treated Parkinson's disease: a randomized placebo-controlled extension of the deprenyl and tocopherol antioxidative therapy of parkinsonism trial. *Annals of neurology, 51*(5), 604-612.

- Thomas, A., Iacono, D., Luciano, A., Armellino, K., Di Iorio, A., & Onofrj, M. (2004). Duration of amantadine benefit on dyskinesia of severe Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 75(1), 141-143.
- Umbricht, D., Alberati, D., Martin-Facklam, M., Borroni, E., Youssef, E. A., Ostland, M., . . . Wettstein, J. G. (2014). Effect of bitopertin, a glycine reuptake inhibitor, on negative symptoms of schizophrenia: a randomized, double-blind, proof-of-concept study. *JAMA psychiatry*, 71(6), 637-646.
- Ungerstedt, U. (1968). 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *European journal of pharmacology*, 5(1), 107-110.
- Werner, F.-M., Coveñas, R. J. J. o. C., & Histology. (2014). Classical neurotransmitters and neuropeptides involved in Parkinson's Disease: A multi-neurotransmitter system. 5(5), 1.

Figure Legends

Figure 1: Drug-naïve 6-OHDA-lesioned rats ($N = 12$) displayed marked rearing asymmetry in the cylinder test by using the right (un-lesioned) forepaw in $\approx 83\%$ of rears. When 6-OHDA-lesioned rats were administered bitopertin (0.03 and 0.3 mg/kg), there was a significant decrease in the number of rears using the un-lesioned side, by $\approx 24\%$ and $\approx 35\%$, respectively.

Data are presented as mean \pm SEM. *: $P < 0.05$.

Figure 2: A. Drug-naïve 6-OHDA-lesioned rats ($N = 22$) used the un-lesioned forepaw in 85% of rears. Following the administration of L-DOPA (3/15 mg/kg), a $\approx 28\%$ reduction in the preferential use of the un-lesioned forepaw was obtained, which is indicative of an anti-parkinsonian effect. L-DOPA/bitopertin 3 mg/kg led to a $\approx 36\%$ increase of the un-lesioned forepaw use compared to vehicle treatment. **B.** Accordingly, the use of the lesioned forepaw was increased by 21 and 23-folds when L-DOPA/bitopertin 0.3 and L-DOPA/bitopertin 3 mg/kg were compared to vehicle treatment, respectively.

Data are presented as mean \pm SEM. *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

Figure 3: Global ALO AIMs scores in 6-OHDA-lesioned rats ($N = 23$) treated with L-DOPA in combination with bitopertin (0.03, 0.3 and 3 mg/kg) or vehicle. **A.** Bitopertin 0.03 and 3 mg/kg significantly reduced ALO AIMs duration, when compared to L-DOPA/vehicle (both by $\approx 18\%$). **B.** Bitopertin 0.03 and 3 mg/kg significantly diminished ALO AIMs amplitude, when compared to the vehicle treatment (by $\approx 16\%$). **C.** Bitopertin 0.03 and 3 mg/kg decreased integrated AIMs (by $\approx 27\%$ and $\approx 24\%$), when compared to L-DOPA/vehicle.

ALO AIMs scores are graphed as the mean \pm SEM.

: $P < 0.001$; *: $P < 0.0001$.

Figure 4: Global axial, limbs and orolingual AIMs scores in 6-OHDA-lesioned rats ($N = 23$) treated with L-DOPA in combination with bitopertin (0.03, 0.3 and 3 mg/kg) or vehicle. **A.** Bitopertin 0.03 and 3 mg/kg significantly reduced integrated axial AIMs by $\approx 26\%$ and $\approx 34\%$. **B.** Bitopertin 0.03 and 3 mg/kg significantly diminished integrated limbs AIMs by ≈ 20 and 25% . **C.** Bitopertin 0.03 mg/kg significantly reduced integrated oro-lingual AIMs by $\approx 19\%$.

ALO AIMs scores are graphed as the mean \pm SEM.

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

Figure 5: When dyskinetic 6-OHDA-lesioned rats ($N = 27$) were administered bitopertin 0.03 or 0.3 mg/kg or vehicle in combination with L-DOPA, ALO AIMs duration (A), amplitude (B) and integrated (C) significantly differed throughout the 4-week period, indicating that no tolerance developed to the anti-dyskinetic effects of bitopertin. Thus, on day 29, the addition of bitopertin 0.03 mg/kg reduced ALO AIMs duration by $\approx 29\%$, bitopertin 0.03 mg/kg and 0.3 mg/kg reduced ALO AIMs amplitude by $\approx 21\%$ and $\approx 10\%$, and decreased the integrated ALO AIMs by $\approx 52\%$ and $\approx 26\%$, respectively, compared to day 1.

ALO AIMs time courses are graphed as the median.

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***, ###: $P < 0.001$; #####: $P < 0.0001$.

Figure 6: When drug-naïve 6-OHDA-lesioned rats ($N = 35$) were administered bitopertin 0.03 or 0.3 mg/kg simultaneously with the first dose of L-DOPA, ALO AIMs duration (A), amplitude (B)

and integrated (C) remained lower throughout the dyskinesia induction phase, when compared to L-DOPA/vehicle. Whereas some animals in each group experienced dyskinesia as early as the first treatment dose, the severity of each of ALO AIMs duration, amplitude and integrated remained moderate to mild in groups receiving concomitant bitopertin, while it became severe in groups receiving L-DOPA/vehicle only. After a washout period in which rats received no treatments, all animals were given L-DOPA alone. The global severity of ALO AIMs duration (D), amplitude (E) and integrated (F) was significantly lower in rats treated with bitopertin 0.03 mg/kg during the induction phase, by $\approx 27\%$, $\approx 16\%$ and $\approx 33\%$, respectively, while rats treated with the higher dose of bitopertin, 0.3 mg/kg, did not exhibit less severe AIMs, when compared to animals that were treated daily with L-DOPA/vehicle.

ALO AIMs time courses are graphed as the median and the global AIMs severity is presented as the mean \pm SEM.

*,#: $P < 0.05$; **,##: $P < 0.01$; ***,&&&: $P < 0.001$; ****,&&&&: $P < 0.0001$.

Figure S1: Selected animals to undergo monotherapy (A), acute (B), chronic (C) or *de novo* (D) experiments with bitopertin exhibited a significantly higher use of the un-lesioned (right) forepaw compared to the lesioned (left) forepaw and both forepaws. The rearing asymmetry was assessed during the cylinder test.

Data are presented as the mean \pm SEM.

: $P < 0.01$; **: $P < 0.0001$.

Figure 1: Effect of bitopertin on parkinsonism in the 6-OHDA-lesioned rat

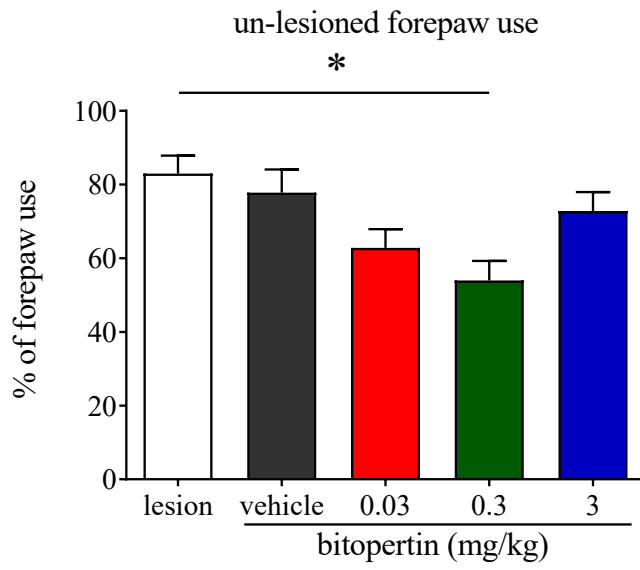
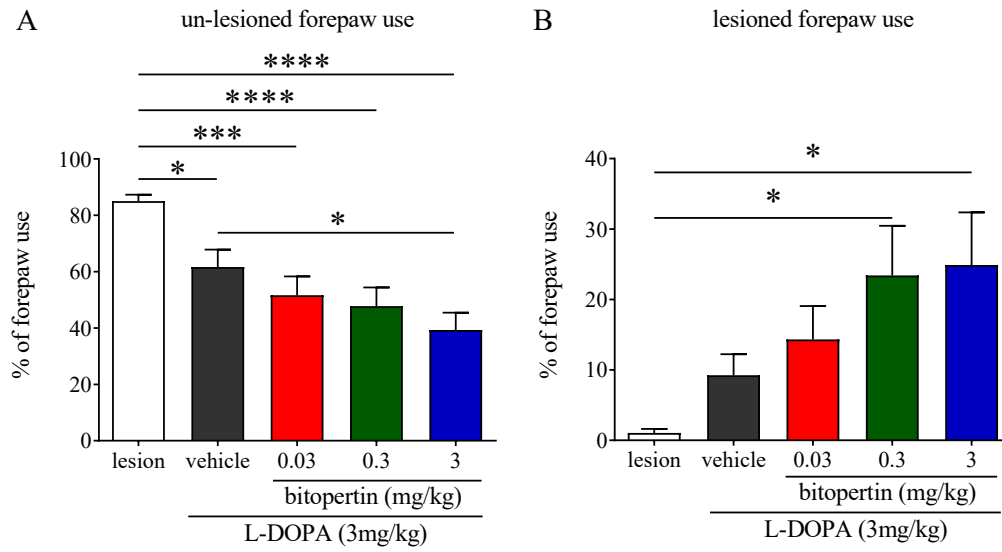


Figure 2: Effect of bitopertin on L-DOPA therapeutic action in the 6-OHDA-lesioned rat



**Figure 3: Effect of acute administration of bitopertin on established L-DOPA-induced ALO
AIMs in the 6-OHDA-lesioned rat**

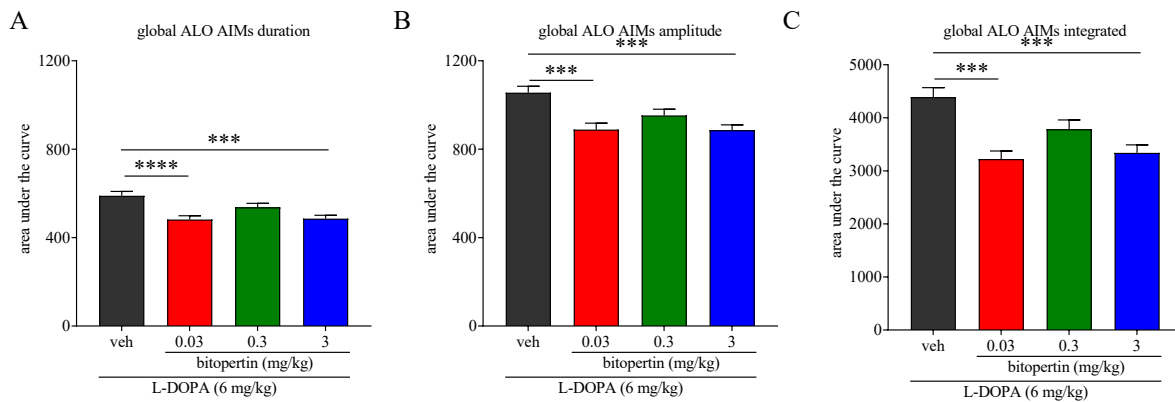


Figure 4: Effect of bitopertin on integrated axial, limbs and orolingual AIMS in the 6-OHDA-lesioned rat

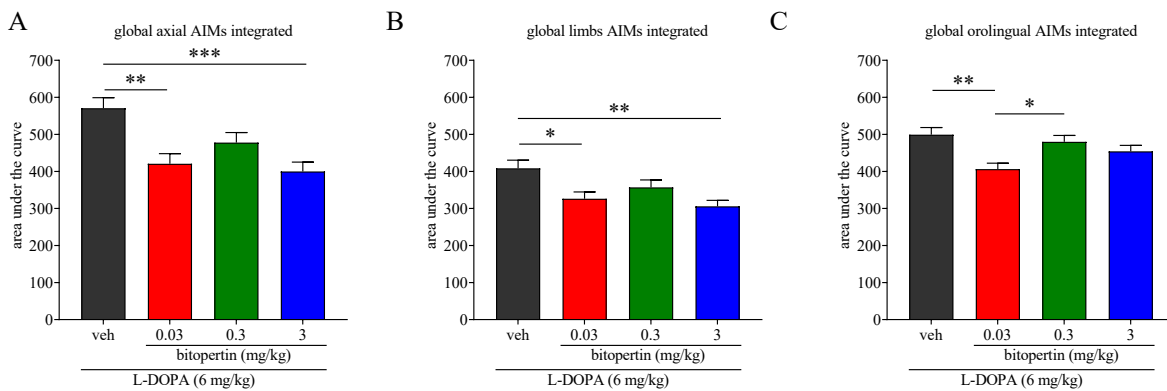


Figure 5: Effect of chronic administration of bitopertin on established L-DOPA-induced dyskinesia in the 6-OHDA-lesioned rat

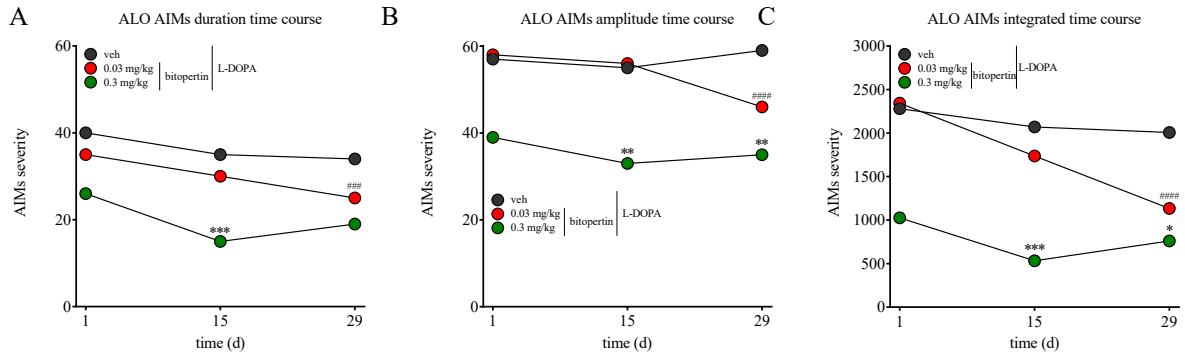


Figure 6: Effect of *de novo* administration of bitopertin on ALO AIMs development in the 6-OHDA-lesioned rat

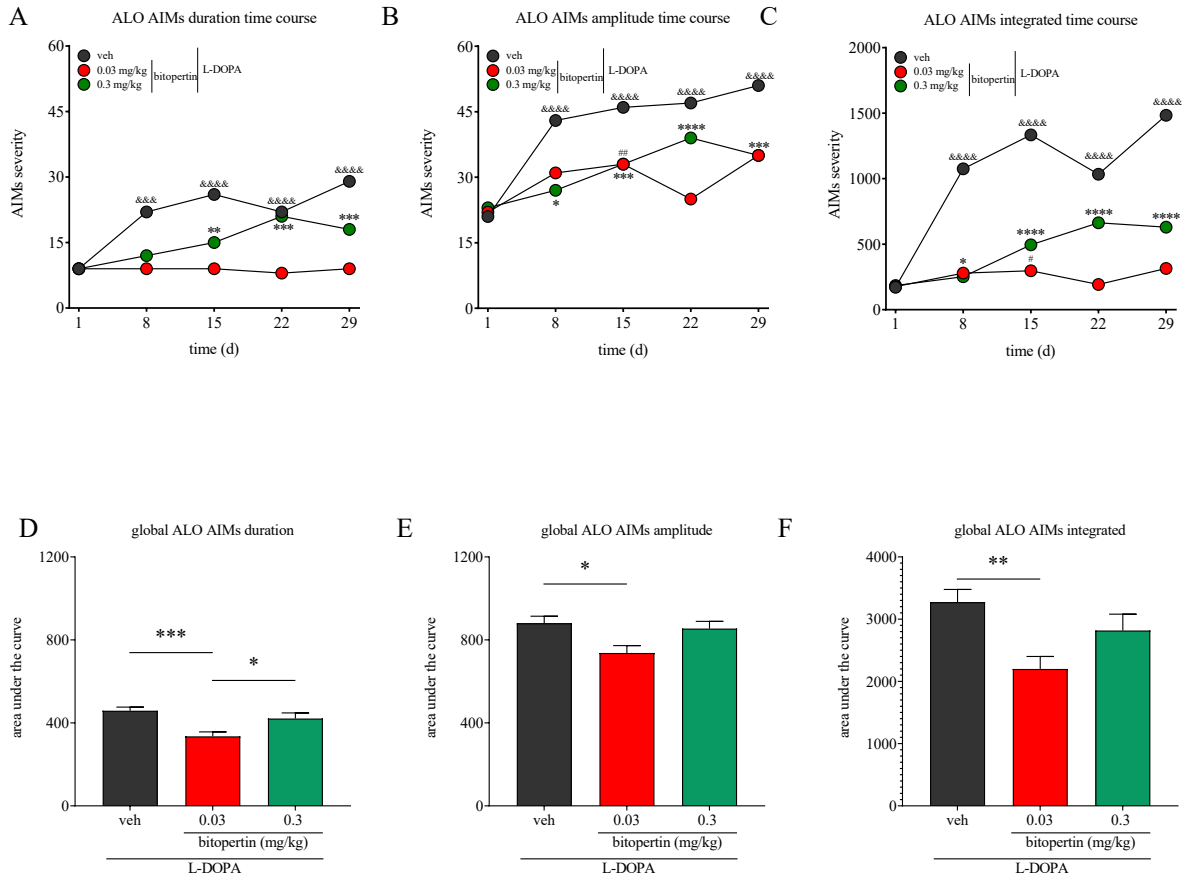


Figure S1: Rearing asymmetry of the animals included in the experiments

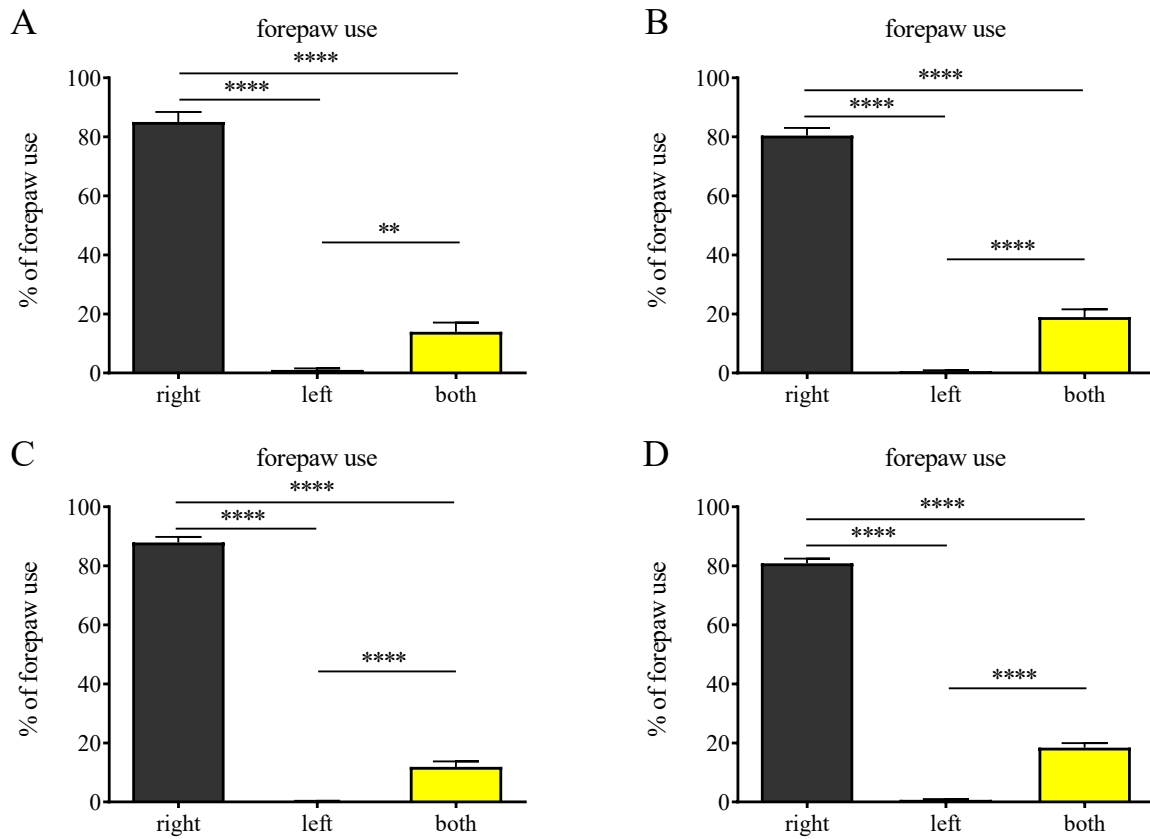


Table 1: Parkinsonism and levels of DOPAC and HVA striatal depletion in the 6-OHDA-lesioned rats included in the studies.

study	cylinder test	HPLC			
	right forepaw use	DOPAC		HVA	
	(%)	(pmol/mg wet tissue)		(pmol/mg wet tissue)	
		un-lesioned	lesioned	un-lesioned	lesioned
		side	side	side	side
monotherapy		5.188 ±	0.207 ±	2.391 ±	0.278 ±
(N = 12)	85.07 ^a	0.536	0.037 ^b	0.139	0.059 ^b
acute		4.324 ±	0.323 ±	2.629 ±	0.298 ±
(N = 22)	80.45 ^a	0.318	0.064 ^b	0.175	0.054 ^b
chronic		5.883 ±	0.405 ±	2.374 ±	0.383 ±
(N = 25)	87.89 ^a	0.399	0.031 ^b	0.077	0.027 ^b
<i>de novo</i>		4.839 ±	0.351 ±	2.541 ±	0.350 ±
(N = 34)	80.87 ^a	0.379	0.096 ^b	0.118	0.063 ^b

^a The right forepaw use prior to the monotherapy, acute, chronic and *de novo* studies is significantly higher when compared to left and both forepaw use. All $P < 0.0001$.

^b The levels of DOPAC and HVA in the lesioned side of the striatum were considerably reduced when compared to the un-lesioned side in all the studies. All $P < 0.0001$.

Table S1: Optimised MRM parameters for dopamine, homovanillic acid, and dihydroxyphenylacetic acid, and each deuterated internal standard.

analyte	precursor <i>m/z</i>	fragment 1 (quantitative)		fragment 2 (qualitative)	
		<i>m/z</i>	CE (V)	<i>m/z</i>	CE (V)
HVA	181	137	-15	122	-20
HVA-d ₅	186	142	-12	127	-20
DOPAC	167	123	-11		
DOPAC-d ₅	172	128	-11		

Chapitre 4: Effet de l'inhibition de GlyT1 sur les dyskinésies et les psychoses induites chez le modèle de ouistiti lésé au MPTP

Article publié dans **European Journal of Pharmacology** en 2021

Accès: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174452>

Titre en français:

Effet de l'inhibiteur du transporteur de la glycine 1, ALX-5407, sur la dyskinésie, les comportements de type psychose et le parkinsonisme chez le ouistiti lésé au MPTP.

Résumé en français:

Dans les stades avancés de la maladie de Parkinson (MP), la dyskinésie et la psychose sont des complications induites par une administration chronique de la L-3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA). Les perturbations du système glutamatergique ont été associées à la fois à la dyskinésie et à la psychose, faisant de la modulation glutamatergique une approche thérapeutique potentielle pour celles-ci. Jusqu'à présent, les traitements ont cherché à atténuer la transmission glutamatergique, par exemple par le blocage des récepteurs *N*-méthyl-D-aspartate (NMDA) ou la modulation des récepteurs métabotropes du glutamate 5. En revanche, l'activation du site de liaison à la glycine sur les récepteurs NMDA est nécessaire pour leur réponse physiologique. Ici, nous avons étudié si l'amélioration indirecte de la transmission glutamatergique par l'inhibition de la recapture de la glycine serait efficace pour diminuer à la fois la dyskinésie et les comportements de type psychose (PLBs) dans le modèle de ouistiti lésé au 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP).

Six ouistitis ont été rendus parkinsoniens par injection de MPTP. À la suite de l'administration répétée de L-DOPA pour induire des dyskinésies et des PLBs, une dose unique de l'inhibiteur du

transporteur de la glycine 1 (GlyT1) ALX-5407 (0,01, 0,1 et 1 mg/kg) ou le véhicule a été administré en combinaison avec la L-DOPA. Ensuite, la sévérité de la dyskinésie, des PLBs et du parkinsonisme a été évaluée.

En combinaison avec la L-DOPA, l'ALX-5407 0,1 et 1 mg/kg a significativement réduit la sévérité de la dyskinésie, de 51 % et 41 % (les deux $P < 0,001$), par rapport au véhicule. L'ALX-5407 0,01, 0,1 et 1 mg/kg a également diminué la sévérité globale des PLBs, de 25 %, 51 % et 38 % (tous $P < 0,001$), par rapport au véhicule. Les effets anti-dyskinétiques et antipsychotiques ont été obtenus sans compromettre l'effet thérapeutique de la L-DOPA sur le parkinsonisme.

Nos résultats suggèrent que l'inhibition de GlyT1 puisse être une nouvelle stratégie pour atténuer la dyskinésie et les PLBs dans la MP, sans interférer avec l'action antiparkinsonienne de la L-DOPA.

Effect of the glycine transporter 1 inhibitor ALX-5407 on dyskinesia, psychosis-like behaviours and parkinsonism in the MPTP-lesioned marmoset

Authors: Imane Frouni ^{1,2}, Sébastien Belliveau ¹, Shawn Maddaford ³, Stephen G Nuara ⁴, Jim C Gourdon ⁴, Philippe Huot ^{1,2,5,6}

¹ Neurodegenerative Disease Group, Montreal Neurological Institute-Hospital (The Neuro), Montreal, QC, Canada

² Département de Pharmacologie et Physiologie, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

³ Talon Pharmaceuticals, Mississauga, ON, Canada

⁴ Comparative Medicine & Animal Resource Centre, McGill University, Montreal, QC, Canada

⁵ Department of Neurology and Neurosurgery, McGill University, Montreal, QC, Canada

⁶ Movement Disorder Clinic, Division of Neurology, Department of Neuroscience, McGill University Health Centre, Montreal, QC, Canada

Abstract

Dyskinesia and psychosis are complications encountered in advanced Parkinson's disease (PD) following long-term therapy with L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA). Disturbances in the glutamatergic system have been associated with both dyskinesia and psychosis, making glutamatergic modulation a potential therapeutic approach for these. Treatments thus far have sought to dampen glutamatergic transmission, for example through blockade of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors or modulation of metabotropic glutamate receptors 5. In contrast, activation of the glycine-binding site on NMDA receptors is required for their physiological response. Here, we investigated whether indirectly enhancing glutamatergic transmission through inhibition of glycine re-uptake would be efficacious in diminishing both dyskinesia and psychosis-like behaviours (PLBs) in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-lesioned common marmoset.

Six marmosets were rendered parkinsonian by MPTP injection. Following repeated administration of L-DOPA to induce dyskinesia and PLBs, they underwent acute challenges of the glycine transporter 1 (GlyT₁) inhibitor ALX-5407 (0.01, 0.1 and 1 mg/kg) or vehicle, in combination with L-DOPA, after which the severity of dyskinesia, PLBs and parkinsonian disability was evaluated.

In combination with L-DOPA, ALX-5407 0.1 and 1 mg/kg significantly reduced the severity of dyskinesia, by 51% and 41% (both $P < 0.001$), when compared to vehicle. ALX-5407 0.01, 0.1 and 1 mg/kg also decreased the severity of global PLBs, by 25%, 51% and 38% (all $P < 0.001$), when compared to vehicle. The benefits on dyskinesia and PLBs were achieved without compromising the therapeutic effect of L-DOPA on parkinsonism.

Our results suggest that GlyT₁ inhibition may be a novel strategy to attenuate dyskinesia and PLBs in PD, without interfering with L-DOPA anti-parkinsonian action.

Key words: Parkinson's disease, MPTP-lesioned marmoset, dyskinesia, psychosis, ALX-5407, glycine transporter 1.

Declarations

Funding: IF holds a scholarship from Parkinson Canada. PH has received research support from Parkinson Canada, Parkinson Québec, Fonds de Recherche Québec – Santé, the Weston Brain Institute, the Michael J Fox Foundation for Parkinson’s Research, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, Healthy Brains for Healthy Lives and Biogen Inc. PH has received payments from Neurodiem.

Conflicts of interest: None.

Consent for publication: All authors read, commented on, and approved the manuscript.

Availability of data and material: Available upon written request to the corresponding author.

Ethics approval: Experiments were approved by McGill University and the Montreal Neurological Institute-Hospital (The Neuro) Animal Care Committees, which are in accordance with the regulations defined by the Canadian Council on Animal Care.

Consent to participate: Not applicable.

Code availability: Not applicable.

Introduction

L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) is the primary treatment for motor symptoms of Parkinson's disease (PD). However, with prolonged use, severe motor and non-motor complications such as dyskinesia and psychosis develop (Aquino and Fox, 2015). L-DOPA-induced dyskinesia is one of the most studied motor complications in PD, occurring in up to 94% of patients after 10–15 years of treatment (Hely et al., 2005). Similarly, up to 50% of PD patients also develop psychosis, notably hallucinations, 15 years after treatment introduction (Hely et al., 2005).

To date, few treatments are clinically available that improve the dyskinetic and psychotic profile of PD patients without compromising the therapeutic efficacy of L-DOPA with respect to motor symptoms. Hence, there is an urgent need to develop novel therapies for patients with PD. For dyskinesia, extended-release amantadine has demonstrated therapeutic effect across randomised controlled trials (Pahwa and Hauser, 2017; Pahwa et al., 2015), while the atypical anti-psychotic clozapine diminished dyskinesia in a randomised controlled trial (Durif et al., 2004). However, despite FDA approval of amantadine as a treatment for dyskinesia, concerning side effects such as tolerance and predisposition to visual hallucinations developed after long-term use (Perez-Lloret and Rascol, 2018; Thomas et al., 2004; Postma and Van Tilburg, 1975). As for psychosis, only two drugs, pimavanserin (Cummings et al., 2014) and clozapine (Parkinson Study Group, 1999; French Clozapine Parkinson Study Group, 1999), have demonstrated efficacy in alleviating psychosis in randomised controlled trials. Whereas clinical studies have shown promising results, the practical anti-psychotic effect is limited due to the

relatively modest therapeutic effect of pimavanserin (Cummings et al., 2014) and the risk of potentially fatal clozapine-associated agranulocytosis (Alvir et al., 1993).

It is interesting to note that clozapine was effective for both dyskinesia and psychosis in clinical settings. Clozapine is a multi-target drug that bears affinity for a wealth of receptors (Bymaster et al., 1996; Richelson and Souder, 2000). Although seldom acknowledged, clozapine also inhibits the reuptake of glycine, which may contribute to its differential clinical efficacy compared to other anti-psychotics (Javitt et al., 2005a). Whether this effect on glycine contributes to its anti-dyskinetic and anti-psychotic effects in PD remains unknown. Here, we sought to determine whether increasing brain glycine levels would confer therapeutic benefit for both dyskinesia and psychosis in PD. To this end, we have administered the glycine transporter 1 (GlyT1) inhibitor ALX-5407 to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-lesioned common marmosets and assessed its effects on dyskinesia and psychosis-like behaviours (PLBs). The MPTP-lesioned marmoset is a model of PD that has high predictive value of the efficacy of drugs in clinical trials (Beaudry and Huot, 2020; Veyres et al., 2018).

Materials and Methods

Drug

ALX-5407 was purchased from Cedarlane Laboratories (Burlington, ON, Canada). ALX-5407 is the “prototypical” sarcosine-derived GlyT1 inhibitor (Fig. 1) (Lindsley, 2010). It is highly-selective for, and potently inhibits, GlyT1 (half-maximal inhibitory concentration [IC50] \approx 3 nM) (Atkinson et al., 2001; Mallorga et al., 2003), and enters the brain in primates (Toyohara

et al., 2011). ALX-5407 doses were chosen from rat (Perry et al., 2008; Barthel et al., 2014) and primate (Toyohara et al., 2011) studies.

Animals

Six common marmosets (*Callithrix jacchus*; N = 3 males and 3 females; McGill University breeding colony) weighing 310–430g were used in the experiments. They were housed in pairs under controlled conditions of temperature (24 ± 1 °C), humidity ($50 \pm 5\%$) and a 12 h light/dark cycle (07:15 lights on). Marmosets had unrestricted access to water and were fed twice daily with Mazuri® marmoset jelly, boiled eggs, boiled pasta, fresh fruits, etc. Their home cages were enriched with various primate toys and perches. Marmosets were cared for in accordance with a protocol approved by McGill University and the Montreal Neurological Institute-Hospital (The Neuro) in accordance with regulations defined by the Canadian Council on Animal Care. Prior to the beginning of studies, animals were acclimated to handling, subcutaneous (s.c.) injections, as well as transfers to observation cages for behavioural experiments.

Induction of parkinsonism, dyskinesia and PLBs

Parkinsonism was induced by daily injections of MPTP hydrochloride in 0.9% NaCl (2 mg/kg s.c.; MilliporeSigma, Oakville, ON, Canada) for 5 days (Frouni et al., 2019). Once PD symptoms had stabilised, animals received L-DOPA/benserazide (henceforth referred to as L-DOPA, 15/3.75 mg/kg p.o., once daily; MilliporeSigma) for at least 30 days until dyskinesia and PLBs were consistently expressed (Hamadjida et al., 2017; Kwan et al., 2021). This

treatment regimen was previously demonstrated to induce stable and reproducible dyskinesia and PLBs (Kwan et al., 2021; Hamadjida et al., 2017; Frouni et al., 2019; Huot et al., 2014). Moreover, this dose of L-DOPA was shown to confer plasma levels comparable to those achieved clinically (Zhang et al., 2003; Huot et al., 2012).

Behavioural experiments

ALX-5407 was dissolved in 100% dimethyl sulfoxide (DMSO) and was then diluted to the desired dosage with 0.9% saline the day of administration. On experimental days, marmosets were injected with a therapeutic dose of L-DOPA (15/3.75 mg/kg s.c.) in combination with either vehicle or ALX-5407 (0.01, 0.1 and 1 mg/kg s.c.). Drug administration was randomised according to a within-subjects design. After administration of a given treatment, each animal was individually placed into an observation cage (36 × 33 × 22 in) containing food, water and a wooden perch, and was left undisturbed for 6 h. Behaviours were recorded via webcam for post hoc analysis by an experienced movement disorder neurologist blinded to the treatment administered. At least 48 h separated treatments in any animal, to allow complete drug clearance.

Evaluation of parkinsonism, dyskinesia and PLBs

The scales used to rate parkinsonism, dyskinesia and PLBs have been extensively detailed previously (Huot et al. 2011, 2014; Frouni et al., 2019; Sid-Otmane et al., 2020; Hamadjida et al., 2017; Fox et al. 2006, 2010; Visanji et al. 2006, 2009). For each of these scales, the higher

the score, the greater the disability. Behaviours were assessed simultaneously for 5 min every 10 min and scores were cumulated for each 30 min interval across the entire 6 h of observation.

The dyskinesia rating scale evaluates both choreiform and dystonic dyskinesias on a 0 to 4 scale, where 0 = absent and 4 = severe. The score attributed to any observation period was the most severe dyskinesia observed, whether chorea or dystonia. The PLB rating scale assesses for hyperkinesia, hallucinatory-like behaviour, repetitive grooming and stereotypies on a 0 to 4 scale, where 0 = absent and 4 = severe. The PLB score attributed to any observation period was the most severe of these 4 behaviours.

The parkinsonian disability scale includes measures of range of movement (0–9), bradykinesia (0–3), posture (0–1), and attention/alertness (0–1). For each of these parameters, a higher score indicates a greater disability. For each observation period, a global parkinsonian disability score was calculated as a combination of the aforementioned behaviours, according to the following formula: $(\text{range of movement} \times 1) + (\text{bradykinesia} \times 3) + (\text{posture} \times 9) + (\text{alertness} \times 9)$. The maximal parkinsonian disability score possible per observation period was 36.

The duration of anti-parkinsonian benefit, on-time, was defined as the number of minutes for which bradykinesia was absent (score of 0). On-time with disabling dyskinesia was defined as the number of minutes during which bradykinesia was absent but dyskinesias were disabling (scores of 3 or 4). On-time with disabling PLBs was defined as the number of minutes during which bradykinesia was absent but PLBs were disabling (scores of 3 or 4).

Statistical analysis

Time courses of parkinsonism, dyskinesia and PLB scores are presented as the median and were analysed by computing the area under the curve (AUC), after which one-way analysis of variance (ANOVA) was performed followed by Tukey's post hoc test. Peak dose (60–150 min) dyskinesia and PLB scores are presented as the median and were analysed using Friedman test followed by Dunn's post hoc test. On-time parameters are presented as the mean with the standard error of the mean (SEM) and were analysed by one-way repeated measures (RM) ANOVA followed by Tukey's post hoc test. For all experiments, statistical significance was set to $P < 0.05$. Statistical analyses were computed using GraphPad Prism 8.3.1 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA).

Results

Effect of ALX-5407 on L-DOPA-induced dyskinesia

As illustrated in Figure 1A and 1B, ALX-5407 significantly decreased the severity of global L-DOPA-induced dyskinesia ($F_{(3,20)} = 59.10$, $P < 0.001$, one-way ANOVA). After adding ALX-5407 0.1 and 1 mg/kg to L-DOPA, dyskinesia was reduced by 51% and 41% (all $P < 0.001$, Tukey's *post hoc* test), respectively, compared to L-DOPA alone. ALX-5407 0.1 and 1 mg/kg similarly diminished the severity of peak dose dyskinesia (Friedman Statistic [FS] = 11.38, $P < 0.01$, Figure 1C), by 50% and 46% (both $P < 0.05$, Dunn's *post hoc* test), compared to L-DOPA alone. This effect of ALX-5407 on the severity of L-DOPA-induced dyskinesia

was accompanied by a significant decrease of the duration of on-time with disabling dyskinesia ($F_{(3,15)} = 29.12$, $P < 0.001$, one-way RM ANOVA, Figure 1D), compared to L-DOPA alone. Duration of on-time with disabling dyskinesia was 110 min after administration of L-DOPA alone, whereas it was 30 min (73% reduction), 20 min (82% reduction) and 13 min (88% reduction) after ALX-5407 0.01, 0.1 and 1 mg/kg was added to L-DOPA (all $P < 0.001$, Tukey's *post hoc* test).

Effect of ALX-5407 on L-DOPA-induced PLBs

As presented in Figure 2A and 2B, ALX-5407 significantly decreased the severity of global L-DOPA-induced PLBs ($F_{(3,20)} = 50.571$, $P < 0.001$, one-way ANOVA). After adding ALX-5407 0.01, 0.1 and 1 mg/kg to L-DOPA, PLBs were reduced by 25%, 51%, and 38% (all $P < 0.001$, Tukey's *post hoc* test), compared to L-DOPA alone. ALX-5407 0.1 and 1 mg/kg both diminished the severity of peak dose PLBs ($F_S = 13.66$, $P < 0.001$, Figure 2C), both by 46% (both $P < 0.05$, Dunn's *post hoc* test), compared to L-DOPA alone. This effect of ALX-5407 on the severity of L-DOPA-induced PLBs was accompanied by a significant decrease of the duration of on-time with disabling PLBs ($F_{(3,15)} = 30.66$, $P < 0.001$, one-way RM ANOVA, Figure 2D), compared to L-DOPA alone. Duration of on-time with disabling PLBs was 128 min after administration of L-DOPA alone, whereas it was 52 min (59% reduction), 32 min (75% reduction) and 22 min (83 % reduction) after ALX-5407 0.01, 0.1 and 1 mg/kg was added to L-DOPA (all $P < 0.001$, Tukey's *post hoc* test).

Effect of ALX-5407 on parkinsonism

As depicted in Figure 3A, ALX-5407 enhanced the anti-parkinsonian action of L-DOPA ($F_{(3,20)} = 8.136$, $P < 0.001$, one-way ANOVA). After adding ALX-5407 0.01 and 1 mg/kg to L-DOPA, parkinsonian disability was reduced by 22% and 25% (both $P < 0.01$, Tukey's *post hoc* test), respectively, compared to L-DOPA alone (Figure 3B). However, the duration of on-time was similar across all treatments, which averaged 215 min in all treatments (Figure 3C).

Discussion

In this study, we demonstrated that glycine re-uptake inhibition with ALX-5407, a potent GlyT1 inhibitor, reduces L-DOPA-induced dyskinesia and PLBs without hindering L-DOPA anti-parkinsonian action. Glycine is a required co-agonist of NMDA receptors, on which it interacts with the GluN1 glycine-binding site (Dingledine et al., 1999); activation of the NMDA-associated glycine site is necessary for NMDA receptor activation by glutamate (Kleckner and Dingledine, 1988; Lester et al., 1993). Whereas direct enhancement of glutamatergic transmission poses a risk of excitotoxicity or seizures (Choi et al., 1987; Meurs et al., 2008), indirectly enhancing it by increasing glycine levels via GlyT1 blockade appears safe. Accordingly, several GlyT1 inhibitors have undergone clinical trials and have been generally well tolerated (Bugarski-Kirola et al., 2017; Schoemaker et al., 2014; Gunn et al., 2011; Hofmann et al., 2016; Liem-Moolenaar et al., 2013; Moschetti et al., 2018).

Whereas GlyT1 inhibitors in general have been well tolerated in the clinic, we would like to emphasise that ALX-5407 is not a clinical candidate, yet its selectivity makes it suitable to assess the efficacy of GlyT1 in pre-clinical models. Indeed, ALX-5407 is an irreversible GlyT1

inhibitor (Aubrey and Vandenberg, 2001) that has led to significant adverse events such as respiratory depression, as well as biochemical alterations in the brainstem and cerebellum at high dose (Perry et al., 2008).

The results of the current experiments are difficult to reconcile with the literature, which indicates that reducing transmission at NMDA receptors with amantadine (Oertel et al., 2017; Pahwa and Hauser, 2017; Pahwa et al., 2015) and dampening glutamatergic transmission at large (Tison et al., 2016; Nutt et al., 2008), alleviates dyskinesia. Looking at the classic model of the organisation of the basal ganglia, it is conceivable that an action along the “hyper-direct pathway”, i.e. the cortico – subthalamic nucleus (STN) – globus pallidus interna (GPi)/substantia nigra reticulata (SNr) complex – thalamo – cortical loop may be responsible for the effect demonstrated herein (Parent and Hazrati, 1995a, b; Nambu et al., 2002). Thus, an increase in glutamatergic transmission at the cortico-STN and the STN-GPi/SNr synapses would result in greater activation of the GPi/SNr complex, which would then inhibit the thalamus, which would in turn lead to decreased cortical activation, the clinical correlate of which might be a reduction of dyskinesia. Experiments that would measure GlyT1 levels along the cortico – basal ganglia – thalamo – cortical circuit are needed to explore this hypothesis.

It is noteworthy that the reduction of dyskinesia we achieved here compares to that obtained with amantadine in previous studies performed in the MPTP-lesioned marmoset, in which amantadine reduced dyskinesia severity by 20–50% (Kobylecki et al., 2011; Hill et al., 2004; Visanji et al., 2006). However, the use of amantadine in PD has been linked with the development of psychosis (Riederer et al., 1992; Chang et al., 2011; Postma and Van Tilburg,

1975; Verhagen Metman et al., 1998). NMDA antagonists such as phencyclidine may also lead to psychosis and hallucinations (Morris and Wallach, 2014). It may therefore not be surprising that enhancing NMDA transmission might have the opposite effect, and lead to a reduction of PD psychosis. For instance, a pilot trial conducted in PD patients with dementia found that the amino acid sarcosine, a GlyT1 inhibitor (Broer and Gether, 2012) and a direct agonist at the glycine-binding site on NMDA receptors (Zhang et al., 2009), reduced psychosis, although this effect was not sustained (Tsai et al., 2014). As is the case for dyskinesia, the brain areas involved in the anti-psychotic effect of glycine re-uptake inhibition remain to be elucidated. The temporal cortex has been associated with PD psychosis (Huot et al., 2010; Chang and Fox, 2016), and it is possible that GlyT1 inhibition might re-establish physiological glutamatergic transmission within this structure, ultimately resulting in a reduction of psychotic manifestations. Further studies are required to determine the validity of this conjecture.

With respect to motor features of PD, sarcosine led to an improvement in parkinsonian disability in PD patients with dementia (Tsai et al., 2014). Similarly, activating the glycine-binding site on NMDA receptor with D-serine has demonstrated efficacy in reducing motor symptoms as an adjunct treatment to L-DOPA (Gelfin et al., 2012). Thus, enhancing NMDA transmission through the glycine-binding site might have an anti-parkinsonian effect. Moreover, it has been shown that NMDA receptor activation upregulates the synthesis and release of dopamine in the striatum, which could help to reverse the generalised dopamine deficiency observed in PD (Cheramy et al., 1998; Zigmond et al., 1998).

For both dyskinesia and PLBs, we obtained a U-shaped dose-response, which suggests that the maximal effect of ALX-5407 might reside within a relatively narrow therapeutic window. Whether a similar dose-response phenomenon would also be obtained with other GlyT1 inhibitors in PD is uncertain. It should be pointed out that U-shaped biological effects were obtained with other GlyT1 inhibitors in the non-human primate (Eddins et al., 2014; Castner et al., 2014) and human trials (Martin-Facklam et al., 2013; Umbricht et al., 2014), which might represent a limit to the use of this class of agents. Glycine may exert a multimodal effect on the regulation of dopamine release that depends on glycine concentration, brain region and pre-synaptic versus post-synaptic action (de Bartolomeis et al., 2020). It has been shown that low dose glycine potentiates basal dopamine release from pre-synaptic dopamine terminals, while high dose glycine significantly inhibited dopamine release in mouse striatal tissues (Javitt et al., 2000). The GlyT1 inhibitor ALX-5311 was shown to potentiate NMDA-dependent gamma-aminobutyric acid (GABA) release which led to inhibition of striatal dopamine release. Glycine could exert a dual role by activating NMDA receptors on pre-synaptic dopamine terminals or an inhibitory effect by activating NMDA receptors on GABAergic interneurons (Javitt et al., 2005b). Thus, a deeper investigation of the pharmacokinetic/pharmacodynamic properties of GlyT1 inhibitors is warranted.

Lastly, another interest in the use of GlyT1 inhibitors in PD stems from the fact that one of them, ACPFB, was shown to promote axon sprouting of dopaminergic neurons, in a NMDA-dependent manner, in the 6-hydroxydopamine-lesioned mouse (Schmitz et al., 2013). This study suggests that, in addition to their symptomatic benefit, GlyT1 inhibitors might promote

neuro-restoration and help restore neuronal function in the denervated striatum. Subsequent studies are needed to explore this exciting possibility.

In summary, we have established that GlyT1 inhibition with ALX-5407, can improve L-DOPA-induced complications, namely dyskinesia and psychotic phenomena, while also improving motor function. The present study also highlights the involvement of the NMDA glycine-binding site in the pathophysiology of dyskinesia and psychosis in PD. Further studies are required to expand our understanding of the mechanisms underlying the therapeutic effects of GlyT1 inhibition in PD.

Author contributions

1) Research project: A. Conception, B. Organisation, C. Execution;

2) Manuscript: A. Writing of the first draft, B. Review and Critique.

IF: 1C, 2A, 2B; SB: 2A, 2B; SM: 2B; SGN: 1B, 1C, 2B; JCG: 1B, 2B; PH: 1A, 1B, 1C, 2A, 2B

Funding

IF holds a scholarship from Parkinson Canada. PH has received research support from Parkinson Canada, Parkinson Québec, Fonds de Recherche Québec – Santé, the Weston Brain Institute, the Michael J Fox Foundation for Parkinson’s Research, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, Healthy Brains for Healthy Lives and Biogen Inc. PH has received payments from Neurodiem.

Competing interests

None.

Data and materials availability

Available upon written request to the corresponding author.

Ethics approval

Experiments were approved by McGill University and Montreal Neurological Institute-Hospital (The Neuro) Animal Care Committees, which proceed in accordance with the regulations defined by the Canadian Council on Animal Care.

References

- Alvir, J. M. J., Lieberman, J. A., Safferman, A. Z., Schwimmer, J. L., & Schaaf, J. A. (1993). Clozapine-induced agranulocytosis--incidence and risk factors in the United States. *New England Journal of Medicine*, *329*(3), 162-167.
- Aquino, C. C., & Fox, S. H. J. M. D. (2015). Clinical spectrum of levodopa-induced complications. *30*(1), 80-89.
- Atkinson, B. N., Bell, S. C., De Vivo, M., Kowalski, L. R., Lechner, S. M., Ognyanov, V. I., . . . Klitenick, M. A. (2001). ALX 5407: a potent, selective inhibitor of the hGlyT1 glycine transporter. *Mol Pharmacol*, *60*(6), 1414-1420. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11723250>
- Aubrey, K.R., Vandenberg, R.J. (2001). N[3-(4'-fluorophenyl)-3-(4'-phenylphenoxy)propyl]sarcosine (NFPS) is a selective persistent inhibitor of glycine transport. *Br. J.Pharmacol.* *134* (7), 1429–1436. doi :10.1038/sj.bjp.0704381.
- Barthel, F., Urban, A., Schlosser, L., Eulenburg, V., Werdehausen, R., Brandenburger, T., . . . Hermanns, H. (2014). Long-term application of glycine transporter inhibitors acts antineuropathic and modulates spinal N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR-1 expression in rats. *Anesthesiology*, *121*(1), 160-169. doi:10.1097/ALN.0000000000000203
- Beaudry, F., & Huot, P. (2020). The MPTP-lesioned marmoset model of Parkinson's disease: proposed efficacy thresholds that may potentially predict successful clinical trial results. *J Neural Transm (Vienna)*, *127*(10), 1343-1358. doi:10.1007/s00702-020-02247-2

- Broer, S., & Gether, U. (2012). The solute carrier 6 family of transporters. *Br J Pharmacol*, *167*(2), 256-278. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01975.x
- Bugarski-Kirola, D., Blaettler, T., Arango, C., Fleischhacker, W. W., Garibaldi, G., Wang, A., . . . Marder, S. R. (2017). Bitopertin in Negative Symptoms of Schizophrenia-Results From the Phase III FlashLyte and DayLyte Studies. *Biol Psychiatry*, *82*(1), 8-16. doi:10.1016/j.biopsych.2016.11.014
- Bymaster, F. P., Calligaro, D. O., Falcone, J. F., Marsh, R. D., Moore, N. A., Tye, N. C., . . . Wong, D. T. (1996). Radioreceptor binding profile of the atypical antipsychotic olanzapine. *Neuropsychopharmacology*, *14*(2), 87-96. doi: 10.1016/0893-133X(94)00129-N
- Castner, S. A., Murthy, N. V., Ridler, K., Herdon, H., Roberts, B. M., Weinzimmer, D. P., . . . Laruelle, M. (2014). Relationship between glycine transporter 1 inhibition as measured with positron emission tomography and changes in cognitive performances in nonhuman primates. *Neuropsychopharmacology*, *39*(12), 2742-2749. doi:10.1038/npp.2014.4
- Chang, A., & Fox, S. H. (2016). Psychosis in Parkinson's Disease: Epidemiology, Pathophysiology, and Management. *Drugs*, *76*(11), 1093-1118. doi:10.1007/s40265-016-0600-5
- Chang, B., Daniele, C. A., Gallagher, K., Madonia, M., Mitchum, R. D., Barrett, L., . . . McGehee, D. S. (2011). Nicotinic excitation of serotonergic projections from dorsal

raphe to the nucleus accumbens. *J Neurophysiol*, 106(2), 801-808. doi: 10.1152/jn.00575.2010

Cheramy, A., L'hirondel, M., Godeheu, G., Artaud, F., & Glowinski, J. (1998). Direct and indirect presynaptic control of dopamine release by excitatory amino acids. *Amino acids*, 14(1-3), 63-68.

Choi, D. W., Maulucci-Gedde, M., & Kriegstein, A. R. *J. o. N.* (1987). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. 7(2), 357-368.

Cummings, J., Isaacson, S., Mills, R., Williams, H., Chi-Burris, K., Corbett, A., . . . Ballard, C. (2014). Pimavanserin for patients with Parkinson's disease psychosis: a randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet*, 383(9916), 533-540. doi:10.1016/S0140-6736(13)62106-6

Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., & Traynelis, S. F. *J. P. r.* (1999). The glutamate receptor ion channels. 51(1), 7-62.

Durif, F., Debilly, B., Galitzky, M., Morand, D., Viallet, F., Borg, M., . . . Rascol, O. (2004). Clozapine improves dyskinesias in Parkinson disease: a double-blind, placebo-controlled study. *Neurology*, 62(3), 381-388. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14872017

Eddins, D., Hamill, T. G., Puri, V., Cannon, C. E., Vivian, J. A., Sanabria-Bohorquez, S. M., . . . Uslander, J. M. (2014). The relationship between glycine transporter 1 occupancy and

the effects of the glycine transporter 1 inhibitor RG1678 or ORG25935 on object retrieval performance in scopolamine impaired rhesus monkey. *Psychopharmacology (Berl)*, 231(3), 511-519. doi:10.1007/s00213-013-3260-0

Fox, S. H., Visanji, N., Reyes, G., Huot, P., Gomez-Ramirez, J., Johnston, T., & Brotchie, J. M. (2010). Neuropsychiatric behaviors in the MPTP marmoset model of Parkinson's disease. *Can J Neurol Sci*, 37(1), 86-95. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20169779

Fox, S. H., Visanji, N. P., Johnston, T. H., Gomez-Ramirez, J., Voon, V., & Brotchie, J. M. (2006). Dopamine receptor agonists and levodopa and inducing psychosis-like behavior in the MPTP primate model of Parkinson disease. *Arch Neurol*, 63(9), 1343-1344. doi:63/9/1343-a [pii]

French Clozapine Parkinson Study Group. (1999). Clozapine in drug-induced psychosis in Parkinson's disease. *The Lancet*, 353(9169), 2041-2042.

Frouni, I., Hamadjida, A., Kwan, C., Bedard, D., Nafade, V., Gaudette, F., . . . Huot, P. (2019). Activation of mGlu2/3 receptors, a novel therapeutic approach to alleviate dyskinesia and psychosis in experimental parkinsonism. *Neuropharmacology*, 158, 107725.

Gelfin, E., Kaufman, Y., Korn-Lubetzki, I., Bloch, B., Kremer, I., Javitt, D. C., & Heresco-Levy, U. J. I. J. o. N. (2012). D-serine adjuvant treatment alleviates behavioural and motor symptoms in Parkinson's disease. *15*(4), 543-549.

- Gunn, R. N., Murthy, V., Catafau, A. M., Searle, G., Bullich, S., Slifstein, M., . . . Laruelle, M. (2011). Translational characterization of [11C]GSK931145, a PET ligand for the glycine transporter type 1. *Synapse*, *65*(12), 1319-1332. doi:10.1002/syn.20966
- Hamadjida, A., Nuara, S. G., Veyres, N., Frouni, I., Kwan, C., Sid-Otmane, L., . . . Huot, P. (2017). The effect of mirtazapine on dopaminergic psychosis and dyskinesia in the parkinsonian marmoset. *Psychopharmacology*, *234*(6), 905-911.
- Hely, M. A., Morris, J. G., Reid, W. G., & Trafficante, R. (2005). Sydney Multicenter Study of Parkinson's disease: non-L-dopa-responsive problems dominate at 15 years. *Mov Disord*, *20*(2), 190-199. doi:10.1002/mds.20324
- Hill, M. P., Ravenscroft, P., Bezard, E., Crossman, A. R., Brotchie, J. M., Michel, A., . . . Klitgaard, H. (2004). Levetiracetam potentiates the antidyskinetic action of amantadine in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-lesioned primate model of Parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther*, *310*(1), 386-394. doi:10.1124/jpet.104.066191
- Hofmann, C., Pizzagalli, F., Boetsch, C., Alberati, D., Ereshefsky, L., Jhee, S., . . . Martin-Facklam, M. (2016). Effects of the glycine reuptake inhibitors bitopertin and RG7118 on glycine in cerebrospinal fluid: results of two proofs of mechanism studies in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl)*, *233*(13), 2429-2439. doi:10.1007/s00213-016-4317-7

- Huot, P., Johnston, T. H., Darr, T., Hazrati, L. N., Visanji, N. P., Pires, D., . . . Fox, S. H. (2010). Increased 5-HT_{2A} receptors in the temporal cortex of parkinsonian patients with visual hallucinations. *Mov Disord*, *25*(10), 1399-1408.
- Huot, P., Johnston, T. H., Koprach, J. B., Fox, S. H., & Brotchie, J. M. J. N. (2012). L-DOPA pharmacokinetics in the MPTP-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *63*(5), 829-836.
- Huot, P., Johnston, T. H., Lewis, K. D., Koprach, J. B., Reyes, M. G., Fox, S. H., . . . Brotchie, J. M. (2011). Characterization of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) Enantiomers In Vitro and in the MPTP-Lesioned Primate: R-MDMA Reduces Severity of Dyskinesia, Whereas S-MDMA Extends Duration of ON-Time. *J Neurosci*, *31*(19), 7190-7198. doi:10.1523/JNEUROSCI.1171-11.2011
- Huot, P., Johnston, T. H., Lewis, K. D., Koprach, J. B., Reyes, M. G., Fox, S. H., . . . Brotchie, J. M. (2014). UWA-121, a mixed dopamine and serotonin re-uptake inhibitor, enhances L-DOPA anti-parkinsonian action without worsening dyskinesia or psychosis-like behaviours in the MPTP-lesioned common marmoset. *Neuropharmacology*, *82*, 76-87. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.01.012
- Javitt, D. C., Duncan, L., Balla, A., & Sershen, H. (2005). Inhibition of system A-mediated glycine transport in cortical synaptosomes by therapeutic concentrations of clozapine: implications for mechanisms of action. *Mol Psychiatry*, *10*(3), 275-287. doi:10.1038/sj.mp.4001552

- Javitt, D.C., Hashim, A., Sershen, H. (2005b). Modulation of striatal dopamine release by glycine transport inhibitors. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 30 (4), 649–656.
doi:10.1038/sj.npp.1300589.
- Kleckner, N. W., & Dingledine, R. (1988). Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science*, 241(4867), 835-837. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2841759>
- Kobylecki, C., Hill, M. P., Crossman, A. R., & Ravenscroft, P. (2011). Synergistic antidyskinetic effects of topiramate and amantadine in animal models of Parkinson's disease. *Mov Disord*, 26(13), 2354-2363. doi:10.1002/mds.23867
- Kwan, C., Nuara, S. G., Bedard, D., Gaudette, F., Gourdon, J. C., Beaudry, F., & Huot, P. J. N. (2021). Selective blockade of the 5-HT3 receptor acutely alleviates dyskinesia and psychosis in the parkinsonian marmoset. *182*, 108386.
- Lester, R. A., Tong, G., & Jahr, C. E. (1993). Interactions between the glycine and glutamate binding sites of the NMDA receptor. *J Neurosci*, 13(3), 1088-1096. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8095067>
- Liem-Moolenaar, M., Peeters, P., Kamerling, I. M., Hogg, C., Holder, G., Kleijn, H. J., . . . van Gerven, J. M. (2013). Early stage development of the glycine-1 re-uptake inhibitor SCH 900435: central nervous system effects compared with placebo in healthy men. *Br J Clin Pharmacol*, 75(6), 1455-1467. doi:10.1111/bcp.12015

- Lindsley, C. (2010). GlyT1 - Up from the Ashes. The importance of not condemning a mechanism based on a single chemotype. *ACS Chem Neurosci*, *1*(3), 165-166. doi:10.1021/cn100017a
- Mallorga, P. J., Williams, J. B., Jacobson, M., Marques, R., Chaudhary, A., Conn, P. J., . . . Sur, C. (2003). Pharmacology and expression analysis of glycine transporter GlyT1 with [3H]-(N-[3-(4'-fluorophenyl)-3-(4'phenylphenoxy)propyl])sarcosine. *Neuropharmacology*, *45*(5), 585-593. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12941372>
- Martin-Facklam, M., Pizzagalli, F., Zhou, Y., Ostrowitzki, S., Raymont, V., Brasic, J. R., . . . Wong, D. F. (2013). Glycine transporter type 1 occupancy by bitopertin: a positron emission tomography study in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology*, *38*(3), 504-512. doi:10.1038/npp.2012.212
- Meurs, A., Clinckers, R., Ebinger, G., Michotte, Y., & Smolders, I. J. E. r. (2008). Seizure activity and changes in hippocampal extracellular glutamate, GABA, dopamine and serotonin. *78*(1), 50-59.
- Morris, H., & Wallach, J. (2014). From PCP to MXE: a comprehensive review of the non-medical use of dissociative drugs. *Drug Test Anal*, *6*(7-8), 614-632. doi:10.1002/dta.1620
- Moschetti, V., Desch, M., Goetz, S., Liesenfeld, K. H., Rosenbrock, H., Kammerer, K. P., . . . Wind, S. (2018). Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of Oral BI 425809, a Glycine Transporter 1 Inhibitor, in Healthy Male Volunteers: A Partially Randomised,

Single-Blind, Placebo-Controlled, First-in-Human Study. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 43(2), 239-249. doi:10.1007/s13318-017-0440-z

Nambu, A., Tokuno, H., & Takada, M. (2002). Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal 'hyperdirect' pathway. *Neurosci Res*, 43(2), 111-117. doi:10.1016/s0168-0102(02)00027-5

Nutt, J. G., Gunzler, S. A., Kirchhoff, T., Hogarth, P., Weaver, J. L., Krams, M., . . . Landen, J. W. (2008). Effects of a NR2B selective NMDA glutamate antagonist, CP-101,606, on dyskinesia and Parkinsonism. *Mov Disord*, 23(13), 1860-1866. doi:10.1002/mds.22169

Oertel, W., Eggert, K., Pahwa, R., Tanner, C. M., Hauser, R. A., Trenkwalder, C., . . . Stempien, M. J. (2017). Randomized, placebo-controlled trial of ADS-5102 (amantadine) extended-release capsules for levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease (EASE LID 3). *Mov Disord*, 32(12), 1701-1709. doi:10.1002/mds.27131

Pahwa, R., & Hauser, R. A. (2017). ADS-5102 (Amantadine) Extended Release for Levodopa-Induced Dyskinesia. *JAMA Neurol*, 74(12), 1507-1508. doi:10.1001/jamaneurol.2017.3205

Pahwa, R., Tanner, C. M., Hauser, R. A., Sethi, K., Isaacson, S., Truong, D., . . . Stempien, M. J. (2015). Amantadine extended release for levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease (EASED Study). *Mov Disord*, 30(6), 788-795. doi:10.1002/mds.26159

- Parent, A., & Hazrati, L. N. (1995a). Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev*, 20(1), 91-127. doi: 10.1016/0165-0173(94)00007-c
- Parent, A., & Hazrati, L. N. (1995b). Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Brain Res Rev*, 20(1), 128-154. doi: 10.1016/0165-0173(94)00008-d
- Parkinson Study Group. (1999). Low-dose clozapine for the treatment of drug-induced psychosis in Parkinson's disease. The Parkinson Study Group. *N Engl J Med*, 340(10), 757-763.
- Perez-Lloret, S., & Rascol, O. (2018). Efficacy and safety of amantadine for the treatment of L-DOPA-induced dyskinesia. *J Neural Transm (Vienna)*. doi:10.1007/s00702-018-1869-1
- Perry, K. W., Falcone, J. F., Fell, M. J., Ryder, J. W., Yu, H., Love, P. L., . . . Svensson, K. A. (2008). Neurochemical and behavioral profiling of the selective GlyT1 inhibitors ALX5407 and LY2365109 indicate a preferential action in caudal vs. cortical brain areas. *Neuropharmacology*, 55(5), 743-754. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.06.016
- Postma, J. U., & Van Tilburg, W. (1975). Visual hallucinations and delirium during treatment with amantadine (Symmetrel). *J Am Geriatr Soc*, 23(5), 212-215. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=123540

- Richelson, E., & Souder, T. (2000). Binding of antipsychotic drugs to human brain receptors focus on newer generation compounds. *Life Sci*, 68(1), 29-39. doi: 10.1016/s0024-3205(00)00911-5
- Riederer, P., Lange, K. W., Kornhuber, J., & Danielczyk, W. (1992). Glutamatergic-dopaminergic balance in the brain. Its importance in motor disorders and schizophrenia. *Arzneimittelforschung*, 42(2A), 265-268. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1350197>
- Schmitz, Y., Castagna, C., Mrejeru, A., Lizardi-Ortiz, J.E., Klein, Z., Lindsley, C.W., Sulzer, D. (2013). Glycine transporter-1 inhibition promotes striatal axon sprouting via NMDA receptors in dopamine neurons. *J. Neurosci.* 33 (42), 16778–16789. doi:10.1523/JNEUROSCI.3041-12.2013.
- Schoemaker, J. H., Jansen, W. T., Schipper, J., & Szegedi, A. (2014). The selective glycine uptake inhibitor org 25935 as an adjunctive treatment to atypical antipsychotics in predominant persistent negative symptoms of schizophrenia: results from the GIANT trial. *J Clin Psychopharmacol*, 34(2), 190-198. doi:10.1097/JCP.0000000000000073
- Sid-Otmane, L., Hamadjida, A., Nuara, S. G., Bédard, D., Gaudette, F., Gourdon, J. C., . . . Huot, P. (2020). Selective metabotropic glutamate receptor 2 positive allosteric modulation alleviates L-DOPA-induced psychosis-like behaviours and dyskinesia in the MPTP-lesioned marmoset. *European Journal of Pharmacology*, 873, 172957.

- Thomas, A., Iacono, D., Luciano, A. L., Armellino, K., Di Iorio, A., & Onofrj, M. (2004). Duration of amantadine benefit on dyskinesia of severe Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 75(1), 141-143. Retrieved from <http://dx.doi.org/>
- Tison, F., Keyword, C., Wakefield, M., Durif, F., Corvol, J. C., Eggert, K., . . . Rascol, O. (2016). A Phase 2A Trial of the Novel mGluR5-Negative Allosteric Modulator Dipraglurant for Levodopa-Induced Dyskinesia in Parkinson's Disease. *Mov Disord*, 31(9), 1373-1380. doi:10.1002/mds.26659
- Toyohara, J., Ishiwata, K., Sakata, M., Wu, J., Nishiyama, S., Tsukada, H., & Hashimoto, K. (2011). In vivo evaluation of carbon-11-labelled non-sarcosine-based glycine transporter 1 inhibitors in mice and conscious monkeys. *Nucl Med Biol*, 38(4), 517-527. doi:10.1016/j.nucmedbio.2010.11.009
- Tsai, C. H., Huang, H. C., Liu, B. L., Li, C. I., Lu, M. K., Chen, X., . . . Lane, H. Y. (2014). Activation of N-methyl-D-aspartate receptor glycine site temporally ameliorates neuropsychiatric symptoms of Parkinson's disease with dementia. *Psychiatry Clin Neurosci*. doi:10.1111/pcn.12175
- Umbricht, D., Alberati, D., Martin-Facklam, M., Borroni, E., Youssef, E. A., Ostland, M., . . . Santarelli, L. (2014). Effect of bitopertin, a glycine reuptake inhibitor, on negative symptoms of schizophrenia: a randomized, double-blind, proof-of-concept study. *JAMA Psychiatry*, 71(6), 637-646. doi:10.1001/jamapsychiatry.2014.163

- Verhagen Metman, L., Del Dotto, P., van den Munckhof, P., Fang, J., Mouradian, M. M., & Chase, T. N. (1998). Amantadine as treatment for dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. *Neurology*, *50*(5), 1323-1326.
- Veyres, N., Hamadjida, A., & Huot, P. (2018). Predictive Value of Parkinsonian Primates in Pharmacologic Studies: A Comparison between the Macaque, Marmoset, and Squirrel Monkey. *J Pharmacol Exp Ther*, *365*(2), 379-397. doi:10.1124/jpet.117.247171
- Visanji, N., Fox, S., Johnston, T., Millan, M., Brotchie, J. J. J. o. P., & Therapeutics, E. (2009). α 1-Adrenoceptors mediate dihydroxyphenylalanine-induced activity in 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-lesioned macaques. *328*(1), 276-283.
- Visanji, N. P., Gomez-Ramirez, J., Johnston, T. H., Pires, D., Voon, V., Brotchie, J. M., & Fox, S. H. (2006). Pharmacological characterization of psychosis-like behavior in the MPTP-lesioned nonhuman primate model of Parkinson's disease. *Mov Disord*, *21*(11), 1879-1891. doi:10.1002/mds.21073
- Zhang, H. X., Hyrc, K., & Thio, L. L. (2009). The glycine transport inhibitor sarcosine is an NMDA receptor co-agonist that differs from glycine. *J Physiol*, *587*(Pt 13), 3207-3220. doi:10.1113/jphysiol.2009.168757
- Zhang, J., Qu, F. R., Nakatsuka, A., Nomura, T., Nagai, M., & Nomoto, M. (2003). Pharmacokinetics of L-dopa in plasma and extracellular fluid of striatum in common marmosets. *Brain Res*, *993*(1-2), 54-58. doi: 10.1016/j.brainres.2003.08.065

Zigmond, M., Castro, S., Keefe, K., Abercrombie, E., & Sved, A. J. A. A. (1998). Role of excitatory amino acids in the regulation of dopamine synthesis and release in the neostriatum. *14*(1-3), 57-62.

Figure legends

Figure 1: GlyT₁ inhibition with ALX-5407 reduces L-DOPA-induced dyskinesia in the MPTP-lesioned marmoset. ALX-5407 (0.01, 0.1 and 1 mg/kg) in combination with L-DOPA significantly reduced global dyskinesia (**A**) and AUC of dyskinesia time course, by 32%, 51% and 41%, respectively, compared to L-DOPA alone (**B**). ALX-5407 (0.1 and 1 mg/kg) also reduced the severity of peak dose dyskinesia, by 50% and 46%, respectively, compared to L-DOPA alone (**C**). The anti-dyskinetic effect of ALX-5407 (0.01, 0.1 and 1 mg/kg) was accompanied by a significant decrease of the duration of on-time with disabling dyskinesia, by 73%, 82% and 88%, respectively, compared to L-DOPA alone (**D**).

In A, each time point represents the median cumulated dyskinesia scores for every 5 min observation period during the preceding 30 min, with a maximal dyskinesia score at any time point of 12. In B and D, data are presented as the mean \pm SEM. In C, data are presented as the median dyskinesia score from 60-150 min after treatment administration, with a maximal possible score of 36.

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

Figure 2: GlyT₁ inhibition with ALX-5407 alleviates PLBs in the MPTP-lesioned marmoset. ALX-5407 (0.01, 0.1 and 1 mg/kg) in combination with L-DOPA significantly reduced global PLBs (**A**) and AUC of PLBs time course, by 25%, 51% and 37%, respectively, compared to L-DOPA alone (**B**). ALX-5407 (0.1 and 1 mg/kg) also reduced the severity of peak dose PLBs, by 46% for both doses, compared to L-DOPA alone (**C**). The anti-psychotic effect of ALX-5407 (0.01, 0.1 and 1 mg/kg) was accompanied by a significant decrease of the duration

of on-time with disabling PLBs, by 59%, 75% and 83%, respectively, compared to L-DOPA alone (**D**). In **A**, each time point represents the median cumulated PLB scores for every 5 min observation period during the preceding 30 min, with a maximal PLB score at any time point of 12. In **B** and **D**, data are presented as the mean \pm SEM. In **C**, data are presented as the median PLB score from 60-150 min after treatment administration, with a maximal possible score of 36.

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

Figure 3: GlyT₁ inhibition enhances L-DOPA anti-parkinsonian action in the MPTP-lesioned marmoset. ALX-5407 (0.01 and 1 mg/kg) in combination with L-DOPA improved the anti-parkinsonian action of L-DOPA (**A**) and reduced the AUC of the parkinsonian disability time course by 22% and 25% respectively, compared to L-DOPA alone (**B**). Duration of L-DOPA anti-parkinsonian action was not significantly extended, despite \approx 43 min of added on-time (**C**). In **A**, each time point represents the median cumulated parkinsonian disability scores for every 5 min observation period during the preceding 30 min, with a maximal PLB score at any time point of 108. In **B**, data are shown as the mean \pm SEM.

Figure 1

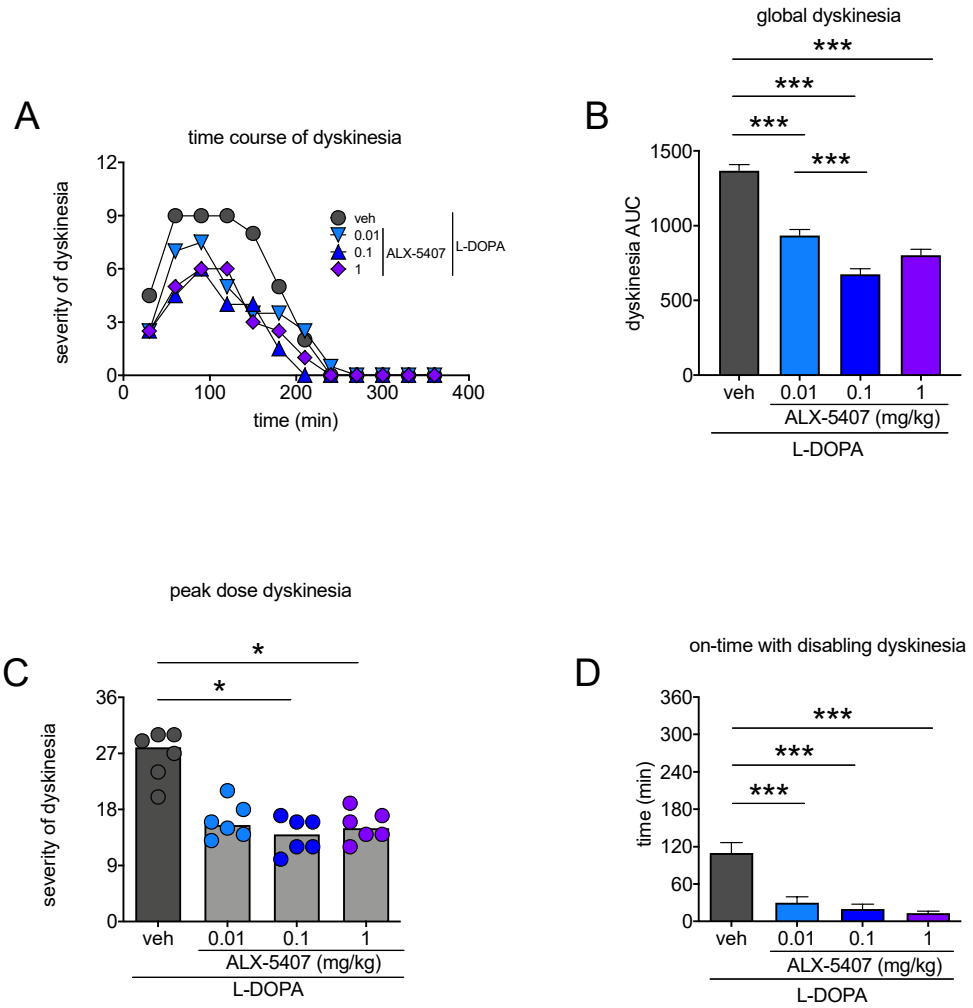


Figure 2

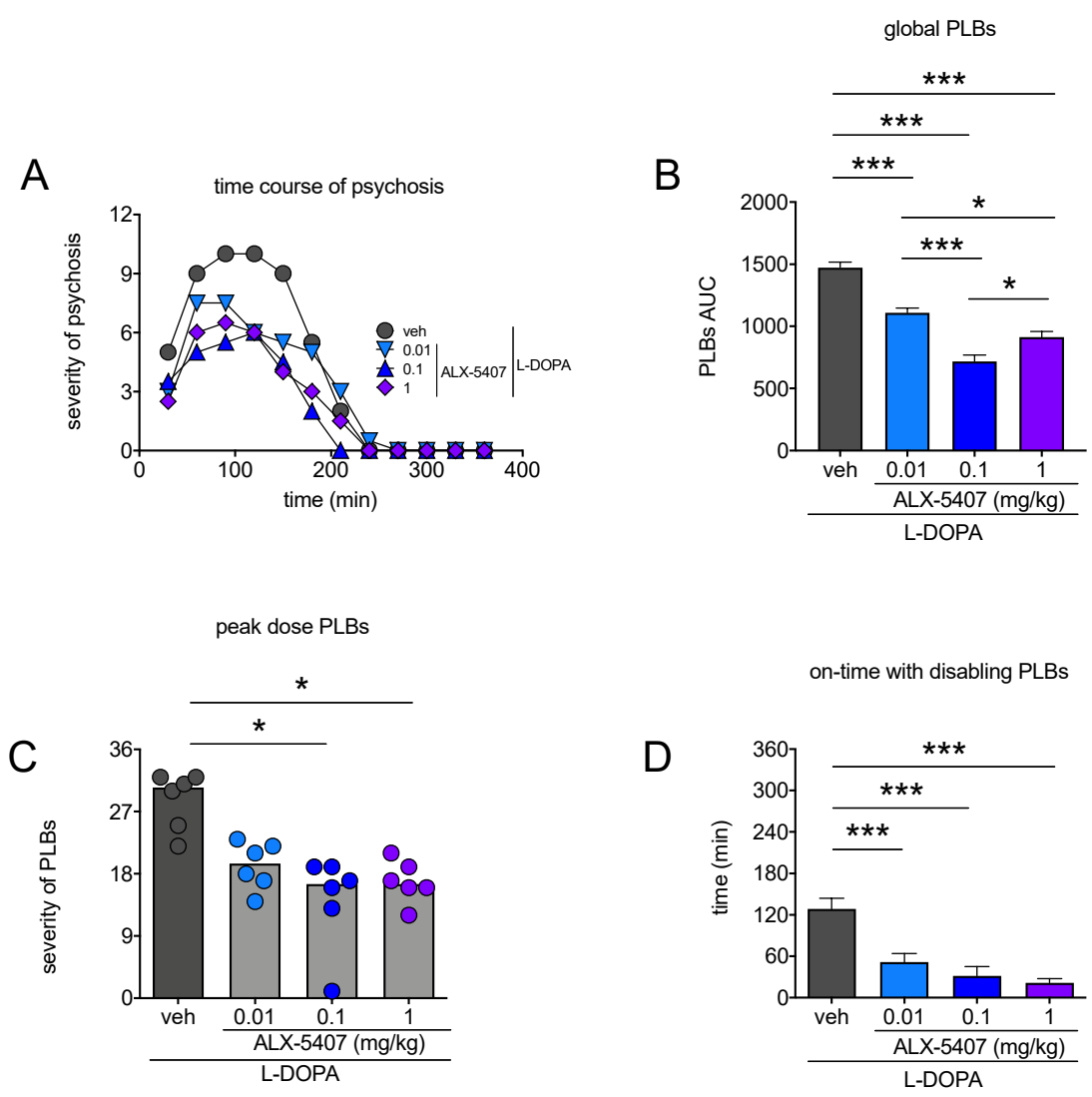
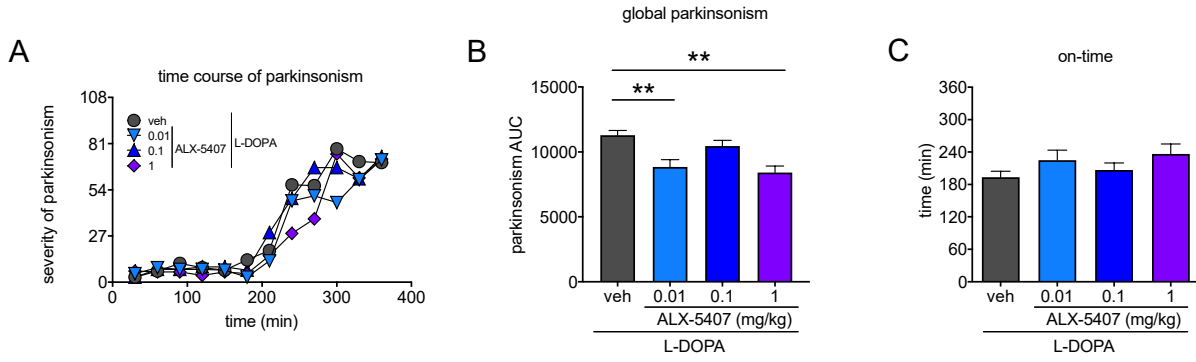


Figure 3



4. DISCUSSION

4.1. Récapitulation des résultats

Dans le premier article de cette thèse, nous avons développé et validé une méthode pour quantifier les niveaux plasmatiques de bitopertin chez le rat et le ouistiti après une administration sous-cutanée ou intraveineuse. Avec cette méthode, nous avons pu quantifier des concentrations aussi basses que 0,3 ng/mL pour les échantillons de rat et 1,2 ng/mL pour les échantillons de ouistiti. Grâce à cette méthode, nous avons révélé pour la première fois le profil pharmacocinétique du bitopertin chez le rat après une administration sous-cutanée dans le deuxième article. Nous avons également pu déterminer que le bitopertin présente un profil pharmacocinétique linéaire chez le rat, avec une absorption et élimination lentes.

Dans le troisième article de cette thèse, nous avons exploré les effets thérapeutiques du bitopertin chez un modèle animal de la MP, soit le rat lésé à la 6-OHDA. Nous avons déterminé que l'inhibition de GlyT1 avec le bitopertin réduit la sévérité du parkinsonisme lorsqu'administré en monothérapie et améliore l'effet thérapeutique de la L-DOPA lorsqu'administré en concomitance. De plus, le bitopertin atténue le développement des dyskinésies au fil du temps, réduit l'expression des dyskinésies établies après une première administration et n'induit pas de tolérance à l'effet anti-dyskinétique après 4 semaines de traitement. Avec ces résultats, nous suggérons que l'inhibition de GlyT1 par le bitopertin pourrait représenter une nouvelle approche thérapeutique pour traiter les complications motrices de la MP.

Ensuite, nous avons évalué les effets thérapeutiques de l'ALX-5407, un dérivé de sarcosine et inhibiteur de GlyT1, chez le ouistiti lésé au MPTP. Nous avons déterminé que l'ALX-5407

réduit la sévérité globale de la dyskinésie induite par la L-DOPA et des comportements de types psychotiques, et améliore l'effet thérapeutique global de la L-DOPA.

Dans l'ensemble, ces résultats combinés renforcent le potentiel translationnel de cette cible dans le traitement de la MP et des complications induites par la L-DOPA. Dans la discussion suivante, nous allons discuter de la pertinence de ces résultats par rapport aux pharmacothérapies existantes et des mécanismes par lesquels GlyT1 aurait pu apporter un effet thérapeutique. Nous allons également présenter les limitations rencontrées dans ces études et les perspectives futures.

4.2. L'inhibition de GlyT1 comme cible thérapeutique pour la MP et la dyskinésie

Le bitopertin et l'ALX-5407 ont montré une amélioration de l'effet antiparkinsonien de la L-DOPA. En effet, le bitopertin (3 mg/kg) a amélioré l'effet de L-DOPA de 36% comparativement à 25% avec l'ALX-5407 (1 mg/kg). Toutefois, le bitopertin a été administré en combinaison avec L-DOPA (3 mg/kg), soit la moitié de la dose administrée avec l'ALX-5407, ce qui pourrait expliquer l'écart thérapeutique entre les deux molécules. L'amélioration de l'effet thérapeutique de la L-DOPA à la suite de l'administration du bitopertin pourrait être expliquée par un effet additif. Une possibilité serait une stimulation des terminaisons thalamo-corticales, ce qui résulterait en davantage d'excitation corticale, et en plus de fluidité du mouvement. À cet effet, nous avons démontré qu'une administration en monothérapie du bitopertin réduit la sévérité du parkinsonisme chez le modèle de rat. Pour ce qui est de la

dyskinésie, les deux molécules ont montré un effet anti-dyskinétique. Le bitopertin (0.03 mg/kg) a réduit la sévérité globale des AIMs de 27 % comparativement à une réduction de la sévérité globale de la dyskinésie de 51% avec l'ALX-5407 (0.1 mg/kg). Tout d'abord, cet écart peut être expliqué par le choix des doses de bitopertin administrées chez le modèle de rat. Nous avons choisi des doses qui peuvent atteindre des niveaux plasmatiques connus et tolérable en clinique (Bugarski-Kirola et al., 2017; Parrott et al., 2013; Parrott et al., 2014). Il aurait été possible d'obtenir un effet plus important sur la dyskinésie si nous avons testé des doses plus élevées de bitopertin, mais la valeur translationnelle de nos résultats aurait été perdue. Quant à ALX-5401, il n'a jamais été testé en clinique et les doses ont été choisies à partir des études chez des modèles animaux dans la littérature (Barthel et al., 2014; Perry et al., 2008; Toyohara et al., 2011). De plus, les deux composés ont été administrés chez deux espèces différentes ce qui peut résulter en des effets drastiquement différents. Par exemple, le bitopertin a une demi-vie plus courte chez le rat que chez le ouistiti pour une même dose (Chapitre 1, figure 4), ce qui peut modifier l'effet thérapeutique de la molécule chez ces deux espèces. Le bitopertin a également atténué le développement des dyskinésies chez le modèle de rat. À la suite du *challenge* à la L-DOPA, l'effet antidyskinétique du bitopertin a persisté ce qui peut être expliqué par une réduction de la sensibilisation au traitement à la L-DOPA. Il serait nécessaire de répéter le *challenge* après une plus grande période de temps, cela permettra de déterminer si cet effet est maintenu à plus long terme ou si la combinaison du bitopertin avec la L-DOPA est nécessaire pour maintenir l'effet antidyskinétique. Des études sur le bitopertin chez le ouistiti lésé au MPTP serait également nécessaire pour mieux comparer les effets thérapeutiques avec ALX-5407 et chez le rat lésé à la 6-OHDA.

Avec les résultats présentés dans cette thèse, l'inhibition de GlyT1 représente une nouvelle approche thérapeutique pour la réduction du parkinsonisme et de la dyskinésie. Comme dit précédemment, l'inhibition de GlyT1 permet l'augmentation des niveaux de glycine au niveau des terminaisons synaptiques (Depoortère et al., 2005), la rendant ainsi disponible pour stimuler le récepteur NMDA via le site de liaison à la glycine.

Dans le circuit des ganglions de la base, les récepteurs glutamatergiques assurent la médiation et la modulation de la transmission synaptique. Dans la MP, la dégénérescence des neurones dopaminergiques perturbe l'équilibre entre la voie directe et la voie indirecte (Obeso et al., 2008). Cela mène à une hypoactivité de la voie directe et une hyperactivité de la voie indirecte (Obeso et al., 2008). Plusieurs études précliniques ont montré que les antagonistes des récepteurs NMDA ont des effets antiparkinsoniens dans divers modèles animaux de MP, y compris les rats traités à l'halopéridol et les primates lésés au MPTP (Kaur et al., 1997; McAllister, 1996; Nash et al., 2000; Steece-Collier et al., 2000). Par exemple, le traxoprodil (CP-101,606), un antagoniste de la sous-unité GluN2B du récepteur NMDA, inverse la catalepsie induite par l'halopéridol chez le rat et diminue les symptômes moteurs parkinsoniens chez les primates non-humains lésés par le MPTP (Steece-Collier et al., 2000). L'ifenprodil, un autre antagoniste sélectif des récepteurs NMDA GluN2B, réduit également les symptômes moteurs chez les primates lésés par le MPTP (Nash et al., 2000). Bien que les antagonistes du récepteur NMDA se soient révélés prometteurs pour inverser les symptômes moteurs dans les modèles animaux de MP, les études cliniques avec ce type de composé ont échoué à démontrer une efficacité antiparkinsonienne constante (Montastruc et al., 1992; Parkinson Study Group, 2000a, 2001). La seule pharmacothérapie antiglutamatergique actuellement utilisée pour traiter

la MP chez l'humain est l'amantadine (Dallos et al., 1970), un antagoniste non compétitif les récepteurs NMDA.

Pour ce qui est de la dyskinésie, elle a souvent été associée avec une hyperactivation de la transmission glutamatergique (Chase et al., 2000), ce qui a mené au développement de traitements tel que l'amantadine. L'amantadine réduit les dyskinésies survenant aux niveaux plasmatiques maximaux et l'expression de dyskinésies sans interférer avec l'effet thérapeutique de la L-DOPA chez la souris, le rat, les primates non-humains ainsi que chez des patients avec la MP (Blanchet et al., 1998; Dekundy et al., 2007; Del Dotto et al., 2001; Lundblad et al., 2005). Toutefois, il peut également induire certaines complications psychiatriques. D'autres antagonistes non-sélectifs du récepteur NMDA, tels que le dextrométhorphan et son métabolite le dextrorphan, ont également montré des résultats prometteurs dans des études cliniques (Blanchet et al., 1996b; Fox et al., 2017; Verhagen Metman et al., 1998a; Verhagen Metman et al., 1998b). Le rémacemide et la mémantine, deux autres antagonistes du récepteur NMDA, n'ont montré aucun effet sur la dyskinésie dans des études cliniques de phase II (Clarke et al., 2001; Merello et al., 1999; Parkinson Study, 2001; Shoulson et al., 2001). Cela laisse croire que l'effet thérapeutique de ces médicaments n'est probablement pas uniquement médié par le récepteur NMDA. En effet, l'amantadine a une affinité pour une multitude de cibles pharmacologiques, notamment les canaux potassiques, les récepteurs 5-HT₃, les récepteurs nicotiques $\alpha 4\beta 2$ et les récepteurs sigma-1 (Matsubayashi et al., 1997; Peeters et al., 2004; Rammes et al., 2001; Shen et al., 2020). Le dextrométhorphan a une affinité pour le transporteur de la sérotonine, les récepteurs sigma-1, les récepteurs adrénergiques α -2 et les récepteurs 5-HT_{1B/1D} (Werling et al., 2007). Des études précliniques ont montré que les antagonistes du récepteur 5-HT₃, l'ondansetron et le granisetron, atténuent l'expression de

dyskinésies chez les rats lésés à la 6-OHDA et les ouistitis lésés au MPTP (Aboulghasemi et al., 2019; Kwan et al., 2020, 2021a; Kwan et al., 2021b). De plus, l'inhibition du transporteur de la sérotonine avec la fluoxétine a montré une réduction de dyskinésie chez des patients avec la MP (Durif et al., 1995). En somme, on ne peut confirmer que l'effet anti-dyskinétique observé avec l'amantadine et le dextrométhorphan est propre au blocage du récepteur NMDA.

Le site à glycine du récepteur NMDA a été étudié comme une cible thérapeutique dans la schizophrénie. Des études cliniques randomisés contrôlés ont testé la glycine et la D-sérine, un agoniste du site à la glycine du récepteur NMDA, chez des patients présentant des symptômes de la MP et de dyskinésies tardives induites par des antipsychotiques (olanzapine et risperidone) (Heresco-Levy et al., 2004; Heresco-Levy et al., 2005). Selon l'échelle de Simpson-Angus (SAS) et l'échelle des mouvements involontaires anormaux (AIMS), une amélioration significative a été observée au niveau de la dyskinésie induite par les antipsychotiques et les symptômes parkinsoniens (Heresco-Levy et al., 2004; Heresco-Levy et al., 2005). Certes, les symptômes observés ne peuvent pas servir de modèle valide pour la MP et la dyskinésie induite par la L-DOPA, mais vu que les anticholinergiques peuvent servir dans les deux conditions pour atténuer ces symptômes (Bergman et al., 2018; Katzenschlager et al., 1996; Ward et al., 2018), cela laisse à croire qu'il y a des similitudes au niveau de la pathophysiologie des troubles moteurs induits par les antipsychotiques et les symptômes moteurs de la MP.

Un essai clinique croisé, en double aveugle, contrôlé par placebo a testé l'effet de la D-sérine comme traitement adjuvant chez des patients avec la MP (Gelfin et al., 2012). La D-sérine a entraîné une réduction significative des scores totaux de l'échelle d'évaluation unifiée de la MP (UPDRS) et du SAS (Gelfin et al., 2012). Ces résultats sont en concordance avec une étude qui

a montré une réduction des niveaux de la D-sérine dans la substance noire chez des primates lésés au MPTP (Nuzzo et al., 2019), suggérant que la normalisation des taux de D-sérine peut améliorer la transmission hypo-glutamatergique nigro-striée au site de la liaison de la glycine. Une autre étude en double aveugle contre placebo a montré que la sarcosine, un inhibiteur de GlyT1, a amélioré des symptômes moteurs chez des patients avec la MP avec des démences (Tsai et al., 2014), ce qui est en concordance avec les résultats obtenus dans cette thèse.

Les dyskinésies liées à la MP ont suscité un intérêt considérable avec les récepteurs NMDA, en particulier les sous-unités GluN2A et GluN2B. En effet, une altération de la composition du récepteur NMDA a été observée chez des patients avec la MP et des modèles animaux de la dyskinésie induite par la L-DOPA, avec une augmentation significative des sous-unités GluN2A (Hallett et al., 2005). Une étude portant sur des cerveaux *post-mortem* de patients parkinsoniens a révélé une augmentation de la liaison du [³H] Ro 25-6981 aux récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B dans le putamen, spécialement chez les patients ayant développé des dyskinésies (Calon et al., 2003). Parallèlement, la liaison du [³H] CGP39653 aux récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2A est demeurée inchangée (Calon et al., 2003). Des travaux menés sur des singes dyskinétiques induits par le MPTP ont corroboré ces résultats en montrant une augmentation des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B (Jourdain et al., 2015; Morin et al., 2013). De plus, l'administration de L-DOPA aux primates dyskinétiques a permis de restaurer les niveaux de GluN2A, GluN1 et GluN2B à des niveaux comparables à ceux des primates sains (Hallett et al., 2005). Il a été montré que le blocage de la sous-unité GluN2B peut réduire l'expression de la dyskinésie induite par la L-DOPA sans avoir d'effet sur son développement (Blanchet et al., 1999; Nutt et al., 2008; Rylander et al., 2010), et que la réduction des sous-unités GluN2A synaptique dans les stades précoces de la

MP peut réduire les problèmes moteurs ainsi qu'atténuer le développement de la dyskinésie (Gardoni et al., 2012). Ces études soulignent l'importance des récepteurs NMDA dans le développement et l'expression des dyskinésies.

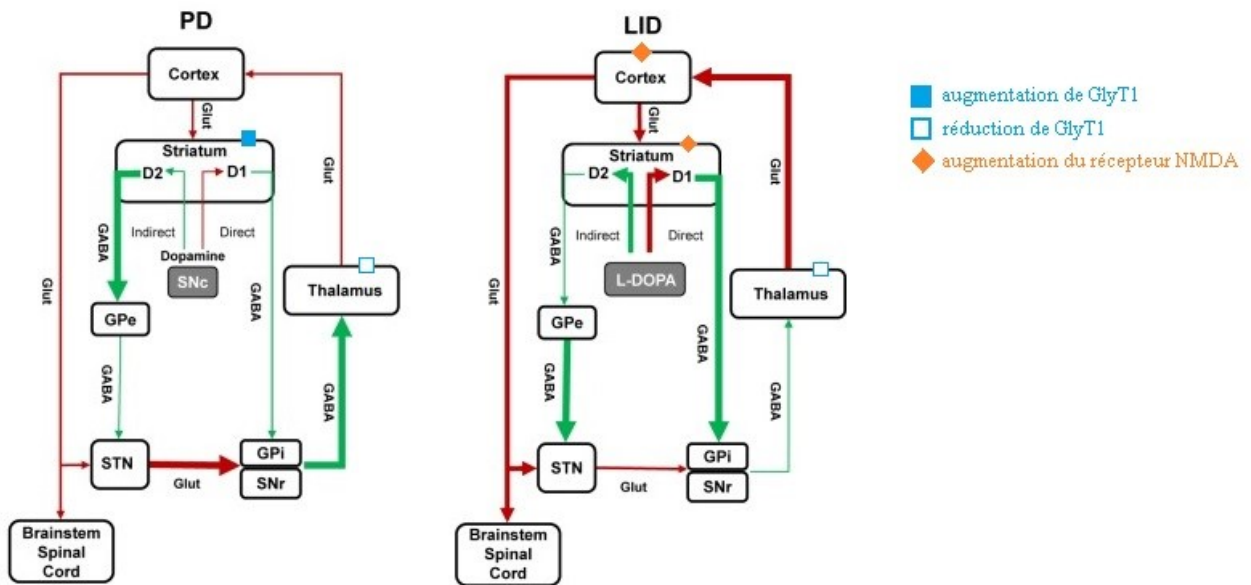


Figure 5 (modifiée): Niveaux de GlyT1 et NMDA dans la MP et la dyskinésie (Sharma et al., 2018).

Une étude autoradiographique a montré que le [^{18}F]ALX5407 se lie majoritairement au cervelet et au thalamus chez le rat (Hoffmann et al., 2021). Une étude de TEP a montré que l'administration du bitopertin inhibe principalement les GlyT1 du thalamus et du cervelet chez des sujets sains (Martin-Facklam et al., 2013). Cela laisse à croire que l'effet de ces deux inhibiteurs est plus fort au niveau du thalamus et du cervelet. En se penchant sur le modèle classique d'organisation des ganglions de la base, les connexions thalamo-corticales sont hypo-

actives dans la MP (Galvan et al., 2008). Ainsi, il est donc possible que l'inhibition de GlyT1 aux synapses thalamo-corticales puisse contrebalancer cet état, entraînant une amélioration des symptômes moteurs de la MP. Cependant, la dyskinésie montre une hyperactivation au niveau des synapses thalamo-corticales, ce qui va à l'encontre de notre hypothèse. Une étude a montré que la liaison de la glycine au site de glycine du récepteur NMDA amorce un processus de dépression des courants du récepteur NMDA, causant l'internalisation du récepteur lorsque ce dernier est activé (Nong et al., 2003). L'internalisation du récepteur NMDA ferait en sorte que les récepteurs soient retirés de la surface cellulaire et par conséquent seront empêchés d'être davantage activés par des ligands extracellulaires (Nong et al., 2003). Ainsi, la transmission glutamatergique serait atténuée au niveau de la synapse thalamo-corticale. L'inhibition de GlyT1 pourrait donc rétablir l'activité physiologique dans la boucle des ganglions de la base, faisant en sorte que nous pouvons obtenir simultanément un effet thérapeutique sur le parkinsonisme et la dyskinésie.

D'un autre côté, une étude a montré que le blocage du site à glycine du récepteur NMDA avec AV-101 pourrait également avoir un effet anti-dyskinétique chez des macaques lésés au MPTP (Bourque et al., 2022). En effet, le blocage du site GluN1 empêchera l'activation du récepteur NMDA et aura potentiellement un effet thérapeutique similaire à l'amantadine (Metman et al., 1999; Perez-Lloret et al., 2018). En revanche, l'amantadine est connu d'avoir un potentiel d'induire des hallucinations, ce qui limite son utilisation dans le cadre des dyskinésies (Kong et al., 2017; Wolf et al., 2010). Nous avons démontré auparavant que les niveaux de GlyT1 sont réduits dans le thalamus des rats lésés à la 6-OHDA et qui expriment des dyskinésies sévères (Figure 5, données non-publiées). Dans le cas de notre étude, l'inhibition des GlyT1 restants aura pour effet d'augmenter les niveaux de glycine disponible pour lier le site GluN1, ce qui

pourra potentiellement atteindre un niveau qui permettra l'internalisation du récepteur NMDA et par conséquent une réduction de l'activité excitatrice dans la voie thalamo-corticale (Wang et al., 2014). De plus, bitopertin et ALX-5407 ont montré un effet antiparkinsonien contrairement à AV-101, d'autres études chez des patients avec la MP traités avec D-sérine ou sarcosine supportent nos résultats (Gelfin et al., 2012). Il est à savoir que la dyskinésie est un phénomène fascinant et complexe. En effet, il est également possible qu'AV-101 et les inhibiteurs de GlyT1 ne réagissent pas dans les mêmes régions du cerveau et qu'ils puissent par conséquent normaliser la neurotransmission pour réduire les dyskinésies.

4.3. L'inhibition de GlyT1 comme cible thérapeutique de la psychose

Dans cette thèse, nous avons montré que l'inhibition de GlyT1 avec l'ALX5407 réduit les comportements de types psychotiques chez les ouistitis lésés au MPTP.

En clinique, les principaux traitements des psychoses de la MP sont la clozapine, la pimavansérine et la quétiapine, qui ciblent principalement le récepteur 5-HT_{2A} (Cummings et al., 2014a; Morgante et al., 2004; Parkinson Study Group, 1999). Chez le ouistiti lésé au MPTP, la clozapine (0,3 et 1 mg/kg) a réduit les comportements de type psychotique au pic de dose de 45% et 85%, respectivement (Visanji et al., 2006). Quant à la quétiapine à 4,5 mg/kg, elle a réduit les comportements de types psychotiques de 50% chez le ouistiti lésé au MPTP (Visanji et al., 2006). Au chapitre 4, l'ALX-5407 (0,1 et 1 mg/kg) a réduit la sévérité des comportements de types psychotiques de 46% comparativement à la L-DOPA, montrant ainsi un effet similaire à une faible dose de clozapine et à la quétiapine (Frouni et al., 2021a).

Il a été suggéré que l'administration de L-DOPA puisse induire la psychose chez les patients avec la MP en augmentant les niveaux de dopamine et induisant une hyperactivité dopaminergique dans le système mésolimbique (Goldman et al., 2014; Moskowitz et al., 1978b). Une importante voie glutamatergique descendante se projette des neurones pyramidaux corticaux vers les neurones dopaminergiques dans l'aire tegmentaire ventrale (Stahl, 2007). Les neurones glutamatergiques de cette voie agissent normalement comme un frein sur la voie dopaminergique mésolimbique (Stahl, 2007). Pour ce faire, ils communiquent avec les neurones dopaminergiques via des interneurons inhibiteurs dans l'aire tegmentaire ventrale, entraînant ainsi une inhibition tonique de la libération de dopamine par la voie mésolimbique (Stahl, 2007). En état de psychose, une hypoactivité des récepteurs NMDA est observée au niveau de la voie mésolimbique, ce qui expliquerait les effets secondaires d'amantadine comme antagoniste du récepteur NMDA (Kuzuhara, 2001). Ainsi, la stimulation du récepteur NMDA pourrait être une stratégie thérapeutique prometteuse pour réduire les symptômes de psychoses.

Dans une étude en double aveugle contre placebo chez 15 patients avec la MP, l'administration de sarcosine 2 g/jour a amélioré les symptômes psychiatriques sans aggraver les symptômes moteurs (Tsai et al., 2014). En effet, une amélioration significative a été observée au niveau de l'inventaire neuropsychiatrique (NPI), une échelle qui évalue 12 problèmes psychiatriques tels que les hallucinations, les délires et l'apathie, après 4 semaines de traitement (Cummings et al., 1994; Tsai et al., 2014). Il y a également eu une amélioration de l'échelle d'évaluation des pathologies comportementales de la maladie d'Alzheimer (BEH-AD) (Reisberg et al., 1997; Tsai et al., 2014), et plus précisément des hallucinations. Ainsi, l'inhibition de GlyT1 réduirait les symptômes psychotiques chez les patients avec la MP. D'autres études cliniques, avec de plus grandes cohortes, seront nécessaires pour mieux étudier les effets de cette cible.

Plusieurs études ont pris l'inhibition de GlyT1 comme cible dans le cadre de la schizophrénie (Bugarski-Kirola et al., 2017; Chaki et al., 2015; Lane et al., 2005; Lane et al., 2008; Rosenbrock et al., 2022). Dans une étude de phase III, le bitopertin à 30 mg/jour a induit une amélioration des symptômes positifs sur l'échelle des symptômes positifs et négatifs (PANSS), comme les idées délirantes, les hallucinations et la persécution (Bugarski-Kirola et al., 2017). Ces symptômes sont similaires à ceux améliorés par l'administration de sarcosine (Tsai et al., 2014). Ainsi, le bitopertin pourrait être une thérapie prometteuse contre les comportements de types psychotiques chez les patients avec la MP, et ce sans aggraver les symptômes moteurs tel qu'observé chez le rat dans le chapitre 3.

4.4. Considérations méthodologiques

Avec le test du cylindre, nous avons pu évaluer l'effet antiparkinsonien du bitopertin en monothérapie et en combinaison avec une faible dose de L-DOPA. La principale limitation avec cette méthode est l'apparition des mouvements involontaires anormaux AIMs, interférant ainsi avec les résultats. Pour éviter cette limitation, nous avons utilisé une faible dose de L-DOPA de 3 mg/kg, une dose qui selon la littérature n'induit pas d'AIMs (Frouni et al., 2019b; Kwan et al., 2020; Lundblad et al., 2002). Toutefois, plusieurs études ont rapporté que même avec une faible dose, il est possible d'observer des AIMs (Bastide et al., 2014; Putterman et al., 2007). Dans le cas de notre étude, certaines doses de bitopertin étaient plus susceptibles d'induire des AIMs pendant le test du cylindre, ce qui peut être expliqué par leur faible effet anti-dyskinétique comparativement aux doses efficaces. Une autre limitation du test est qu'il ne peut pas être répété à plusieurs reprises, pour éviter que le rat ne perde son intérêt à explorer

son environnement (Magno et al., 2019). Pour les animaux traités avec le bitopertin en combinaison de la L-DOPA, la sensibilité du test risquerait d'être compromise vu que les mêmes cylindres ont été utilisés pour les évaluations d'AIMs. Néanmoins, la sensibilité du test du cylindre chez les rats auxquels nous avons administré le bitopertin en monothérapie n'a pas été compromise car le test a été effectué à une fréquence d'une fois par semaine pendant 4 semaines seulement. Un autre inconvénient du test du cylindre est que certains animaux sont peu actifs pendant la période d'évaluation ce qui peut soit surestimer ou sous-estimer l'effet du traitement.

Une autre limitation dans notre étude est l'utilisation de rates uniquement. Nous avons choisi d'utiliser des femelles dans l'expérience car elles gardent un poids stable au fil du temps (Rina Massarelli, Charles River). Les rates Sprague Dawley ne montrent aucune différence avec les rats Sprague Dawley mâles quant à leur sensibilité à la L-DOPA ou la sévérité des AIMs dans les études sur les dyskinésies (Cenci et al., 2007). Vu que le bitopertin est lipophile, il risque de se distribuer davantage dans le gras chez les femelles en raison d'un plus grand pourcentage de gras dans leur corps comparativement aux mâles (Quirós Cognuck et al., 2020). Il est à noter qu'aucune différence n'a été observée au niveau de la pharmacocinétique du bitopertin entre les femmes et les hommes lors des études cliniques.

Pour ce qui est des ouistitis lésés au MPTP, l'utilisation de l'échelle des comportements de type psychotiques peut présenter un certain défi. En effet, les ouistitis traités avec de la L-DOPA présentent des mouvements répétitifs et exagérés qui diffèrent de la dyskinésie et du parkinsonisme, mais corrélerent avec des symptômes psychiatriques (Fox et al., 2010b; Kwan et al., 2021c). Cela inclut des mouvements rapides qui corrélerent avec l'hyperkinésie, le nettoyage

répétitif qui correspond à une activité compulsive, et des sauts répétitifs d'un côté de la cage à l'autre correspondant à des stéréotypies.

4.5. Perspectives et conclusion

La présente thèse a présenté des données qui ont atteint les objectifs énumérés précédemment.

Tout d'abord, le profil pharmacocinétique de l'inhibiteur de GlyT1 bitopertin après une administration sous-cutanée a été déterminé pour la première fois chez le rat. Ces données ont permis de choisir les doses à tester et de planifier les expériences comportementales tels que les AIMs et le test du cylindre, en fonction du profil pharmacocinétique. Deuxièmement, chez le rat lésé par la 6-OHDA, l'administration du bitopertin a significativement augmenté l'utilisation de la patte lésée, montrant un effet antiparkinsonien. De plus, le bitopertin a amélioré l'effet thérapeutique d'une faible dose de L-DOPA lorsqu'administré en concomitance. Ces données suggèrent que la combinaison du bitopertin avec une faible dose de L-DOPA permettrait d'atteindre des effets thérapeutiques supérieurs tout en évitant l'expression de la dyskinésie. Dans la même étude, le bitopertin a atténué le développement des dyskinésies au fil du temps, a réduit l'expression des dyskinésies établies après une première administration et n'a pas induit de tolérance à l'effet anti-dyskinétique après 4 semaines de traitement. De plus, chez le ouistiti lésé au MPTP, l'administration d'un autre inhibiteur de GlyT1, l'ALX-5407 a réduit la sévérité globale de la dyskinésie induite par la L-DOPA et des comportements de types psychotiques, et a amélioré l'effet thérapeutique global de la L-DOPA. Ces données sont en accord avec les résultats obtenus avec le bitopertin chez le modèle de rat.

Collectivement, les travaux présentés dans cette thèse suggèrent que l'efficacité antiparkinsonienne et anti-dyskinétique des deux molécules, le bitopertin et l'ALX-5407, est médiée par l'inhibition de GlyT1. Alors que ces études comportementales ont montré des preuves de l'efficacité des inhibiteurs de GlyT1, ils n'ont pas révélé les mécanismes sous-jacents à leurs effets. D'autres études sont nécessaires pour mieux caractériser le mécanisme d'action de l'inhibition de GlyT1 dans la MP. En effet, il serait pertinent d'évaluer la biodistribution de GlyT1 au niveau de la boucle cortex - ganglions de la base - thalamus - cortex ainsi que de quantifier les niveaux de GlyT1 chez des animaux sains, parkinsoniens et dyskinétiques, pour pouvoir discerner les régions clés impliquées dans l'effet thérapeutique observé dans cette étude. Cela pourrait aider à élucider l'occupation requise pour une efficacité clinique optimale. Jusqu'à présent, seules des études TEP impliquant des sujets sains ou des animaux sains ont été effectuées (Hoffmann et al., 2021; Martin-Facklam et al., 2013).

Cette nouvelle cible thérapeutique offre une perspective intéressante car des molécules comme le bitopertin ont déjà été testées cliniquement et validées pour leur innocuité chez l'humain (Bugarski-Kirola et al., 2016; Disc Medicine, 2022). Il existe donc un fort potentiel translationnel pour l'inhibition de GlyT1. Considérant que l'ALX-5407 n'a pas été validé pour une utilisation en clinique, il est nécessaire de refaire les études sur la psychose chez le ouistiti lésé au MPTP avec le bitopertin. Des études chroniques seront également nécessaires chez le ouistiti pour établir si les bénéfices antipsychotiques, anti-dyskinétiques et antiparkinsoniens conférés par l'inhibition de GlyT1 sont transitoires ou soutenus.

5. RÉFÉRENCES

- Aarsland, D., Marsh, L., & Schrag, A. (2009). Neuropsychiatric symptoms in Parkinson's disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 24(15), 2175-2186.
- Aboulghasemi, N., Jahromy, M. H., & Ghasemi, A. (2019). Anti-dyskinetic efficacy of 5-HT₃ receptor antagonist in the hemi-parkinsonian rat model. *IBRO reports*, 6, 40-44.
- Adams, R. H., Sato, K., Shimada, S., Tohyama, M., Puschel, A. W., & Betz, H. (1995). Gene structure and glial expression of the glycine transporter GlyT1 in embryonic and adult rodents. *Journal of Neuroscience*, 15(3), 2524-2532.
- Ahlskog, J. E., & Muentert, M. D. (2001). Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 16(3), 448-458.
- Ahmed, I., Bose, S. K., Pavese, N., Ramlackhansingh, A., Turkheimer, F., Hotton, G., . . . Brooks, D. (2011). Glutamate NMDA receptor dysregulation in Parkinson's disease with dyskinesias. *Brain*, 134(4), 979-986.
- Alberati, D., Moreau, J.-L., Lengyel, J., Hauser, N., Mory, R., Borroni, E., . . . Hainzl, D. (2012). Glycine reuptake inhibitor RG1678: a pharmacologic characterization of an investigational agent for the treatment of schizophrenia. *Neuropharmacology*, 62(2), 1152-1161.

- Alberico, S. L., Cassell, M. D., & Narayanan, N. S. (2015). The Vulnerable Ventral Tegmental Area in Parkinson's Disease. *Basal Ganglia*, 5(2-3), 51-55.
doi:10.1016/j.baga.2015.06.001
- Alvarez-Erviti, L., Rodriguez-Oroz, M. C., Cooper, J. M., Caballero, C., Ferrer, I., Obeso, J. A., & Schapira, A. H. (2010). Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains. *Archives of neurology*, 67(12), 1464-1472.
- Alvarez-Fischer, D., Guerreiro, S., Hunot, S., Saurini, F., Marien, M., Sokoloff, P., . . . Michel, P. P. (2008). Modelling Parkinson-like neurodegeneration via osmotic minipump delivery of MPTP and probenecid. *Journal of neurochemistry*, 107(3), 701-711.
- Alvir, J. M. J., Lieberman, J. A., Safferman, A. Z., Schwimmer, J. L., & Schaaf, J. A. (1993). Clozapine-induced agranulocytosis--incidence and risk factors in the United States. *New England Journal of Medicine*, 329(3), 162-167.
- Antonini, A., Chaudhuri, R. K., Martinez-Martin, P., & Odin, P. (2010). Oral and infusion levodopa-based strategies for managing motor complications in patients with Parkinson's disease. *CNS drugs*, 24, 119-129.
- Aragón, C., & López-Corcuera, B. (2003). Structure, function and regulation of glycine neurotransmitters. *European journal of pharmacology*, 479(1-3), 249-262.

- Archie, A., Persoons, P., & Vandenbulcke, M. (2013). The use of clozapine and levodopa for the treatment of persistent visual hallucinations and parkinsonism in Lewy body dementia. *Tijdschrift voor Psychiatrie*, 55(4), 287-291.
- Aroeira, R. I., Sebastião, A. M., & Valente, C. A. (2015). BDNF, via truncated TrkB receptor, modulates GlyT1 and GlyT2 in astrocytes. *Glia*, 63(12), 2181-2197.
- Athari, S. Z., Farajdokht, F., Sadigh-Eteghad, S., Mohajeri, D., Nourazar, M. A., & Mohaddes, G. (2022). Hydroxychloroquine attenuated motor impairment and oxidative stress in a rat 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *International Journal of Neuroscience*, 1-10.
- Atkinson, B., Bell, S., De Vivo, M., Kowalski, L., Lechner, S., Ognyanov, V., . . . Ashton, D. (2001). ALX 5407: a potent, selective inhibitor of the hGlyT1 glycine transporter. *Molecular pharmacology*, 60(6), 1414-1420.
- Ballanger, B., Klinger, H., Eche, J., Lerond, J., Vallet, A. E., Le Bars, D., . . . Thobois, S. (2012). Role of serotonergic 1A receptor dysfunction in depression associated with Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 27(1), 84-89.
- Ballard, C. G., Kreitzman, D. L., Isaacson, S., Liu, I. Y., Norton, J. C., Demos, G., . . . Stankovic, S. (2020). Long-term evaluation of open-label pimavanserin safety and tolerability in Parkinson's disease psychosis. *Parkinsonism Relat Disord*, 77, 100-106. doi:10.1016/j.parkreldis.2020.06.026

- Bankiewicz, K., Oldfield, E., Chiueh, C., Doppman, J., Jacobowitz, D., & Kopin, I. (1986). Hemiparkinsonism in monkeys after unilateral internal carotid artery infusion of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP). *Life sciences*, 39(1), 7-16.
- Barbour, R., Kling, K., Anderson, J. P., Banducci, K., Cole, T., Diep, L., . . . Seubert, P. (2008). Red blood cells are the major source of alpha-synuclein in blood. *Neurodegenerative diseases*, 5(2), 55-59.
- Barneoud, P., Parmentier, S., Mazadier, M., Miquet, J., Boireau, A., Dubedat, P., & Blanchard, J.-C. (1995). Effects of complete and partial lesions of the dopaminergic mesotelencephalic system on skilled forelimb use in the rat. *Neuroscience*, 67(4), 837-848.
- Barth, A., Schneider, J., Johnston, T., Hill, M., Brotchie, J., Moskal, J., & Cearley, C. N. (2020). NYX-458 Improves Cognitive Performance in a Primate Parkinson's Disease Model. *Movement Disorders*, 35(4), 640-649.
- Barthel, F., Urban, A., Schlösser, L., Eulenburg, V., Werdehausen, R., Brandenburger, T., . . . Hermanns, H. (2014). Long-term application of glycine transporter inhibitors acts antineuropathic and modulates spinal N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR-1 expression in rats. *Anesthesiology*, 121(1), 160-169.
- Bastide, M. F., Dovero, S., Charron, G., Porras, G., Gross, C. E., Fernagut, P.-O., & Bézard, E. (2014). Immediate-early gene expression in structures outside the basal ganglia is associated to l-DOPA-induced dyskinesia. *Neurobiology of disease*, 62, 179-192.

- Bauer, R. B., & McHenry, J. T. (1974). Comparison of amantadine, placebo, and levodopa in Parkinson's disease. *Neurology*, *24*(8), 715-715.
- Beaulieu-Boire, I., & Lang, A. E. (2015). Behavioral effects of levodopa. *Movement Disorders*, *30*(1), 90-102.
- Bedard, P., Di Paolo, T., Falardeau, P., & Boucher, R. (1986). Chronic treatment with L-DOPA, but not bromocriptine induces dyskinesia in MPTP-parkinsonian monkeys. Correlation with [3H] spiperone binding. *Brain research*, *379*(2), 294-299.
- Behl, T., Kumar, S., Althafar, Z. M., Sehgal, A., Singh, S., Sharma, N., . . . Al-Harrasi, A. (2022). Exploring the Role of Ubiquitin–Proteasome System in Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology*, *59*(7), 4257-4273.
- Bentea, E., Verbruggen, L., & Massie, A. (2017). The proteasome inhibition model of Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's disease*, *7*(1), 31-63.
- Berardelli, A., Rothwell, J. C., Thompson, P. D., & Hallett, M. (2001). Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson's disease. *Brain*, *124*(11), 2131-2146.
- Bergeron, R., Meyer, T. M., Coyle, J. T., & Greene, R. W. (1998). Modulation of N-methyl-D-aspartate receptor function by glycine transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(26), 15730-15734.
- Bergman, H., & Soares-Weiser, K. (2018). Anticholinergic medication for antipsychotic-induced tardive dyskinesia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*(1).
doi:<https://doi.org/10.1002/14651858.CD000204.pub2>

- Betarbet, R., Sherer, T. B., & Greenamyre, J. T. (2002). Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays*, 24(4), 308-318.
- Betz, H., Gomeza, J., Arnsen, W., & Scholze, P. (2006). Glycine transporters: essential regulators of synaptic transmission. *Biochemical Society Transactions*, 34(1), 55-58.
- Bezard, E., Dovero, S., Prunier, C., Ravenscroft, P., Chalon, S., Guilloteau, D., . . . Gross, C. E. (2001). Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*, 21(17), 6853-6861.
- Bezard, E., Pioli, E. Y., Li, Q., Girard, F., Mutel, V., Keywood, C., . . . Poli, S. M. (2014). The mGluR5 negative allosteric modulator dipraglurant reduces dyskinesia in the MPTP macaque model. *Movement Disorders*, 29(8), 1074-1079.
- Bhatia, K. P., Bain, P., Bajaj, N., Elble, R. J., Hallett, M., Louis, E. D., . . . Deuschl, G. (2018). Consensus Statement on the classification of tremors. from the task force on tremor of the International Parkinson and Movement Disorder Society. *Movement Disorders*, 33(1), 75-87.
- Biglan, K. M., Holloway, R. G., McDermott, M. P., Richard, I. H., & Investigators, P. S. G. C.-P. (2007). Risk factors for somnolence, edema, and hallucinations in early Parkinson disease. *Neurology*, 69(2), 187-195.

- Biondetti, E., Santin, M. D., Valabrègue, R., Mangone, G., Gaurav, R., Pyatigorskaya, N., . . . Habert, M.-O. (2021). The spatiotemporal changes in dopamine, neuromelanin and iron characterizing Parkinson's disease. *Brain, 144*(10), 3114-3125.
- Blanchet, P., Bedard, P., Britton, D., & Kebabian, J. (1993). Differential effect of selective D-1 and D-2 dopamine receptor agonists on levodopa-induced dyskinesia in 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-exposed monkeys. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 267*(1), 275-279.
- Blanchet, P., Grondin, R., & Bedard, P. (1996a). Dyskinesia and wearing-off following dopamine D1 agonist treatment in drug-naive 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-lesioned primates. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society, 11*(1), 91-94.
- Blanchet, P., Konitsiotis, S., Whittemore, E., Zhou, Z., Woodward, R., & Chase, T. (1999). Differing effects of N-methyl-D-aspartate receptor subtype selective antagonists on dyskinesias in levodopa-treated 1-methyl-4-phenyl-tetrahydropyridine monkeys. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 290*(3), 1034-1040.
- Blanchet, P. J., Konitsiotis, S., & Chase, T. N. (1998). Amantadine reduces levodopa-induced dyskinesias in parkinsonian monkeys. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society, 13*(5), 798-802.
- Blanchet, P. J., Metman, L. V., Mouradian, M. M., & Chase, T. N. (1996b). Acute pharmacologic blockade of dyskinesias in Parkinson's disease. *Mov Disord, 11*(5), 580-581. doi:10.1002/mds.870110516

- Blesa, J., Juri, C., Collantes, M., Peñuelas, I., Prieto, E., Iglesias, E., . . . Rodríguez-Oroz, M. C. (2010). Progression of dopaminergic depletion in a model of MPTP-induced Parkinsonism in non-human primates. An 18F-DOPA and 11C-DTBZ PET study. *Neurobiology of disease*, 38(3), 456-463.
- Boetsch, C., Parrott, N., Fowler, S., Poirier, A., Hainzl, D., Banken, L., . . . Hofmann, C. (2016). Effects of cytochrome P450 3A4 inhibitors—ketoconazole and erythromycin—on bitopertin pharmacokinetics and comparison with physiologically based modelling predictions. *Clinical pharmacokinetics*, 55(2), 237-247.
- Boileau, I., Warsh, J. J., Guttman, M., Saint-Cyr, J. A., McCluskey, T., Rusjan, P., . . . Kish, S. J. (2008). Elevated serotonin transporter binding in depressed patients with Parkinson's disease: a preliminary PET study with [11C] DASB. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 23(12), 1776-1780.
doi:<https://doi.org/10.1002/mds.22212>
- Bokobza, B., Ruberg, M., Scatton, B., Javoy-Agid, F., & Agid, Y. (1984). [3H] spiperone binding, dopamine and HVA concentrations in Parkinson's disease and supranuclear palsy. *European journal of pharmacology*, 99(2-3), 167-175.
- Bologna, M., Valls-Solè, J., Kamble, N., Pal, P. K., Conte, A., Guerra, A., . . . Berardelli, A. (2022). Dystonia, chorea, hemiballismus and other dyskinesias. *Clinical neurophysiology*, 140, 110-125.

Booth, H. D., Hirst, W. D., & Wade-Martins, R. (2017). The role of astrocyte dysfunction in Parkinson's disease pathogenesis. *Trends in neurosciences*, *40*(6), 358-370.

doi:<https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.04.001>

Boraud, T., Bezard, E., Bioulac, B., & Gross, C. E. (2001). Dopamine agonist-induced dyskinesias are correlated to both firing pattern and frequency alterations of pallidal neurones in the MPTP-treated monkey. *Brain*, *124*(3), 546-557.

Bordet, R., Ridray, S., Carboni, S., Diaz, J., Sokoloff, P., & Schwartz, J.-C. (1997). Induction of dopamine D3 receptor expression as a mechanism of behavioral sensitization to levodopa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(7), 3363-3367.

Borghain, R., Szasz, J., Stanzione, P., Meshram, C., Bhatt, M., Chirilineau, D., . . . Forrest, E. (2014). Randomized trial of safinamide add-on to levodopa in Parkinson's disease with motor fluctuations. *Movement Disorders*, *29*(2), 229-237.

Bortolanza, M., Cavalcanti-Kiwiatkoski, R., Padovan-Neto, F. E., da-Silva, C. A., Mitkovski, M., Raisman-Vozari, R., & Del-Bel, E. (2015). Glial activation is associated with l-DOPA induced dyskinesia and blocked by a nitric oxide synthase inhibitor in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, *73*, 377-387.

Bourque, M., Grégoire, L., Patel, W., Dickens, D., Snodgrass, R., & Di Paolo, T. (2022). AV-101, a Pro-Drug Antagonist at the NMDA Receptor Glycine Site, Reduces L-Dopa Induced Dyskinesias in MPTP Monkeys. *Cells*, *11*(22), 3530.

doi:<https://doi.org/10.3390/cells11223530>

- Brasnjo, G., & Otis, T. S. (2003). Glycine transporters not only take out the garbage, they recycle. *Neuron*, 40(4), 667-669.
- Breitinger, U., & Breitinger, H.-G. (2020). Modulators of the inhibitory glycine receptor. *ACS chemical neuroscience*, 11(12), 1706-1725.
doi:<https://doi.org/10.1021/acchemneuro.0c00054>
- Bröer, S., & Gether, U. (2012). The solute carrier 6 family of transporters. *British Journal of Pharmacology*, 167(2), 256-278.
- Brooks, D. J., Sagar, H., & Group, U.-I. E. S. (2003). Entacapone is beneficial in both fluctuating and non-fluctuating patients with Parkinson's disease: a randomised, placebo controlled, double blind, six month study. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 74(8), 1071-1079.
- Bugarski-Kirola, D., Blaettler, T., Arango, C., Fleischhacker, W. W., Garibaldi, G., Wang, A., . . . Lawrie, S. (2017). Bitopertin in negative symptoms of schizophrenia—results from the phase III FlashLyte and DayLyte studies. *Biological psychiatry*, 82(1), 8-16.
- Bugarski-Kirola, D., Iwata, N., Sameļjak, S., Reid, C., Blaettler, T., Millar, L., . . . Kapur, S. (2016). Efficacy and safety of adjunctive bitopertin versus placebo in patients with suboptimally controlled symptoms of schizophrenia treated with antipsychotics: results from three phase 3, randomised, double-blind, parallel-group, placebo-controlled, multicentre studies in the SearchLyte clinical trial programme. *The Lancet Psychiatry*, 3(12), 1115-1128.

- Bugarski-Kirola, D., Wang, A., Abi-Saab, D., & Blattler, T. (2014). A phase II/III trial of bitopertin monotherapy compared with placebo in patients with an acute exacerbation of schizophrenia—results from the CandleLyte study. *European Neuropsychopharmacology*, *24*(7), 1024-1036.
- Buongiorno, M., Antonelli, F., Cámara, A., Puente, V., de Fabregues-Nebot, O., Hernandez-Vara, J., . . . Valldeoriola, F. (2015). Long-term response to continuous duodenal infusion of levodopa/carbidopa gel in patients with advanced Parkinson disease: the Barcelona registry. *Parkinsonism and related disorders*, *21*(8), 871-876.
- Caccia, C., Maj, R., Calabresi, M., Maestroni, S., Faravelli, L., Curatolo, L., . . . Fariello, R. (2006). Safinamide: from molecular targets to a new anti-Parkinson drug. *Neurology*, *67*(7 suppl 2), S18-S23.
- Calon, F., Rajput, A. H., Hornykiewicz, O., Bédard, P. J., & Di Paolo, T. (2003). Levodopa-induced motor complications are associated with alterations of glutamate receptors in Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, *14*(3), 404-416.
- Carbone, F., Djamshidian, A., Seppi, K., & Poewe, W. (2019). Apomorphine for Parkinson's disease: efficacy and safety of current and new formulations. *CNS drugs*, *33*(9), 905-918.
- Carr, J. (2002). Tremor in Parkinson's disease. *Parkinsonism and related disorders*, *8*(4), 223-234.

Carta, M., & Bjorklund, A. (2018). The serotonergic system in L-DOPA-induced dyskinesia: Pre-clinical evidence and clinical perspective. *Journal of Neural Transmission*, *125*, 1195-1202.

Celesia, G. G., & Barr, A. N. (1970). Psychosis and Other Psychiatric Manifestations of Levodopa Therapy. *Archives of Neurology*, *23*(3), 193-200.
doi:10.1001/archneur.1970.00480270003001

Cenci, M. A., & Lundblad, M. (2007). Ratings of L-DOPA-induced dyskinesia in the unilateral 6-OHDA lesion model of Parkinson's disease in rats and mice. *Current protocols in Neuroscience*, *41*(1), 9.25. 21-29.25. 23.

Cereda, E., Cilia, R., Canesi, M., Tesei, S., Mariani, C. B., Zecchinelli, A. L., & Pezzoli, G. (2017). Efficacy of rasagiline and selegiline in Parkinson's disease: a head-to-head 3-year retrospective case-control study. *Journal of neurology*, *264*(6), 1254-1263.

Chaki, S., Shimazaki, T., Karasawa, J.-i., Aoki, T., Kaku, A., Iijima, M., . . . Shibata, T. (2015). Efficacy of a glycine transporter 1 inhibitor TASP0315003 in animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia. *Psychopharmacology*, *232*, 2849-2861.

Chalphin, A. V., & Saha, M. S. (2010). The specification of glycinergic neurons and the role of glycinergic transmission in development. *Frontiers in molecular neuroscience*, *11*.

Chang, A., & Fox, S. H. (2016). Psychosis in Parkinson's disease: epidemiology, pathophysiology, and management. *Drugs*, *76*, 1093-1118.

- Chase, T. N., & Oh, J. D. (2000). Striatal dopamine-and glutamate-mediated dysregulation in experimental parkinsonism. *Trends in neurosciences*, 23, S86-S91.
- Chaudhuri, K. R., Healy, D. G., & Schapira, A. H. (2006). Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *The Lancet Neurology*, 5(3), 235-245.
- Chen, W. W., Zhang, X., & Huang, W. J. (2016). Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Molecular medicine reports*, 13(4), 3391-3396.
- Choi, D. W., Maulucci-Gedde, M., & Kriegstein, A. R. (1987). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *Journal of Neuroscience*, 7(2), 357-368.
- Choudhury, G. R., & Daadi, M. M. (2018). Charting the onset of Parkinson-like motor and non-motor symptoms in nonhuman primate model of Parkinson's disease. *PloS one*, 13(8), e0202770.
- Clarke, C. E., Cooper, J. A., Holdich, T. A., & Group, T. S. (2001). A randomized, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose tolerability and safety study of remacemide as adjuvant therapy in Parkinson's disease with response fluctuations. *Clin Neuropharmacol*, 24(3), 133-138. doi:10.1097/00002826-200105000-00003
- Creese, I., Burt, D. R., & Snyder, S. H. (1977). Dopamine receptor binding enhancement accompanies lesion-induced behavioral supersensitivity. *Science*, 197(4303), 596-598.
- Cubelos, B., Giménez, C., & Zafra, F. (2005). Localization of the GLYT1 glycine transporter at glutamatergic synapses in the rat brain. *Cerebral cortex*, 15(4), 448-459.

- Cubelos, B., Leite, C., Giménez, C., & Zafra, F. (2014). Localization of the glycine transporter GLYT1 in glutamatergic synaptic vesicles. *Neurochemistry international*, 73, 204-210.
- Cummings, J., Isaacson, S., Mills, R., Williams, H., Chi-Burris, K., Corbett, A., . . . Ballard, C. (2014a). Pimavanserin for patients with Parkinson's disease psychosis: a randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet*, 383(9916), 533-540.
- Cummings, J., Isaacson, S., Mills, R., Williams, H., Chi-Burris, K., Corbett, A., . . . Ballard, C. (2014b). Pimavanserin for patients with Parkinson's disease psychosis: a randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet*, 383(9916), 533-540. doi:10.1016/s0140-6736(13)62106-6
- Cummings, J. L., Mega, M., Gray, K., Rosenberg-Thompson, S., Carusi, D. A., & Gornbein, J. (1994). The Neuropsychiatric Inventory: comprehensive assessment of psychopathology in dementia. *Neurology*, 44(12), 2308-2308.
- Dallos, V., Heathfield, K., Stone, P., & Allen, F. (1970). Use of amantadine in Parkinson's disease. Results of a double-blind trial. *Br Med J*, 4(5726), 24-26.
- Darmopil, S., Martín, A. B., De Diego, I. R., Ares, S., & Moratalla, R. (2009). Genetic inactivation of dopamine D1 but not D2 receptors inhibits L-DOPA-induced dyskinesia and histone activation. *Biological psychiatry*, 66(6), 603-613.
- de la Riva, P., Smith, K., Xie, S. X., & Weintraub, D. (2014). Course of psychiatric symptoms and global cognition in early Parkinson disease. *Neurology*, 83(12), 1096-1103.

- de Lau, L. M., Verbaan, D., Marinus, J., & van Hilten, J. J. (2014). Survival in Parkinson's disease. Relation with motor and non-motor features. *Parkinsonism and related disorders*, *20*(6), 613-616.
- Dekundy, A., Lundblad, M., Danysz, W., & Cenci, M. A. (2007). Modulation of L-DOPA-induced abnormal involuntary movements by clinically tested compounds: further validation of the rat dyskinesia model. *Behavioural brain research*, *179*(1), 76-89.
- Del Dotto, P., Pavese, N., Gambaccini, G., Bernardini, S., Metman, L. V., Chase, T. N., & Bonuccelli, U. (2001). Intravenous amantadine improves levodopa-induced dyskinesias: an acute double-blind placebo-controlled study. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, *16*(3), 515-520.
- DeLong, M. R. (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in neurosciences*, *13*(7), 281-285.
- Deng, Y.-P., Lei, W.-L., & Reiner, A. (2006). Differential perikaryal localization in rats of D1 and D2 dopamine receptors on striatal projection neuron types identified by retrograde labeling. *Journal of chemical neuroanatomy*, *32*(2-4), 101-116.
- Depoortère, R., Dargazanli, G., Estenne-Bouhtou, G., Coste, A., Lanneau, C., Desvignes, C., . . . Decobert, M. (2005). Neurochemical, electrophysiological and pharmacological profiles of the selective inhibitor of the glycine transporter-1 SSR504734, a potential new type of antipsychotic. *Neuropsychopharmacology*, *30*(11), 1963-1985.

- Deumens, R., Blokland, A., & Prickaerts, J. (2002). Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Experimental neurology*, *175*(2), 303-317.
- Dhall, R., & Kreitzman, D. L. (2016). Advances in levodopa therapy for Parkinson disease: review of RYTARY (carbidopa and levodopa) clinical efficacy and safety. *Neurology*, *86*(14 Supplement 1), S13-S24.
- Di Maio, R., Barrett, P. J., Hoffman, E. K., Barrett, C. W., Zharikov, A., Borah, A., . . . Burton, E. A. (2016). α -Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. *Science translational medicine*, *8*(342), 342ra378-342ra378.
- Di Monte, D. A., McCormack, A., Petzinger, G., Janson, A. M., Quik, M., & Langston, W. (2000). Relationship among nigrostriatal denervation, parkinsonism, and dyskinesias in the MPTP primate model. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, *15*(3), 459-466.
- Diederich, N. J., Goetz, C. G., Raman, R., Pappert, E. J., Leurgans, S., & Piery, V. (1998). Poor visual discrimination and visual hallucinations in Parkinson's disease. *Clinical neuropharmacology*, *21*(5), 289-295.
- Ding, Y. M., Jaumotte, J. D., Signore, A. P., & Zigmond, M. J. (2004). Effects of 6-hydroxydopamine on primary cultures of substantia nigra: specific damage to dopamine neurons and the impact of glial cell line-derived neurotrophic factor. *Journal of neurochemistry*, *89*(3), 776-787.

Disc Medicine, I. (2022). Study of Bitopertin to Evaluate the Safety, Tolerability, Efficacy, and PPIX Concentrations in Participants With EPP. In:

<https://ClinicalTrials.gov/show/NCT05308472>.

Durif, F., Debilly, B., Galitzky, M., Morand, D., Viallet, F., Borg, M., . . . Rascol, O. (2004). Clozapine improves dyskinesias in Parkinson disease: a double-blind, placebo-controlled study. *Neurology*, *62*(3), 381-388.

Durif, F., Vidailhet, M., Bonnet, A., Blin, J., & Agid, Y. (1995). Levodopa-induced dyskinesias are improved by fluoxetine. *Neurology*, *45*(10), 1855-1858.

Encarnacion, E. V., & Hauser, R. A. (2008). Levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: etiology, impact on quality of life, and treatments. *European neurology*, *60*(2), 57-66.

Espay, A. J., LeWitt, P. A., & Kaufmann, H. (2014). Norepinephrine deficiency in Parkinson's disease: the case for noradrenergic enhancement. *Movement Disorders*, *29*(14), 1710-1719.

Espay, A. J., Morgante, F., Merola, A., Fasano, A., Marsili, L., Fox, S. H., . . . Lang, A. E. (2018). Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson disease: current and evolving concepts. *Annals of neurology*, *84*(6), 797-811.

Eulenburg, V., Armsen, W., Betz, H., & Gomeza, J. (2005). Glycine transporters: essential regulators of neurotransmission. *Trends in biochemical sciences*, *30*(6), 325-333.

- Eulenburg, V., & Gomeza, J. (2010). Neurotransmitter transporters expressed in glial cells as regulators of synapse function. *Brain research reviews*, 63(1-2), 103-112.
- Fabbrini, A., & Guerra, A. (2021). Pathophysiological mechanisms and experimental pharmacotherapy for L-Dopa-induced dyskinesia. *Journal of Experimental Pharmacology*, 469-485. doi:<https://doi.org/10.2147/JEP.S265282>
- Fabbrini, G., Brotchie, J. M., Grandas, F., Nomoto, M., & Goetz, C. G. (2007). Levodopa-induced dyskinesias. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 22(10), 1379-1389.
- Factor, S. A., Molho, E. S., Podskalny, G. D., & Brown, D. (1995). Parkinson's disease: drug-induced psychiatric states. *Adv Neurol*, 65, 115-138.
- Factor, S. A., Scullin, M. K., Sollinger, A. B., Land, J. O., Wood-Siverio, C., Zanders, L., . . . Goldstein, F. C. (2014). Cognitive correlates of hallucinations and delusions in Parkinson's disease. *Journal of the neurological sciences*, 347(1-2), 316-321.
- Faull, R., & Lavery, R. (1969). Changes in dopamine levels in the corpus striatum following lesions in the substantia nigra. *Experimental neurology*, 23(3), 332-340.
- Fénelon, G. (2008). Psychosis in Parkinson's disease: phenomenology, frequency, risk factors, and current understanding of pathophysiologic mechanisms. *CNS spectrums*, 13(S4), 18-25.
- Fénelon, G., Mahieux, F., Huon, R., & Ziegler, M. (2000). Hallucinations in Parkinson's disease: prevalence, phenomenology and risk factors. *Brain*, 123(4), 733-745.

- Fénelon, G., Soulas, T., De Langavant, L. C., Trinkler, I., & Bachoud-Lévi, A.-C. (2011). Feeling of presence in Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 82(11), 1219-1224.
- Fénelon, G., Soulas, T., Zenasni, F., & De Langavant, L. C. (2010). The changing face of Parkinson's disease-associated psychosis: a cross-sectional study based on the new NINDS-NIMH criteria. *Movement Disorders*, 25(6), 763-766.
- Fénelon, G., Thobois, S., Bonnet, A.-M., Broussolle, E., & Tison, F. (2002). Tactile hallucinations in Parkinson's disease. *Journal of neurology*, 249(12).
- Fernandez, H., & Odin, P. (2011). Levodopa–carbidopa intestinal gel for treatment of advanced Parkinson’s disease. *Current medical research opinion*, 27(5), 907-919.
- Fernandez, H. H., Friedman, J. H., Jacques, C., & Rosenfeld, M. (1999). Quetiapine for the treatment of drug-induced psychosis in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 14(3), 484-487. doi:10.1002/1531-8257(199905)14:3<484::aid-mds1016>3.0.co;2-b
- Fernandez, H. H., Wu, C.-K., & Ott, B. R. (2003). Pharmacotherapy of dementia with Lewy bodies. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 4(11), 2027-2037.
doi:<https://doi.org/10.1517/14656566.4.11.2027>
- Ferrucci, M., & Fornai, F. (2021). MPTP neurotoxicity: actions, mechanisms, and animal modeling of Parkinson’s disease. In *Handbook of Neurotoxicity* (pp. 1-41): Springer.

- Ffytche, D. H., Creese, B., Politis, M., Chaudhuri, K. R., Weintraub, D., Ballard, C., & Aarsland, D. (2017). The psychosis spectrum in Parkinson disease. *Nature Reviews Neurology*, *13*(2), 81-95.
- Fornai, F., Schlüter, O. M., Lenzi, P., Gesi, M., Ruffoli, R., Ferrucci, M., . . . Battaglia, G. (2005). Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and α -synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(9), 3413-3418.
- Forno, L., DeLanney, L., Irwin, I., & Langston, J. (1993). Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonism and Parkinson's disease. Neuropathologic considerations. *Advances in neurology*, *60*, 600-608.
- Forsaa, E. B., Larsen, J. P., Wentzel-Larsen, T., Goetz, C. G., Stebbins, G. T., Aarsland, D., & Alves, G. (2010). A 12-year population-based study of psychosis in Parkinson disease. *Archives of neurology*, *67*(8), 996-1001.
- Fox, S. H., & Brotchie, J. M. (2010a). The MPTP-lesioned non-human primate models of Parkinson's disease. Past, present, and future. *Progress in brain research*, *184*, 133-157.
- Fox, S. H., Katzenschlager, R., Lim, S. Y., Ravina, B., Seppi, K., Coelho, M., . . . Sampaio, C. (2011). The Movement Disorder Society evidence-based medicine review update: treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease. *Movement Disorders*, *26*(S3), S2-S41.

- Fox, S. H., & Lang, A. E. (2008). Levodopa-related motor complications—Phenomenology. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 23(S3), S509-S514.
- Fox, S. H., Metman, L. V., Nutt, J. G., Brodsky, M., Factor, S. A., Lang, A. E., . . . Siffert, J. (2017). Trial of dextromethorphan/quinidine to treat levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 32(6), 893-903. doi:10.1002/mds.26976
- Fox, S. H., Visanji, N., Reyes, G., Huot, P., Gomez-Ramirez, J., Johnston, T., & Brotchie, J. M. (2010b). Neuropsychiatric behaviors in the MPTP marmoset model of Parkinson's disease. *Canadian journal of neurological sciences*, 37(1), 86-95.
- Fox, S. H., Visanji, N. P., Johnston, T. H., Gomez-Ramirez, J., Voon, V., & Brotchie, J. M. (2006). Dopamine receptor agonists and levodopa and inducing psychosis-like behavior in the MPTP primate model of Parkinson disease. *Archives of neurology*, 63(9), 1343-1344.
- Frankel, J., Lees, A., Kempster, P., & Stern, G. (1990). Subcutaneous apomorphine in the treatment of Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 53(2), 96-101.
- French Clozapine Parkinson Study Group. (1999). Clozapine in drug-induced psychosis in Parkinson's disease. The French Clozapine Parkinson Study Group. *Lancet*, 353(9169), 2041-2042.

- Frouni, I., Belliveau, S., Maddaford, S., Nuara, S. G., Gourdon, J. C., & Huot, P. (2021a). Effect of the glycine transporter 1 inhibitor ALX-5407 on dyskinesia, psychosis-like behaviours and parkinsonism in the MPTP-lesioned marmoset. *European journal of pharmacology*, *910*, 174452.
- Frouni, I., Hamadjida, A., Kwan, C., Bedard, D., Nafade, V., Gaudette, F., . . . Huot, P. (2019a). Activation of mGlu2/3 receptors, a novel therapeutic approach to alleviate dyskinesia and psychosis in experimental parkinsonism. *Neuropharmacology*, *158*, 1-11. doi:<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107725>
- Frouni, I., Kwan, C., Bédard, D., Belliveau, S., Bourgeois-Cayer, E., Gaudette, F., . . . Huot, P. (2019b). Effect of the selective 5-HT 2A receptor antagonist EMD-281,014 on l-DOPA-induced abnormal involuntary movements in the 6-OHDA-lesioned rat. *Experimental brain research*, *237*, 29-36.
- Frouni, I., Kwan, C., Bédard, D., Kang, W., Hamadjida, A., Nuara, S. G., . . . Huot, P. (2023). Effect of the mGlu4 positive allosteric modulator ADX-88178 on parkinsonism, psychosis-like behaviours and dyskinesia in the MPTP-lesioned marmoset. *Psychopharmacology*, 1-7.
- Frouni, I., Kwan, C., Nuara, S. G., Belliveau, S., Kang, W., Hamadjida, A., . . . Huot, P. (2021b). Effect of the mGlu 2 positive allosteric modulator CBiPES on dyskinesia, psychosis-like behaviours and parkinsonism in the MPTP-lesioned marmoset. *Journal of Neural Transmission*, *128*, 73-81.

- Gagnon, D., Petryszyn, S., Sanchez, M., Bories, C., Beaulieu, J., De Koninck, Y., . . . Parent, M. (2017). Striatal neurons expressing D1 and D2 receptors are morphologically distinct and differently affected by dopamine denervation in mice. *Scientific Reports*, 7(1), 41432.
- Gainetdinov, R. R., Fumagalli, F., Jones, S. R., & Caron, M. G. (1997). Dopamine transporter is required for in vivo MPTP neurotoxicity: evidence from mice lacking the transporter. *Journal of neurochemistry*, 69(3), 1322-1325.
- Galli, A., Mori, F., Bargellini, M., & Coppini, L. (1993). Sodium-dependent release of exogenous glycine from preloaded rat hippocampal synaptosomes. *Journal of Neural Transmission/General Section JNT*, 93, 167-179.
- Galvan, A., & Wichmann, T. (2008). Pathophysiology of parkinsonism. *Clinical neurophysiology*, 119(7), 1459-1474.
- Gandhi, S., Vaarmann, A., Yao, Z., Duchon, M. R., Wood, N. W., & Abramov, A. Y. (2012). Dopamine induced neurodegeneration in a PINK1 model of Parkinson's disease. *PloS one*, 7(5), e37564.
- Gardoni, F., Sgobio, C., Pendolino, V., Calabresi, P., Di Luca, M., & Picconi, B. (2012). Targeting NR2A-containing NMDA receptors reduces L-DOPA-induced dyskinesias. *Neurobiology of aging*, 33(9), 2138-2144.

- Ge, P., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2020). PINK1 and Parkin mitochondrial quality control: A source of regional vulnerability in Parkinson's disease. *Molecular neurodegeneration*, *15*, 1-18.
- Gee, P., & Davison, A. J. (1989). Intermediates in the aerobic autoxidation of 6-hydroxydopamine: relative importance under different reaction conditions. *Free Radical Biology and Medicine*, *6*(3), 271-284.
- Gelfin, E., Kaufman, Y., Korn-Lubetzki, I., Bloch, B., Kremer, I., Javitt, D. C., & Heresco-Levy, U. (2012). D-serine adjuvant treatment alleviates behavioural and motor symptoms in Parkinson's disease. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, *15*(4), 543-549.
- Giovanni, A., Sieber, B.-A., Heikkila, R. E., & Sonsalla, P. K. (1994). Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine. Part 1: Systemic administration. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *270*(3), 1000-1007.
- Glinka, Y., Gassen, M., & Youdim, M. (1997). Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. In P. Riederer, D. B. Calne, R. Horowski, Y. Mizuno, W. Poewe, & M. B. H. Youdim (Eds.), *Advances in Research on Neurodegeneration* (Vol. 5, pp. 55-66): Springer Vienna.
- Glinka, Y., Tipton, K., & Youdim, M. (1996). Nature of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-hydroxydopamine. *Journal of neurochemistry*, *66*(5), 2004-2010.

- Goedert, M., Spillantini, M. G., Del Tredici, K., & Braak, H. (2013). 100 years of Lewy pathology. *Nature Reviews Neurology*, 9(1), 13-24.
- Goetz, C. G. (1998). Influence of COMT inhibition on levodopa pharmacology and therapy. *Neurology*, 50(5 Suppl 5), S26-S30.
- Goetz, C. G., Poewe, W., Rascol, O., & Sampaio, C. (2005). Evidence-based medical review update: pharmacological and surgical treatments of Parkinson's disease: 2001 to 2004. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 20(5), 523-539.
- Goetz, C. G., Tanner, C. M., & Klawans, H. L. (1982a). Pharmacology of hallucinations induced by long-term drug therapy. *Am J Psychiatry*, 139(4), 494-497.
doi:10.1176/ajp.139.4.494
- Goetz, C. G., Tanner, C. M., & Klawans, H. L. (1982b). Pharmacology of hallucinations induced by long-term drug therapy. *American Journal of Psychiatry*, 139(4), 494-497.
doi:<https://psycnet.apa.org/doi/10.1176/ajp.139.4.494>
- Goldman, J. G., Goetz, C. G., Brandabur, M., Sanfilippo, M., & Stebbins, G. T. (2008). Effects of dopaminergic medications on psychosis and motor function in dementia with Lewy bodies. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 23(15), 2248-2250. doi:<https://doi.org/10.1002/mds.22322>
- Goldman, J. G., & Holden, S. (2014). Treatment of psychosis and dementia in Parkinson's disease. *Current treatment options in neurology*, 16, 1-18.

- Gomez, G., Escande, M. V., Suarez, L., Rela, L., Belforte, J. E., Moratalla, R., . . . Taravini, I. R. E. (2019). Changes in dendritic spine density and inhibitory perisomatic connectivity onto medium spiny neurons in L-Dopa-induced dyskinesia. *Molecular Neurobiology*, 56, 6261-6275. doi:<https://doi.org/10.1007/s12035-019-1515-4>
- Gomez, J., Hülsmann, S., Ohno, K., Eulenburg, V., Szöke, K., Richter, D., & Betz, H. (2003). Inactivation of the glycine transporter 1 gene discloses vital role of glial glycine uptake in glycinergic inhibition. *Neuron*, 40(4), 785-796.
- Goodman, W. K., Storch, E. A., & Sheth, S. A. (2021). Harmonizing the neurobiology and treatment of obsessive-compulsive disorder. *American Journal of Psychiatry*, 178(1), 17-29.
- Graham, W., Sambrook, M., & Crossman, A. (1993). Differential effect of chronic dopaminergic treatment on dopamine D1 and D2 receptors in the monkey brain in MPTP-induced parkinsonism. *Brain research*, 602(2), 290-303.
- Greenberg, W. M., Benedict, M. M., Doerfer, J., Perrin, M., Panek, L., Cleveland, W. L., & Javitt, D. C. (2009). Adjunctive glycine in the treatment of obsessive-compulsive disorder in adults. *Journal of psychiatric research*, 43(6), 664-670.
- Grégoire, L., Jourdain, V. A., Townsend, M., Roach, A., & Di Paolo, T. (2013). Safinamide reduces dyskinesias and prolongs L-DOPA antiparkinsonian effect in parkinsonian monkeys. *Parkinsonism and related disorders*, 19(5), 508-514.

- Grigoriadis, N., Grigoriadis, S., Polyzoidou, E., Milonas, I., & Karussis, D. (2006). Neuroinflammation in multiple sclerosis: evidence for autoimmune dysregulation, not simple autoimmune reaction. *Clinical neurology neurosurgery*, *108*(3), 241-244.
- Grillner, S., Ekeberg, Ö., El Manira, A., Lansner, A., Parker, D., Tegner, J., & Wallen, P. (1998). Intrinsic function of a neuronal network—a vertebrate central pattern generator. *Brain research reviews*, *26*(2-3), 184-197.
- Guastella, J., Brecha, N., Weigmann, C., Lester, H. A., & Davidson, N. (1992). Cloning, expression, and localization of a rat brain high-affinity glycine transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *89*(15), 7189-7193.
- Guigoni, C., Doudnikoff, E., Li, Q., Bloch, B., & Bezard, E. (2007). Altered D1 dopamine receptor trafficking in parkinsonian and dyskinetic non-human primates. *Neurobiology of disease*, *26*(2), 452-463.
- Guigoni, C., Dovero, S., Aubert, I., Li, Q., Bioulac, B. H., Bloch, B., . . . Bezard, E. (2005). Levodopa-induced dyskinesia in MPTP-treated macaques is not dependent on the extent and pattern of nigrostriatal lesioning. *European Journal of Neuroscience*, *22*(1), 283-287.
- Hallett, P. J., Dunah, A., Ravenscroft, P., Zhou, S., Bezard, E., Crossman, A. R., . . . Standaert, D. G. (2005). Alterations of striatal NMDA receptor subunits associated with the development of dyskinesia in the MPTP-lesioned primate model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*, *48*(4), 503-516.

- Hamadjida, A., Sid-Otmane, L., Kwan, C., Frouni, I., Nafade, V., Bédard, D., . . . Philippe, H. (2020). The highly selective mGlu2 receptor positive allosteric modulator LY-487,379 alleviates l-DOPA-induced dyskinesia in the 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience*, *51*(12), 2412-2422.
- Han, M., Groesbeck, M., Sakmar, T. P., & Smith, S. O. (1997). The C9 methyl group of retinal interacts with glycine-121 in rhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(25), 13442-13447.
- Harding, A., Broe, G., & Halliday, G. (2002). Visual hallucinations in Lewy body disease relate to Lewy bodies in the temporal lobe. *Brain*, *125*(2), 391-403.
doi:<https://doi.org/10.1093/brain/awf033>
- Hauser, R. A., Pahwa, R., Tanner, C. M., Oertel, W., Isaacson, S. H., Johnson, R., . . . Stempien, M. J. (2017). ADS-5102 (amantadine) extended-release capsules for levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease (EASE LID 2 study): interim results of an open-label safety study. *Journal of Parkinson's disease*, *7*(3), 511-522.
- He, Y., Appel, S., & Le, W. (2001). Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. *Brain research*, *909*(1-2), 187-193.
- Hefti, F., Melamed, E., Sahakian, B. J., & Wurtman, R. J. (1980). Circling behavior in rats with partial, unilateral nigro-striatal lesions: effect of amphetamine, apomorphine, and DOPA. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *12*(2), 185-188.

Heiman, M., Heilbut, A., Francardo, V., Kulicke, R., Fenster, R. J., Kolaczyk, E. D., . . .

Greengard, P. (2014). Molecular adaptations of striatal spiny projection neurons during levodopa-induced dyskinesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(12), 4578-4583.

Hely, M. A., Reid, W. G., Adena, M. A., Halliday, G. M., & Morris, J. G. (2008). The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: the inevitability of dementia at 20 years. *Movement Disorders*, *23*(6), 837-844.

Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., . . . Ransohoff, R. M. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, *14*(4), 388-405.

Herdon, H. J., Roberts, J. C., Coulton, S., & Porter, R. A. (2010). Pharmacological characterisation of the GlyT-1 glycine transporter using two novel radioligands. *Neuropharmacology*, *59*(6), 558-565.

Heresco-Levy, U., Ermilov, M., Lichtenberg, P., Bar, G., & Javitt, D. C. (2004). High-dose glycine added to olanzapine and risperidone for the treatment of schizophrenia. *Biological psychiatry*, *55*(2), 165-171.

Heresco-Levy, U., Javitt, D. C., Ebstein, R., Vass, A., Lichtenberg, P., Bar, G., . . . Ermilov, M. (2005). D-serine efficacy as add-on pharmacotherapy to risperidone and olanzapine for treatment-refractory schizophrenia. *Biological psychiatry*, *57*(6), 577-585.

Herve, D., Rogard, M., & Le, M. (1995). Molecular analysis of the multiple Golf α subunit mRNAs in the rat brain. *Molecular brain research*, 32(1), 125-134.

Hess, C. W., & Hallett, M. (2017). The phenomenology of Parkinson's disease. *Seminars in neurology*, 37(02), 109-117. doi:<https://doi.org/10.1055%2Fs-0037-1601869>

Hirsch, E. C., Vyas, S., & Hunot, S. (2012). Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism and related disorders*, 18, S210-S212.

Hoffmann, C., Evcüman, S., Neumaier, F., Zlatopolskiy, B. D., Humpert, S., Bier, D., . . . Neumaier, B. (2021). [18F] ALX5406: A Brain-Penetrating Prodrug for GlyT1-Specific PET Imaging. *ACS chemical neuroscience*, 12(18), 3335-3346.

Hofmann, C., Pizzagalli, F., Boetsch, C., Alberati, D., Ereshefsky, L., Jhee, S., . . . Martin-Facklam, M. (2016). Effects of the glycine reuptake inhibitors bitopertin and RG7118 on glycine in cerebrospinal fluid: results of two proofs of mechanism studies in healthy volunteers. *Psychopharmacology*, 233(13), 2429-2439.

Holroyd, S., Currie, L., & Wooten, G. J. J. o. N., Neurosurgery. (2001). Prospective study of hallucinations and delusions in Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 70(6), 734-738.
doi:<http://dx.doi.org/10.1136/jnnp.70.6.734>

Holroyd, S., & Wooten, G. F. (2006). Preliminary FMRI evidence of visual system dysfunction in Parkinson's disease patients with visual hallucinations. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*, 18(3), 402-404.

- Hornykiewicz, O., & Kish, S. J. (1987). Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease. *Adv Neurol*, 45, 19-34.
- Horvath, J., Herrmann, F. R., Burkhard, P. R., Bouras, C., & Kövari, E. (2013). Neuropathology of dementia in a large cohort of patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism and related disorders*, 19(10), 864-868.
- Hubsher, G., Haider, M., & Okun, M. (2012). Amantadine: the journey from fighting flu to treating Parkinson disease. *Neurology*, 78(14), 1096-1099.
- Huot, P. (2015). L-DOPA-induced dyskinesia, is striatal dopamine depletion a requisite? *Journal of the neurological sciences*, 351(1-2), 9-12.
- Huot, P., Johnston, T. H., Koprach, J. B., Espinosa, M. C., Reyes, M. G., Fox, S. H., & Brotchie, J. M. (2015). L-745,870 reduces the expression of abnormal involuntary movements in the 6-OHDA-lesioned rat. *Behavioural pharmacology*, 26(1 and 2-Special Issue), 101-108.
- Indo, H. P., Davidson, M., Yen, H.-C., Suenaga, S., Tomita, K., Nishii, T., . . . Majima, H. J. (2007). Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. *Mitochondrion*, 7(1-2), 106-118.
- Ingham, C., Hood, S., & Arbuthnott, G. (1989). Spine density on neostriatal neurones changes with 6-hydroxydopamine lesions and with age. *Brain research*, 503(2), 334-338.

Inyushin, M., Huertas, A., Kucheryavykh, Y., Kucheryavykh, L., Tsydzik, V., Sanabria, P., . . . Wessinger, W. (2012). L-DOPA uptake in astrocytic endfeet enwrapping blood vessels in rat brain. *Parkinson's disease*, 2012.

Inzelberg, R., Kipervasser, S., & Korczyn, A. D. (1998). Auditory hallucinations in Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 64(4), 533-535.

Iravani, M. M., Costa, S., Jackson, M. J., Tel, B. C., Cannizzaro, C., Pearce, R. K., & Jenner, P. (2001). GDNF reverses priming for dyskinesia in MPTP-treated, L-DOPA-primed common marmosets. *European Journal of Neuroscience*, 13(3), 597-608.

Jackson-Lewis, V., Vila, M., Tieu, K., Teismann, P., Vadseth, C., Choi, D.-K., . . . Przedborski, S. (2002). Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *Journal of Neuroscience*, 22(5), 1763-1771.

Jiang, X., Liang, P., Wang, K., Jia, J., & Wang, X. (2022). Serotonin 1A receptor agonist modulation of motor deficits and cortical oscillations by NMDA receptor interaction in parkinsonian rats. *Neuropharmacology*, 203, 108881.

Johnson, J., & Ascher, P. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*, 325(6104), 529-531.

Jourdain, V. A., Morin, N., Grégoire, L., Morissette, M., & Di Paolo, T. (2015). Changes in glutamate receptors in dyskinetic parkinsonian monkeys after unilateral

- subthalamotomy. *Journal of Neurosurgery*, 123(6), 1383-1393.
doi:<https://doi.org/10.3171/2014.10.JNS141570>
- Juncos, J. L., Roberts, V. J., Evatt, M. L., Jewart, R. D., Wood, C. D., Potter, L. S., . . .
Yeung, P. P. (2004). Quetiapine improves psychotic symptoms and cognition in
Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 19(1), 29-35. doi:10.1002/mds.10620
- Juorio, A. V., Li, X.-M., Walz, W., & Paterson, I. A. (1993). Decarboxylation of L-dopa by
cultured mouse astrocytes. *Brain research*, 626(1-2), 306-309.
- Kalia, L. V., Kalia, S. K., McLean, P. J., Lozano, A. M., & Lang, A. E. (2013). α -Synuclein
oligomers and clinical implications for Parkinson disease. *Annals of neurology*, 73(2),
155-169.
- Katzenschlager, R., Sampaio, C., Costa, J., Lees, A., & Cochrane Movement Disorders
Group. (1996). Anticholinergics for symptomatic management of Parkinson s disease.
Cochrane Database of Systematic Reviews, 2010(1).
- Kaur, R., Mehan, S., & Singh, S. (2019). Understanding multifactorial architecture of
Parkinson's disease: pathophysiology to management. *Neurological Sciences*, 40, 13-
23.
- Kaur, S., Özer, H., & Starr, M. (1997). MK 801 reverses haloperidol-induced catalepsy from
both striatal and extrastriatal sites in the rat brain. *European journal of pharmacology*,
332(2), 153-160.

- Kim, A., Kim, Y. E., Yun, J. Y., Kim, H.-J., Yang, H.-J., Lee, W.-W., . . . Kim, A. (2018). Amantadine and the risk of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease: an open-label, pragmatic trial. *Journal of movement disorders, 11*(2), 65.
- Kleckner, N. W., & Dingledine, R. (1988). Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science translational medicine, 241*(4867), 835-837.
- Kong, M., Ba, M., Ren, C., Yu, L., Dong, S., Yu, G., & Liang, H. (2017). An updated meta-analysis of amantadine for treating dyskinesia in Parkinson's disease. *Oncotarget, 8*(34), 57316.
- Kopec, K., Flood, D. G., Gasior, M., McKenna, B. A. W., Zuvich, E., Schreiber, J., . . . Marino, M. J. (2010). Glycine transporter (GlyT1) inhibitors with reduced residence time increase prepulse inhibition without inducing hyperlocomotion in DBA/2 mice. *Biochemical pharmacology, 80*(9), 1407-1417.
- Kulisevsky, J., & Pagonabarraga, J. (2010). Tolerability and safety of ropinirole versus other dopamine agonists and levodopa in the treatment of Parkinson's disease: meta-analysis of randomized controlled trials. *Drug Saf, 33*(2), 147-161. doi:10.2165/11319860-000000000-00000
- Kurth, M. C., & Adler, C. H. (1998). COMT inhibition: a new treatment strategy for Parkinson's disease. *Neurology, 50*(5 Suppl 5), S3-S14.

- Kuzuhara, S. (2001). Drug-induced psychotic symptoms in Parkinson's disease. Problems, management and dilemma. *Journal of neurology*, 248, 28-31.
- Kwan, C., Frouni, I., Bédard, D., Hamadjida, A., & Huot, P. (2020). Ondansetron, a highly selective 5-HT₃ receptor antagonist, reduces L-DOPA-induced dyskinesia in the 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease. *European journal of pharmacology*, 871, 172914.
- Kwan, C., Frouni, I., Bédard, D., Hamadjida, A., & Huot, P. (2021a). Granisetron, a selective 5-HT₃ antagonist, reduces L-3, 4-dihydroxyphenylalanine-induced abnormal involuntary movements in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat. *Behavioural pharmacology*, 32(1), 43-53.
- Kwan, C., Nuara, S. G., Bédard, D., Gaudette, F., Gourdon, J. C., Beaudry, F., & Huot, P. (2021b). Selective blockade of the 5-HT₃ receptor acutely alleviates dyskinesia and psychosis in the parkinsonian marmoset. *Neuropharmacology*, 182, 108386.
- Kwan, C., Nuara, S. G., Gourdon, J. C., & Huot, P. (2021c). Further characterisation of psychosis-like behaviours induced by L-DOPA in the MPTP-lesioned marmoset. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 394(8), 1685-1692.
- Kyle, K., & Bronstein, J. M. (2020). Treatment of psychosis in Parkinson's disease and dementia with Lewy Bodies: A review. *Parkinsonism & Related Disorders*, 75, 55-62.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2020.05.026>

- Lajoie, A. C., Lafontaine, A.-L., & Kaminska, M. (2021). The spectrum of sleep disorders in Parkinson disease: a review. *Chest*, *159*(2), 818-827.
- Lanciego, J. L., Luquin, N., & Obeso, J. A. (2012). Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *2*(12), a009621.
- Lane, H.-Y., Chang, Y.-C., Liu, Y.-C., Chiu, C.-C., & Tsai, G. E. (2005). Sarcosine or D-serine add-on treatment for acute exacerbation of schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Archives of General Psychiatry*, *62*(11), 1196-1204.
- Lane, H.-Y., Liu, Y.-C., Huang, C.-L., Chang, Y.-C., Liao, C.-H., Perng, C.-H., & Tsai, G. E. (2008). Sarcosine (N-methylglycine) treatment for acute schizophrenia: a randomized, double-blind study. *Biological psychiatry*, *63*(1), 9-12.
- Langston, J., Forno, L., Tetrad, J., Reeves, A., Kaplan, J., & Karluk, D. (1999). Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine exposure. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association the Child Neurology Society*, *46*(4), 598-605.
- Lanza, K., Centner, A., Coyle, M., Del Priore, I., Manfredsson, F. P., & Bishop, C. (2021). Genetic suppression of the dopamine D3 receptor in striatal D1 cells reduces the development of L-DOPA-induced dyskinesia. *Experimental neurology*, *336*, 113534.
- Lau, L. T., & Yu, A. C.-H. (2001). Astrocytes produce and release interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma following traumatic and metabolic

injury. *Journal of neurotrauma*, 18(3), 351-359.

doi:<https://doi.org/10.1089/08977150151071035>

Lee, A. H., & Weintraub, D. (2012). Psychosis in Parkinson's disease without dementia: common and comorbid with other non-motor symptoms. *Movement Disorders*, 27(7), 858-863.

Lee, T., Seeman, P., Rajput, A., Farley, I. J., & Hornykiewicz, O. (1978). Receptor basis for dopaminergic supersensitivity in Parkinson's disease. *Nature*, 273(5657), 59-61.

Lees, A., Ferreira, J. J., Rocha, J.-F., Rascol, O., Poewe, W., Gama, H., & Soares-da-Silva, P. (2019). Safety profile of opicapone in the management of Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's disease*, 9(4), 733-740.

Legendre, P. (2001). The glycinergic inhibitory synapse. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58(5), 760-793.

Lenda, T., Ossowska, K., Berghauzen-Maciejewska, K., Matłoka, M., Pieczykolan, J., Wiczorek, M., & Konieczny, J. (2021). Antiparkinsonian-like effects of CPL500036, a novel selective inhibitor of phosphodiesterase 10A, in the unilateral rat model of Parkinson's disease. *European journal of pharmacology*, 910, 174460.

Lester, R. A., Tong, G., & Jahr, C. E. (1993). Interactions between the glycine and glutamate binding sites of the NMDA receptor. *Journal of Neuroscience*, 13(3), 1088-1096.
doi:<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-03-01088.1993>

- Levandis, G., Bazzini, E., Armentero, M.-T., Nappi, G., & Blandini, F. (2008). Systemic administration of an mGluR5 antagonist, but not unilateral subthalamic lesion, counteracts l-DOPA-induced dyskinesias in a rodent model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, 29(1), 161-168.
- Lew, M. F., Pahwa, R., Leehey, M., Bertoni, J., Kricorian, G., & Group, Z. s. s. (2007). Safety and efficacy of newly formulated selegiline orally disintegrating tablets as an adjunct to levodopa in the management of 'off' episodes in patients with Parkinson's disease. *Current medical research opinion*, 23(4), 741-750.
- Lindgren, H. S., Lelos, M. J., & Dunnett, S. B. (2012). Do alpha-synuclein vector injections provide a better model of Parkinson's disease than the classic 6-hydroxydopamine model? *Experimental neurology*, 237(1), 36-42.
- Litvinenko, I., Odinak, M., Mogil'Naya, V., & Perstnev, S. (2010). Use of memantine (akatinol) for the correction of cognitive impairments in Parkinson's disease complicated by dementia. *Neuroscience and behavioral physiology*, 40(2), 149.
- Liu, Q., Lopez-Corcuera, B., Mandiyan, S., Nelson, H., & Nelson, N. (1993). Cloning and expression of a spinal cord-and brain-specific glycine transporter with novel structural features. *Journal of Biological Chemistry*, 268(30), 22802-22808.
- Liu, S., Ninan, I., Antonova, I., Battaglia, F., Trinchese, F., Narasanna, A., . . . Arancio, O. (2004). α -Synuclein produces a long-lasting increase in neurotransmitter release. *The EMBO journal*, 23(22), 4506-4516.

- Loeffler, D. A., Camp, D. M., & Conant, S. B. (2006). Complement activation in the Parkinson's disease substantia nigra: an immunocytochemical study. *Journal of Neuroinflammation*, 3(1), 1-8.
- Long-Smith, C. M., Sullivan, A. M., & Nolan, Y. M. (2009). The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*, 89(3), 277-287.
- Lopez-Corcuera, B., Geerlings, A., & Aragon, C. (2001). Glycine neurotransmitter transporters: an update. *Molecular membrane biology*, 18(1), 13-20.
- Luccini, E., Romei, C., & Raiteri, L. (2008). Glycinergic nerve endings in hippocampus and spinal cord release glycine by different mechanisms in response to identical depolarizing stimuli. *Journal of neurochemistry*, 105(6), 2179-2189.
- Lundblad, M., Andersson, M., Winkler, C., Kirik, D., Wierup, N., & Cenci, M. A. (2002). Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience*, 15(1), 120-132.
- Lundblad, M., Usiello, A., Carta, M., Håkansson, K., Fisone, G., & Cenci, M. (2005). Pharmacological validation of a mouse model of l-DOPA-induced dyskinesia. *Experimental neurology*, 194(1), 66-75.
- Luquin, M., Scipioni, O., Vaamonde, J., Gershanik, O., & Obeso, J. A. (1992). Levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: clinical and pharmacological classification. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 7(2), 117-124.

- Lynch, J. W. (2004). Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiological reviews*, *84*(4), 1051-1095.
- Ma, L., Yang, C., Zhang, X., Li, Y., Wang, S., Zheng, L., & Huang, K. (2018). C-terminal truncation exacerbates the aggregation and cytotoxicity of α -Synuclein: A vicious cycle in Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Basis of Disease*, *1864*(12), 3714-3725.
- Magno, L. A. V., Collodetti, M., Tenza-Ferrer, H., & Romano-Silva, M. A. (2019). Cylinder test to assess sensory-motor function in a mouse model of Parkinson's disease. *Bio-protocol*, *9*(16), e3337-e3337.
- Marchel, D., Hart, A. L., Keefer, P., & Vredeveld, J. (2017). Multiorgan eosinophilic infiltration after initiation of clozapine therapy: a case report. *BMC Research Notes*, *10*(1), 1-3.
- Markham, C. H. (1971). The choreoathetoid movement disorder induced by levodopa. *Clinical Pharmacology Therapeutics*, *12*(2part2), 340-343.
- Maroteaux, L., Campanelli, J. T., & Scheller, R. H. (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *Journal of Neuroscience*, *8*(8), 2804-2815.
- Marsh, L., Williams, J., Rocco, M., Grill, S., Munro, C., & Dawson, T. (2004). Psychiatric comorbidities in patients with Parkinson disease and psychosis. *Neurology*, *63*(2), 293-300.

Marshall, J. F., Navarrete, R., & Joyce, J. N. (1989). Decreased striatal D1 binding density following mesotelencephalic 6-hydroxydopamine injections: an autoradiographic analysis. *Brain research*, 493(2), 247-257.

Martin-Facklam, M., Pizzagalli, F., Zhou, Y., Ostrowitzki, S., Raymont, V., Brašić, J. R., . . . Goldwater, R. (2013). Glycine transporter type 1 occupancy by bitopertin: a positron emission tomography study in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology*, 38(3), 504-512.

Martina, M., Gorfinkel, Y., Halman, S., Lowe, J. A., Periyalwar, P., Schmidt, C. J., & Bergeron, R. (2004). Glycine transporter type 1 blockade changes NMDA receptor-mediated responses and LTP in hippocampal CA1 pyramidal cells by altering extracellular glycine levels. *The Journal of physiology*, 557(2), 489-500.

Martinez-Martin, P., Rodriguez-Blazquez, C., Forjaz, M. J., Frades-Payo, B., Agüera-Ortiz, L., Weintraub, D., . . . Chaudhuri, K. R. (2015). Neuropsychiatric symptoms and caregiver's burden in Parkinson's disease. *Parkinsonism and related disorders*, 21(6), 629-634.

Masilamoni, G. J., Bogenpohl, J. W., Alagille, D., Delevich, K., Tamagnan, G., Votaw, J. R., . . . Smith, Y. (2011). Metabotropic glutamate receptor 5 antagonist protects dopaminergic and noradrenergic neurons from degeneration in MPTP-treated monkeys. *Brain*, 134(7), 2057-2073.

Matheoud, D., Cannon, T., Voisin, A., Penttinen, A.-M., Ramet, L., Fahmy, A. M., . . .

Desjardins, M. (2019). Intestinal infection triggers Parkinson's disease-like symptoms in *Pink1*^{-/-} mice. *Nature*, *571*(7766), 565-569.

Matheoud, D., Sugiura, A., Bellemare-Pelletier, A., Laplante, A., Rondeau, C., Chemali, M., .

. . Buelle, Y. (2016). Parkinson's disease-related proteins PINK1 and Parkin repress mitochondrial antigen presentation. *Cell*, *166*(2), 314-327.

Matsubayashi, H., Swanson, K. L., & Albuquerque, E. X. (1997). Amantadine inhibits

nicotinic acetylcholine receptor function in hippocampal neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *281*(2), 834-844.

Mattay, V. S., Tessitore, A., Callicott, J. H., Bertolino, A., Goldberg, T. E., Chase, T. N., . . .

Weinberger, D. R. (2002). Dopaminergic modulation of cortical function in patients with Parkinson's disease. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, *51*(2), 156-164.

McAllister, K. H. (1996). The competitive NMDA receptor antagonist SDZ 220-581 reverses

haloperidol-induced catalepsy in rats. *European journal of pharmacology*, *314*(3), 307-311.

McGeer, P. L., Itagaki, S., Boyes, B. E., & McGeer, E. (1988). Reactive microglia are

positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*, *38*(8), 1285-1285.

- McNaught, K. S. P., Belizaire, R., Isacson, O., Jenner, P., & Olanow, C. W. (2003). Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Experimental neurology*, *179*(1), 38-46.
- McNaught, K. S. P., Belizaire, R., Jenner, P., Olanow, C. W., & Isacson, O. (2002a). Selective loss of 20S proteasome α -subunits in the substantia nigra pars compacta in Parkinson's disease. *Neuroscience letters*, *326*(3), 155-158.
- McNaught, K. S. P., Björklund, L. M., Belizaire, R., Isacson, O., Jenner, P., & Olanow, C. W. (2002b). Proteasome inhibition causes nigral degeneration with inclusion bodies in rats. *Neuroreport*, *13*(11), 1437-1441.
- McNaught, K. S. P., & Jenner, P. (2001). Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neuroscience letters*, *297*(3), 191-194.
- Mehler-Wex, C., Riederer, P., & Gerlach, M. (2006). Dopaminergic dysbalance in distinct basal ganglia neurocircuits: implications for the pathophysiology of Parkinson's disease, schizophrenia and attention deficit hyperactivity disorder. *Neurotoxicity research*, *10*(3-4), 167-179.
- Meissner, W., Prunier, C., Guilloteau, D., Chalon, S., Gross, C. E., & Bezard, E. (2003). Time-course of nigrostriatal degeneration in a progressive MPTP-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *Molecular Neurobiology*, *28*, 209-218.
- Melamed, E. (1979). Early-morning dystonia: a late side effect of long-term levodopa therapy in Parkinson's disease. *Archives of neurology*, *36*(5), 308-310.

- Meltzer, H. Y. (1994). An overview of the mechanism of action of clozapine. *J Clin Psychiatry, 55 Suppl B*, 47-52.
- Meltzer, H. Y., Mills, R., Revell, S., Williams, H., Johnson, A., Bahr, D., & Friedman, J. H. (2010). Pimavanserin, a Serotonin(2A) Receptor Inverse Agonist, for the Treatment of Parkinson's Disease Psychosis. *Neuropsychopharmacology, 35*(4), 881-892.
doi:10.1038/npp.2009.176
- Merello, M., Nouzeilles, M. I., Cammarota, A., & Leiguarda, R. (1999). Effect of memantine (NMDA antagonist) on Parkinson's disease: a double-blind crossover randomized study. *Clin Neuropharmacol, 22*(5), 273-276. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10516877>
- Metman, L. V., Del Dotto, P., LePoole, K., Konitsiotis, S., Fang, J., & Chase, T. N. (1999). Amantadine for levodopa-induced dyskinesias: a 1-year follow-up study. *Archives of neurology, 56*(11), 1383-1386.
- Mizuno, Y., Sone, N., & Saitoh, T. (1987). Effects of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion on activities of the enzymes in the electron transport system in mouse brain. *Journal of neurochemistry, 48*(6), 1787-1793.
- Mizuno, Y., Yamamoto, M., Kuno, S., Hasegawa, K., Hattori, N., Kagimura, T., . . . Barone, P. (2012). Efficacy and Safety of Extended-Versus Immediate-Release Pramipexole in Japanese Patients With Advanced and L-dopa-Undertreated Parkinson Disease: A Double-Blind, Randomized Trial. *Clinical neuropharmacology, 35*(4), 174-181.

Mizushima, N. J. G. (2007). Autophagy: process and function. *Genes & development*, 21(22), 2861-2873.

Montastruc, J., Rascol, O., Senard, J., & Rascol, A. (1992). A pilot study of N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist in Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 55(7), 630.

Montastruc, J. L., Chaumerliac, C., Desboeuf, K., Manika, M., Bagheri, H., Rascol, O., & Lapeyre-Mestre, M. (2000). Adverse drug reactions to selegiline: a review of the French pharmacovigilance database. *Clin Neuropharmacol*, 23(5), 271-275.
doi:10.1097/00002826-200009000-00006

Moon, H. E., & Paek, S. H. (2015). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Experimental neurobiology*, 24(2), 103-116.
doi:<https://doi.org/10.5607%2Fen.2015.24.2.103>

Morgante, L., Epifanio, A., Spina, E., Zappia, M., Di Rosa, A. E., Marconi, R., . . . Quattrone, A. (2004). Quetiapine and clozapine in parkinsonian patients with dopaminergic psychosis. *Clinical neuropharmacology*, 27(4), 153-156.

Morin, N., Morissette, M., Grégoire, L., Gomez-Mancilla, B., Gasparini, F., & Di Paolo, T. (2013). Chronic treatment with MPEP, an mGlu5 receptor antagonist, normalizes basal ganglia glutamate neurotransmission in L-DOPA-treated parkinsonian monkeys. *Neuropharmacology*, 73, 216-231.

- Moschetti, V., Desch, M., Goetz, S., Liesenfeld, K.-H., Rosenbrock, H., Kammerer, K.-P., . . . Wind, S. (2018). Safety, tolerability and pharmacokinetics of oral BI 425809, a glycine transporter 1 inhibitor, in healthy male volunteers: a partially randomised, single-blind, placebo-controlled, first-in-human study. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, *43*, 239-249.
- Moskovitz, C., Moses, H., 3rd, & Klawans, H. L. (1978a). Levodopa-induced psychosis: a kindling phenomenon. *Am J Psychiatry*, *135*(6), 669-675. doi:10.1176/ajp.135.6.669
- Moskovitz, C., Moses, H., & Klawans, H. L. (1978b). Levodopa-induced psychosis: a kindling phenomenon. *American Journal of Psychiatry*, *135*(6), 669-675.
- Mounayar, S., Boulet, S., Tandé, D., Jan, C., Pessiglione, M., Hirsch, E. C., . . . Tremblay, L. (2007). A new model to study compensatory mechanisms in MPTP-treated monkeys exhibiting recovery. *Brain*, *130*(11), 2898-2914.
- Moustafa, A. A., Chakravarthy, S., Phillips, J. R., Gupta, A., Keri, S., Polner, B., . . . Jahanshahi, M. (2016). Motor symptoms in Parkinson's disease: A unified framework. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, *68*, 727-740.
- Muenter, M., Sharpless, N., Tyce, G., & Darley, F. (1977). Patterns of dystonia (" IDI" and " DID-") in response to l-dopa therapy for Parkinson's disease. *Mayo Clinic Proceedings*, *52*(3), 163-174.
- Müller, T., & Russ, H. (2006). Levodopa, motor fluctuations and dyskinesia in Parkinson's disease. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, *7*(13), 1715-1730.

- Murphy, D. D., Rueter, S. M., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (2000). Synucleins are developmentally expressed, and α -synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*, *20*(9), 3214-3220.
- Musante, V., Summa, M., Cunha, R. A., Raiteri, M., & Pittaluga, A. (2011). Pre-synaptic glycine GlyT1 transporter–NMDA receptor interaction: relevance to NMDA autoreceptor activation in the presence of Mg²⁺ ions. *Journal of neurochemistry*, *117*(3), 516-527.
- Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A., & Chandu, D. (2006). The ubiquitin-proteasome system. *Journal of biosciences*, *31*, 137-155.
- Nash, J., Fox, S., Henry, B., Hill, M., Peggs, D., McGuire, S., . . . Crossman, A. (2000). Antiparkinsonian actions of ifenprodil in the MPTP-lesioned marmoset model of Parkinson's disease. *Experimental neurology*, *165*(1), 136-142.
- Nathan, D. G., Piomelli, S., & Gardner, F. H. (1961). The synthesis of heme and globin in the maturing human erythroid cell. *The Journal of clinical investigation*, *40*(6), 940-946.
- Navailles, S., Bioulac, B., Gross, C., & De Deurwaerdère, P. (2010). Serotonergic neurons mediate ectopic release of dopamine induced by L-DOPA in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, *38*(1), 136-143.

- Navailles, S., & De Deurwaerdere, P. (2012). Imbalanced dopaminergic transmission mediated by serotonergic neurons in L-DOPA-induced dyskinesia. *Parkinson's disease*, 2012, 1-16. doi:<https://doi.org/10.1155/2012/323686>
- Nelson, N. (1998). The family of Na⁺/Cl⁻ neurotransmitter transporters. *Journal of neurochemistry*, 71(5), 1785-1803.
- Nguyen, L., Rigo, J.-M., Rocher, V., Belachew, S., Malgrange, B., Rogister, B., . . . Moonen, G. (2001). Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell and tissue research*, 305(2), 187-202.
- Nicklas, W. J., Vyas, I., & Heikkila, R. E. (1985). Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 5, 6-tetrahydropyridine. *Life sciences*, 36(26), 2503-2508.
- Nishio, Y., Yokoi, K., Hirayama, K., Ishioka, T., Hosokai, Y., Gang, M., . . . Takeda, A. (2018). Defining visual illusions in Parkinson's disease: kinetopsia and object misidentification illusions. *Parkinsonism and related disorders*, 55, 111-116.
- Nisticò, R., Mehdawy, B., Piccirilli, S., & Mercuri, N. (2011). Paraquat-and rotenone-induced models of Parkinson's disease. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 24(2), 313-322.
- Nong, Y., Huang, Y.-Q., Ju, W., Kalia, L. V., Ahmadian, G., Wang, Y. T., & Salter, M. W. (2003). Glycine binding primes NMDA receptor internalization. *Nature*, 422(6929), 302-307.

- Nuara, S. G., Hamadjida, A., Kwan, C., Bédard, D., Frouni, I., Gourdon, J. C., & Huot, P. (2020). Combined mGlu 2 orthosteric stimulation and positive allosteric modulation alleviates l-DOPA-induced psychosis-like behaviours and dyskinesia in the parkinsonian marmoset. *Journal of Neural Transmission*, *127*, 1023-1029.
- Nutt, J. G., Gunzler, S. A., Kirchoff, T., Hogarth, P., Weaver, J. L., Krams, M., . . . Landen, J. W. (2008). Effects of a NR2B selective NMDA glutamate antagonist, CP-101,606, on dyskinesia and parkinsonism. *Movement Disorders*, *23*(13), 1860-1866.
- Nuzzo, T., Punzo, D., Devoto, P., Rosini, E., Paciotti, S., Sacchi, S., . . . Carella, M. (2019). The levels of the NMDA receptor co-agonist D-serine are reduced in the substantia nigra of MPTP-lesioned macaques and in the cerebrospinal fluid of Parkinson's disease patients. *Scientific Reports*, *9*(1), 8898.
- Obeso, J. A., Marin, C., Rodriguez-Oroz, C., Blesa, J., Benitez-Temiño, B., Mena-Segovia, J., . . . Olanow, C. W. (2008). The basal ganglia in Parkinson's disease: current concepts and unexplained observations. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, *64*(S2), S30-S46.
- Obeso, J. A., Rodriguez-Oroz, M. C., Rodriguez, M., Lanciego, J. L., Artieda, J., Gonzalo, N., & Olanow, C. W. (2000). Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends in neurosciences*, *23*, S8-S19.
- Oertel, W., Eggert, K., Pahwa, R., Tanner, C. M., Hauser, R. A., Trenkwalder, C., . . . Stempien, M. J. (2017). Randomized, placebo-controlled trial of ADS-5102

- (amantadine) extended-release capsules for levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease (EASE LID 3). *Mov Disord*, 32(12), 1701-1709. doi:10.1002/mds.27131
- Olanow, C. W., Factor, S. A., Espay, A. J., Hauser, R. A., Shill, H. A., Isaacson, S., . . . Sciarappa, K. (2020). Apomorphine sublingual film for off episodes in Parkinson's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *The Lancet Neurology*, 19(2), 135-144.
- Olanow, W., Kieburtz, K., Rascol, O., Poewe, W., Schapira, A. H., Emre, M., . . . Stocchi, F. (2013). Stalevo Reduction in Dyskinesia Evaluation in Parkinson's Disease (STRIDE-PD) Investigators. Factors predictive of the development of Levodopa-induced dyskinesia and wearing-off in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 28(8), 1064-1067.
- Ondo, W. G., Tintner, R., Voung, K. D., Lai, D., & Ringholz, G. (2005). Double-blind, placebo-controlled, unforced titration parallel trial of quetiapine for dopaminergic-induced hallucinations in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 20(8), 958-963. doi:10.1002/mds.20474
- Ouattara, B., Grégoire, L., Morissette, M., Gasparini, F., Vranesic, I., Bilbe, G., . . . Gomez-Mancilla, B. (2011). Metabotropic glutamate receptor type 5 in levodopa-induced motor complications. *Neurobiology of aging*, 32(7), 1286-1295.
- Ovadia, A., Zhang, Z., & Gash, D. M. (1995). Increased susceptibility to MPTP toxicity in middle-aged rhesus monkeys. *Neurobiology of aging*, 16(6), 931-937.

- Pacelli, C., Giguère, N., Bourque, M.-J., Lévesque, M., Slack, R. S., & Trudeau, L.-É. (2015). Elevated mitochondrial bioenergetics and axonal arborization size are key contributors to the vulnerability of dopamine neurons. *Current Biology*, *25*(18), 2349-2360.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.050>
- Pagano, G., Niccolini, F., Fusar-Poli, P., & Politis, M. (2017). Serotonin transporter in Parkinson's disease: A meta-analysis of positron emission tomography studies. *Annals of neurology*, *81*(2), 171-180.
- Pagano, G., Rengo, G., Pasqualetti, G., Femminella, G. D., Monzani, F., Ferrara, N., & Tagliati, M. (2015). Cholinesterase inhibitors for Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, *86*(7), 767-773.
- Pahwa, R., & Hauser, R. A. (2017). ADS-5102 (Amantadine) Extended Release for Levodopa-Induced Dyskinesia. *JAMA Neurol*, *74*(12), 1507-1508.
doi:10.1001/jamaneurol.2017.3205
- Pahwa, R., Tanner, C. M., Hauser, R. A., Sethi, K., Isaacson, S., Truong, D., . . . Went, G. T. (2015). Amantadine extended release for levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease (EASED Study). *Movement Disorders*, *30*(6), 788-795.
- Pålhagen, S., Heinonen, E., Hägglund, J., Kaugesaar, T., Mäki-Ikola, O., Palm, R., & Group, S. P. S. (2006). Selegiline slows the progression of the symptoms of Parkinson disease. *Neurology*, *66*(8), 1200-1206.

- Panchal, S. C., & Ondo, W. G. (2018). Treating Hallucinations and Delusions Associated With Parkinson's Disease Psychosis. *Curr Psychiatry Rep*, 20(1), 3.
doi:10.1007/s11920-018-0869-z
- Papapetropoulos, S., & Mash, D. C. (2005). Psychotic symptoms in Parkinson's disease. From description to etiology. *J Neurol*, 252(7), 753-764. doi:10.1007/s00415-005-0918-5
- Papapetropoulos, S., McCorquodale, D. S., Gonzalez, J., Jean-Gilles, L., & Mash, D. C. (2006). Cortical and amygdalar Lewy body burden in Parkinson's disease patients with visual hallucinations. *Parkinsonism and related disorders*, 12(4), 253-256.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2005.10.005>
- Pappert, E. J., Goetz, C. G., Niederman, F. G., Raman, R., & Leurgans, S. (1999). Hallucinations, sleep fragmentation, and altered dream phenomena in Parkinson's disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 14(1), 117-121. doi:[https://doi.org/10.1002/1531-8257\(199901\)14:1%3C117::AID-MDS1019%3E3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1531-8257(199901)14:1%3C117::AID-MDS1019%3E3.0.CO;2-0)
- Parkinson Study, G. (2001). Evaluation of dyskinesias in a pilot, randomized, placebo-controlled trial of remacemide in advanced Parkinson disease. *Arch Neurol*, 58(10), 1660-1668. doi:10.1001/archneur.58.10.1660
- Parkinson Study Group. (1999). Low-dose clozapine for the treatment of drug-induced psychosis in Parkinson's disease. *New England Journal of Medicine*, 340(10), 757-763.

Parkinson Study Group. (2000a). A multicenter randomized controlled trial of remacemide hydrochloride as monotherapy for PD. *Neurology*, *54*(8), 1583-1588.

Parkinson Study Group. (2000b). Pramipexole vs levodopa as initial treatment for Parkinson disease: a randomized controlled trial. *JAMA psychiatry*, *284*(15), 1931-1938.

Parkinson Study Group. (2001). Evaluation of dyskinesias in a pilot, randomized, placebo-controlled trial of remacemide in advanced Parkinson disease. *Archives of neurology*, *58*(10), 1660-1668.

Parrott, N., Hainzl, D., Alberati, D., Hofmann, C., Robson, R., Boutouyrie, B., & Martin-Facklam, M. (2013). Physiologically based pharmacokinetic modelling to predict single-and multiple-dose human pharmacokinetics of bitopertin. *Clinical pharmacokinetics*, *52*(8), 673-683.

Parrott, N., Hainzl, D., Scheubel, E., Krimmer, S., Boetsch, C., Guerini, E., & Martin-Facklam, M. (2014). Physiologically based absorption modelling to predict the impact of drug properties on pharmacokinetics of bitopertin. *The AAPS journal*, *16*(5), 1077-1084.

Payer, D. E., Guttman, M., Kish, S. J., Tong, J., Adams, J. R., Rusjan, P., . . . Boileau, I. (2016). D3 dopamine receptor-preferring [¹¹C] PHNO PET imaging in Parkinson patients with dyskinesia. *Neurology*, *86*(3), 224-230.

Pearce, R., Jackson, M., Smith, L., Jenner, P., & Marsden, C. (1995). Chronic L-DOPA administration induces dyskinesias in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-

- tetrahydropyridine-treated common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 10(6), 731-740.
- Pearce, R. K., Banerji, T., Jenner, P., & David Marsden, C. (1998). De novo administration of ropinirole and bromocriptine induces less dyskinesia than L-dopa in the MPTP-treated marmoset. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 13(2), 234-241.
- Peeters, M., Romieu, P., Maurice, T., Su, T. P., Maloteaux, J. M., & Hermans, E. (2004). Involvement of the sigma1 receptor in the modulation of dopaminergic transmission by amantadine. *European Journal of Neuroscience*, 19(8), 2212-2220.
- Perese, D., Ulman, J., Viola, J., Ewing, S., & Bankiewicz, K. (1989). A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model. *Brain research*, 494(2), 285-293.
- Perez-Lloret, S., & Rascol, O. (2018). Efficacy and safety of amantadine for the treatment of L-DOPA-induced dyskinesia. *Journal of Neural Transmission*, 125(8), 1237-1250.
- Perez-Otano, I., Oset, C., Luquin, M., Herrero, M., Obeso, J., & Del Rio, J. (1994). MPTP-induced parkinsonism in primates: pattern of striatal dopamine loss following acute and chronic administration. *Neuroscience letters*, 175(1-2), 121-125.
- Perez, X. A., Zhang, D., Bordia, T., & Quik, M. (2017). Striatal D1 medium spiny neuron activation induces dyskinesias in parkinsonian mice. *Movement Disorders*, 32(4), 538-548.

- Perry, K. W., Falcone, J. F., Fell, M. J., Ryder, J. W., Yu, H., Love, P. L., . . . Man, T. (2008). Neurochemical and behavioral profiling of the selective GlyT1 inhibitors ALX5407 and LY2365109 indicate a preferential action in caudal vs. cortical brain areas. *Neuropharmacology*, 55(5), 743-754.
- Phatnani, H., & Maniatis, T. (2015). Astrocytes in neurodegenerative disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(6), a020628. doi:doi: 10.1101/cshperspect.a020628
- Philippens, I. H. (2017). Refinement of the MPTP model for Parkinson's disease in the marmoset. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 25, 53-61.
- Picca, A., Guerra, F., Calvani, R., Romano, R., Coelho-Júnior, H. J., Bucci, C., & Marzetti, E. (2021). Mitochondrial dysfunction, protein misfolding and neuroinflammation in Parkinson's disease: Roads to biomarker discovery. *Biomolecules*, 11(10), 1508.
- Pinard, E., Alanine, A., Alberati, D., Bender, M., Borroni, E., Bourdeaux, P., . . . Hainzl, D. (2010). Selective GlyT1 inhibitors: discovery of [4-(3-fluoro-5-trifluoromethylpyridin-2-yl) piperazin-1-yl][5-methanesulfonyl-2-((S)-2, 2, 2-trifluoro-1-methylethoxy) phenyl] methanone (RG1678), a promising novel medicine to treat schizophrenia. *Journal of medicinal chemistry*, 53(12), 4603-4614.
- Politis, M., & Niccolini, F. (2015). Serotonin in Parkinson's disease. *Behavioural brain research*, 277, 136-145.
- Politis, M., Wu, K., Loane, C., Turkheimer, F. E., Molloy, S., Brooks, D. J., & Piccini, P. (2010). Depressive symptoms in PD correlate with higher 5-HTT binding in raphe and

limbic structures. *Neurology*, 75(21), 1920-1927.

doi:<https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181feb2ab>

Porras, G., Li, Q., & Bezard, E. (2011). Modeling Parkinson's disease in primates: the MPTP model. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, a009308.

Postma, J. U., & Van Tilburg, W. (1975). Visual hallucinations and delirium during treatment with amantadine (Symmetrel). *J Am Geriatr Soc*, 23(5), 212-215. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=123540

Poyatos, I., Ponce, J., Aragón, C., Giménez, C., & Zafra, F. (1997). The glycine transporter GLYT2 is a reliable marker for glycine-immunoreactive neurons. *Molecular brain research*, 49(1-2), 63-70.

Przedborski, S., & Jackson-Lewis, V. (1998). Mechanisms of MPTP toxicity. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 13, 35-38.

Przedborski, S., & Vila, M. (2001). MPTP: a review of its mechanisms of neurotoxicity. *Clinical Neuroscience Research*, 1(6), 407-418.

Putterman, D. B., Munhall, A. C., Kozell, L. B., Belknap, J. K., & Johnson, S. W. (2007). Evaluation of levodopa dose and magnitude of dopamine depletion as risk factors for levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 323(1), 277-284.

- Qing, H., Wong, W., McGeer, E. G., & McGeer, P. L. (2009). Lrrk2 phosphorylates alpha synuclein at serine 129: Parkinson disease implications. *Biochemical biophysical research communications*, 387(1), 149-152.
- Quinn, N. (1995). Fortnightly Review: Drug treatment of Parkinson's disease. *Bmj*, 310(6979), 575-579.
- Quirós Cognuck, S., Reis, W. L., Silva, M., Debarba, L. K., Mecawi, A. S., de Paula, F. J., . . . Antunes-Rodrigues, J. (2020). Sex differences in body composition, metabolism-related hormones, and energy homeostasis during aging in Wistar rats. *Physiological Reports*, 8(20), e14597.
- Rabey, J. M., Prokhorov, T., Miniovitz, A., Dobronevsky, E., & Klein, C. (2007). Effect of quetiapine in psychotic Parkinson's disease patients: a double-blind labeled study of 3 months' duration. *Mov Disord*, 22(3), 313-318. doi:10.1002/mds.21116
- Raeder, V., Boura, I., Leta, V., Jenner, P., Reichmann, H., Trenkwalder, C., . . . Chaudhuri, K. (2021). Rotigotine transdermal patch for motor and non-motor Parkinson's disease: A review of 12 years' clinical experience. *CNS drugs*, 35(2), 215-231.
- Rammes, G., Rupprecht, R., Ferrari, U., Zieglgänsberger, W., & Parsons, C. (2001). The N-methyl-D-aspartate receptor channel blockers memantine, MRZ 2/579 and other amino-alkyl-cyclohexanes antagonise 5-HT₃ receptor currents in cultured HEK-293 and N1E-115 cell systems in a non-competitive manner. *Neuroscience letters*, 306(1-2), 81-84.

Rascol, O., Brooks, D., Melamed, E., Oertel, W., Poewe, W., Stocchi, F., . . . Group, L. S. (2005). Rasagiline as an adjunct to levodopa in patients with Parkinson's disease and motor fluctuations (LARGO, Lasting effect in Adjunct therapy with Rasagiline Given Once daily, study): a randomised, double-blind, parallel-group trial. *The Lancet*, 365(9463), 947-954.

Rascol, O., Brooks, D. J., Korczyn, A. D., De Deyn, P. P., Clarke, C. E., & Lang, A. E. (2000). A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. *New England Journal of Medicine*, 342(20), 1484-1491.

Ray, S., & Agarwal, P. (2020). Depression and anxiety in Parkinson disease. *Clinics in geriatric medicine*, 36(1), 93-104.

Reddy, S., Factor, S. A., Molho, E. S., & Feustel, P. J. (2002). The effect of quetiapine on psychosis and motor function in parkinsonian patients with and without dementia. *Movement Disorders*, 17(4), 676-681. doi:10.1002/mds.10176

Reisberg, B., Auer, S. R., & Monteiro, I. M. (1997). Behavioral pathology in Alzheimer's disease (BEHAVE-AD) rating scale. *International Psychogeriatrics*, 8(S3), 301-308.

Richelson, E., & Souder, T. (2000). Binding of antipsychotic drugs to human brain receptors focus on newer generation compounds. *Life Sci*, 68(1), 29-39. doi:10.1016/s0024-3205(00)00911-5

- Riederer, P., Gerlach, M., Müller, T., & Reichmann, H. (2007). Relating mode of action to clinical practice: dopaminergic agents in Parkinson's disease. *Parkinsonism and related disorders*, 13(8), 466-479.
- Rinne, J. (1993). Nigral degeneration in Parkinson's disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 8(S1), S31-S35.
- Rodríguez-Violante, M., Cervantes-Arriaga, A., González-Latapí, P., León-Ortiz, P., de la Fuente-Sandoval, C., & Corona, T. (2015). Proton magnetic resonance spectroscopy changes in Parkinson's disease with and without psychosis. *Revista de Investigación Clínica*, 67(4), 227-234.
- Rosenbrock, H., Dorner-Ciossek, C., Giovannini, R., Schmid, B., & Schuelert, N. (2022). Effects of the glycine transporter-1 inhibitor iclepertin (BI 425809) on sensory processing, neural network function, and cognition in animal models related to schizophrenia. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 382(2), 223-232.
- Rott, R., Szargel, R., Shani, V., Bisharat, S., & Engelender, S. (2014). α -Synuclein ubiquitination and novel therapeutic targets for Parkinson's disease. *CNS Neurological Disorders-Drug Targets*, 13(4), 630-637.
- Roux, M. J., & Supplisson, S. (2000). Neuronal and glial glycine transporters have different stoichiometries. *Neuron*, 25(2), 373-383.

- Ruxton, K., Woodman, R. J., & Mangoni, A. A. (2015). Drugs with anticholinergic effects and cognitive impairment, falls and all-cause mortality in older adults: a systematic review and meta-analysis. *British journal of clinical pharmacology*, *80*(2), 209-220.
- Rylander, D., Iderberg, H., Li, Q., Dekundy, A., Zhang, J., Li, H., . . . Cenci, M. A. (2010). A mGluR5 antagonist under clinical development improves L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats and monkeys. *Neurobiology of disease*, *39*(3), 352-361.
- Sai, Y., Zou, Z., Peng, K., & Dong, Z. (2012). The Parkinson's disease-related genes act in mitochondrial homeostasis. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, *36*(9), 2034-2043.
- Samadi, P., Grégoire, L., Morissette, M., Calon, F., Tahar, A. H., Dridi, M., . . . Di Paolo, T. (2008). mGluR5 metabotropic glutamate receptors and dyskinesias in MPTP monkeys. *Neurobiology of aging*, *29*(7), 1040-1051.
- Sanchez-Pernaute, R., Wang, J.-Q., Kuruppu, D., Cao, L., Tueckmantel, W., Kozikowski, A., . . . Brownell, A.-L. (2008). Enhanced binding of metabotropic glutamate receptor type 5 (mGluR5) PET tracers in the brain of parkinsonian primates. *NeuroImage*, *42*(1), 248-251.
- Sawada, H., Oeda, T., Kuno, S., Nomoto, M., Yamamoto, K., Yamamoto, M., . . . Group, A. S. (2010). Amantadine for dyskinesias in Parkinson's disease: a randomized controlled trial. *PloS one*, *5*(12), e15298.
- Sawada, M., Imamura, K., & Nagatsu, T. (2006). *Role of cytokines in inflammatory process in Parkinson's disease*. Paper presented at the Parkinson's Disease Related Disorders.

- Schapira, A., Cooper, J., Dexter, D., Clark, J., Jenner, P., & Marsden, C. (1990). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, *54*(3), 823-827.
- Schapira, A., Emre, M., Jenner, P., & Poewe, W. (2009). Levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *European Journal of Neurology*, *16*(9), 982-989.
- Schapira, A. H., Chaudhuri, K. R., & Jenner, P. (2017). Non-motor features of Parkinson disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *18*(7), 435-450.
- Schneider, J., & Rothblat, D. (1991). Neurochemical evaluation of the striatum in symptomatic and recovered MPTP-treated cats. *Neuroscience*, *44*(2), 421-429.
- Schober, A. (2004). Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell and tissue research*, *318*(1), 215-224.
doi:<https://doi.org/10.1007/s00441-004-0938-y>
- Schrag, A., & Schott, J. M. (2006). Epidemiological, clinical, and genetic characteristics of early-onset parkinsonism. *The Lancet Neurology*, *5*(4), 355-363.
- Seppi, K., Ray Chaudhuri, K., Coelho, M., Fox, S. H., Katzenschlager, R., Perez Lloret, S., . . . Chahine, L. (2019). Update on treatments for nonmotor symptoms of Parkinson's disease—an evidence-based medicine review. *Movement Disorders*, *34*(2), 180-198.
- Seppi, K., Weintraub, D., Coelho, M., Perez-Lloret, S., Fox, S. H., Katzenschlager, R., . . . Sampaio, C. (2011). The Movement Disorder Society Evidence-Based Medicine

- Review Update: Treatments for the non-motor symptoms of Parkinson's disease. *Mov Disord*, 26 Suppl 3(0 3), S42-80. doi:10.1002/mds.23884
- Sgambato-Faure, V., & Cenci, M. A. (2012). Glutamatergic mechanisms in the dyskinesias induced by pharmacological dopamine replacement and deep brain stimulation for the treatment of Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*, 96(1), 69-86.
- Shank, R., & Aprison, M. (1970). The metabolism in vivo of glycine and serine in eight areas of the rat central nervous system 1. *Journal of neurochemistry*, 17(10), 1461-1475.
doi:<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1970.tb00513.x>
- Sharma, J., Bachmann, C., & Linazasoro, G. (2010). Classifying risk factors for dyskinesia in Parkinson's disease. *Parkinsonism and related disorders*, 16(8), 490-497.
- Sharma, V. D., Lyons, K. E., & Pahwa, R. J. T. (2018). Amantadine extended-release capsules for levodopa-induced dyskinesia in patients with Parkinson's disease. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 665-673.
doi:<https://doi.org/10.2147%2FTCRM.S144481>
- Shen, W., Ren, W., Zhai, S., Yang, B., Vanoye, C. G., Mitra, A., . . . Surmeier, D. J. (2020). Striatal Kir2 K⁺ channel inhibition mediates the antidyskinetic effects of amantadine. *The Journal of clinical investigation*, 130(5), 2593-2601.
- Shi, L., Huang, C., Luo, Q., Xia, Y., Liu, W., Zeng, W., . . . Zhengli, C. (2020). Clioquinol improves motor and non-motor deficits in MPTP-induced monkey model of Parkinson's disease through AKT/mTOR pathway. *Aging*, 12(10), 9515.

- Shih, J. C., Chen, K., & Ridd, M. (1999). Role of MAO A and B in neurotransmitter metabolism and behavior. *Polish journal of pharmacology*, *51*(1), 25-29.
- Shill, H. A., & Stacy, M. (2009). Update on ropinirole in the treatment of Parkinson's disease. *Neuropsychiatric disease and treatment*, *5*, 33-36.
- Shotbolt, P., Samuel, M., & David, A. (2010). Quetiapine in the treatment of psychosis in Parkinson's disease. *Therapeutic advances in neurological disorders*, *3*(6), 339-350. doi:10.1177/1756285610389656
- Shoulson, I., Penney, J., McDermott, M., Schwid, S., Kayson, E., Chase, T., . . . Parkinson Study, G. (2001). A randomized, controlled trial of remacemide for motor fluctuations in Parkinson's disease. *Neurology*, *56*(4), 455-462. doi:10.1212/wnl.56.4.455
- Sid-Otmane, L., Hamadjida, A., Nuara, S. G., Bédard, D., Gaudette, F., Gourdon, J. C., . . . Huot, P. (2020). Selective metabotropic glutamate receptor 2 positive allosteric modulation alleviates L-DOPA-induced psychosis-like behaviours and dyskinesia in the MPTP-lesioned marmoset. *European Journal of Pharmacology*, *873*, 172957.
- Singer, P., & Yee, B. K. (2017). Pharmacotherapy through the inhibition of glycine transporters: an update on and beyond schizophrenia. *Psychiatry Neuroscience Update-Vol. II*, 389-403.
- Sivertsen, B., Dupont, E., Mikkelsen, B., Mogensen, P., Rasmussen, C., Boesen, F., & Heinonen, E. (1989). Selegiline and levodopa in early or moderately advanced

- Parkinson's disease: a double-blind controlled short-and long-term study. *Acta Neurologica Scandinavica*, 80, 147-152.
- Smeyne, R. J., & Jackson-Lewis, V. (2005). The MPTP model of Parkinson's disease. *Molecular brain research*, 134(1), 57-66.
- Smith, K. E., Borden, L. A., Hartig, P. R., Branchek, T., & Weinshank, R. L. (1992). Cloning and expression of a glycine transporter reveal colocalization with NMDA receptors. *Neuron*, 8(5), 927-935.
- Snyder, S. (1975). Fifth Gaddum Memorial Lecture, University of Bristol, September 1974, The glycine synaptic receptor in the mammalian central nervous system. *British Journal of Pharmacology*, 53(4), 473.
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119, 7-35. doi:<https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Solano, R. M., Casarejos, M. J., Menéndez-Cuervo, J., Rodriguez-Navarro, J. A., de Yébenes, J. G., & Mena, M. A. (2008). Glial dysfunction in parkin null mice: effects of aging. *Journal of Neuroscience*, 28(3), 598-611. doi:<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4609-07.2008>
- Solís, O., Garcia-Montes, J. R., González-Granillo, A., Xu, M., & Moratalla, R. (2017). Dopamine D3 receptor modulates l-DOPA-induced dyskinesia by targeting D1 receptor-mediated striatal signaling. *Cerebral cortex*, 27(1), 435-446.

- Solla, P., Masala, C., Pinna, I., Frau, C., Ercoli, T., & Defazio, G. (2022). Olfactory hallucinations in Parkinson's disease patients and the role of their evaluation in clinical practice. *Parkinsonism and related disorders*, *102*, 141.
- Soto-Otero, R., Méndez-Álvarez, E., Hermida-Ameijeiras, Á., Muñoz-Patiño, A. M., & Labandeira-Garcia, J. L. (2000). Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, *74*(4), 1605-1612.
- Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M., & Goedert, M. (1998). α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(11), 6469-6473.
- Sriram, K., Pai, K. S., Boyd, M. R., & Ravindranath, V. (1997). Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: in vitro and in vivo studies in mice. *Brain research*, *749*(1), 44-52.
- Stahl, S. M. (2007). Beyond the dopamine hypothesis to the NMDA glutamate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. *CNS spectrums*, *12*(4), 265-268.
doi:<https://doi.org/10.1017/S1092852900021015>
- Stahl, S. M. (2016). Parkinson's disease psychosis as a serotonin-dopamine imbalance syndrome. *CNS spectrums*, *21*(5), 355-359.

- Stebbins, G., Goetz, C., Carrillo, M., Bangen, K., Turner, D., Glover, G., & Gabrieli, J. (2004). Altered cortical visual processing in PD with hallucinations: an fMRI study. *Neurology*, 63(8), 1409-1416.
doi:<https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000141853.27081.BD>
- Steece-Collier, K., Chambers, L. K., Jaw-Tsai, S. S., Menniti, F. S., & Greenamyre, J. T. (2000). Antiparkinsonian actions of CP-101,606, an antagonist of NR2B subunit-containing N-methyl-d-aspartate receptors. *Experimental neurology*, 163(1), 239-243.
- Stocchi, F. (2011). Continuous dopaminergic stimulation and novel formulations of dopamine agonists. *Journal of neurology*, 258(2), 316-322.
- Stocchi, F., Borgohain, R., Onofri, M., Schapira, A. H., Bhatt, M., Lucini, V., . . . Investigators, S. (2012). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of safinamide as add-on therapy in early Parkinson's disease patients. *Movement Disorders*, 27(1), 106-112.
- Stocchi, F., Fossati, B., & Torti, M. (2020). Safety considerations when using non-ergot dopamine agonists to treat Parkinson's disease. *Expert Opinion on Drug Safety*, 19(9), 1155-1172.
- Stroebel, D., Mony, L., & Paoletti, P. (2021). Glycine agonism in ionotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology*, 193, 108631.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108631>

Sun, L., Shen, R., Agnihotri, S. K., Chen, Y., Huang, Z., & Büeler, H. (2018). Lack of PINK1 alters glia innate immune responses and enhances inflammation-induced, nitric oxide-mediated neuron death. *Scientific Reports*, 8(1), 1-16.

doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-017-18786-w>

Supplisson, S., & Bergman, C. (1997). Control of NMDA receptor activation by a glycine transporter co-expressed in *Xenopus* oocytes. *Journal of Neuroscience*, 17(12), 4580-4590.

Supplisson, S., & Roux, M. (2002). Why glycine transporters have different stoichiometries. *FEBS letters*, 529(1), 93-101.

Surmeier, D. J., Obeso, J. A., & Halliday, G. M. (2017). Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(2), 101-113.

Taher, A., Viprakasit, V., Cappellini, M. D., Kraus, D., Cech, P., Dietmar, V., . . . Dukart, J. (2018). Phase 2 Clinical Trial Results for Bitopertin, an Oral Glycine Transporter 1 Inhibitor, in Patients with Non-Transfusion Dependent Beta-Thalassemia. In: Am Soc Hematology.

Taher, A. T., Viprakasit, V., Cappellini, M. D., Kraus, D., Cech, P., Volz, D., . . . Khwaja, O. (2021). Haematological effects of oral administration of bitopertin, a glycine transport inhibitor, in patients with non-transfusion-dependent β -thalassaemia. *British journal of haematology*.

- Tanik, S. A., Schultheiss, C. E., Volpicelli-Daley, L. A., Brunden, K. R., & Lee, V. M. (2013). Lewy Body-like α -Synuclein Aggregates Resist Degradation and Impair Macroautophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 288(21), 15194-15210.
- Tanner, C. M., Kamel, F., Ross, G. W., Hoppin, J. A., Goldman, S. M., Korell, M., . . . Chade, A. R. (2011). Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environmental health perspectives*, 119(6), 866-872.
- Targum, S. D., & Abbott, J. L. (2000). Efficacy of quetiapine in Parkinson's patients with psychosis. *J Clin Psychopharmacol*, 20(1), 54-60. doi:10.1097/00004714-200002000-00010
- Theodore, S., Cao, S., McLean, P. J., & Standaert, D. G. (2008). Targeted overexpression of human α -synuclein triggers microglial activation and an adaptive immune response in a mouse model of Parkinson disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 67(12), 1149-1158.
- Thompson, L. T., Moskal, J. R., & Disterhoft, J. F. (1992). Hippocampus-dependent learning facilitated by a monoclonal antibody or D-cycloserine. *Nature*, 359(6396), 638-641.
- Tison, F., Durif, F., Corvol, J. C., Eggert, K., Trenkwalder, C., Lew, M., . . . Rascol, O. (2013). Safety, Tolerability and Anti-Dyskinetic Efficacy of Dipraglurant, a Novel mGluR5 Negative Allosteric Modulator (NAM) in Parkinson's Disease (PD) Patients with Levodopa-Induced Dyskinesia (LID). In *Neurology* (Vol. 80): AAN Enterprises.

- Tison, F., Keywood, C., Wakefield, M., Durif, F., Corvol, J. C., Eggert, K., . . . Poli, S. M. (2016). A phase 2a trial of the novel mglur5-negative allosteric modulator dipraglurant for levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, *31*(9), 1373-1380.
- Toyohara, J., Ishiwata, K., Sakata, M., Wu, J., Nishiyama, S., Tsukada, H., & Hashimoto, K. (2011). In vivo evaluation of carbon-11-labelled non-sarcosine-based glycine transporter 1 inhibitors in mice and conscious monkeys. *Nuclear medicine and biology*, *38*(4), 517-527.
- Truban, D., Hou, X., Caulfield, T. R., Fiesel, F. C., & Springer, W. (2017). PINK1, Parkin, and mitochondrial quality control: what can we learn about Parkinson's disease pathobiology? *Journal of Parkinson's disease*, *7*(1), 13-29.
- Tsai, C. H., Huang, H. C., Liu, B. L., Li, C. I., Lu, M. K., Chen, X., . . . Lane, H. Y. (2014). Activation of N-methyl-D-aspartate receptor glycine site temporally ameliorates neuropsychiatric symptoms of Parkinson's disease with dementia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, *68*(9), 692-700.
- Tsai, G., Ralph-Williams, R. J., Martina, M., Bergeron, R., Berger-Sweeney, J., Dunham, K. S., . . . Coyle, J. T. (2004). Gene knockout of glycine transporter 1: characterization of the behavioral phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(22), 8485-8490.

- Tsuboi, Y., & Dickson, D. W. J. P. (2005). Dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease with dementia: are they different? *Parkinsonism and related disorders*, *11*, S47-S51.
- U.S. Food and Drug Administration. (2018). FDA analysis finds no new or unexpected safety risks associated with Nuplazid (pimavanserin), a medication to treat the hallucinations and delusions of Parkinson's disease psychosis. Retrieved from <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-analysis-finds-no-new-or-unexpected-safety-risks-associated-nuplazid-pimavanserin-medication>
- Ungerstedt, U., & Arbuthnott, G. W. (1970). Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain research*, *24*(3), 485-493.
- Van Vlieta, S., Blezer, E., Jongsma, M., Vanwersch, R., Olivier, B., & Philippens, I. (2008). Exploring the neuroprotective effects of modafinil in a marmoset Parkinson model with immunohistochemistry, magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Brain research*, *1189*, 219-228.
- Vanover, K. E., Weiner, D. M., Makhay, M., Veinbergs, I., Gardell, L. R., Lamah, J., . . . Davis, R. E. (2006). Pharmacological and Behavioral Profile of N-(4-Fluorophenylmethyl)-N>-(1-methylpiperidin-4-yl)-N'-(4-(2-methylpropyloxy)phenylmethyl) Carbamide (2R,3R)-Dihydroxybutanedioate (2:1) (ACP-103), a Novel 5-Hydroxytryptamine 2A Receptor Inverse Agonist. *Journal of*

Pharmacology and Experimental Therapeutics, 317(2), 910-918.

doi:10.1124/jpet.105.097006

Varanese, S., Howard, J., & Di Rocco, A. (2010). NMDA antagonist memantine improves levodopa-induced dyskinesias and “On-off” phenomena in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 25(4), 508-510.

Verhagen Metman, L., Blanchet, P. J., van den Munckhof, P., Del Dotto, P., Natta, R., & Chase, T. N. (1998a). A trial of dextromethorphan in parkinsonian patients with motor response complications. *Mov Disord*, 13(3), 414-417. doi:10.1002/mds.870130307

Verhagen Metman, L., Del Dotto, P., Natta, R., van den Munckhof, P., & Chase, T. N. (1998b). Dextromethorphan improves levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Neurology*, 51(1), 203-206. doi:10.1212/wnl.51.1.203

Vidailhet, M., Bonnet, A., Marconi, R., Durif, F., & Agid, Y. (1999). The phenomenology of L-dopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 14, 13-18.

Visanji, N. P., Brotchie, J. M., Kalia, L. V., Koprach, J. B., Tandon, A., Watts, J. C., & Lang, A. E. (2016). α -Synuclein-based animal models of Parkinson's disease: challenges and opportunities in a new era. *Trends in neurosciences*, 39(11), 750-762.

Visanji, N. P., Gomez-Ramirez, J., Johnston, T. H., Pires, D., Voon, V., Brotchie, J. M., & Fox, S. H. (2006). Pharmacological characterization of psychosis-like behavior in the

- MPTP-lesioned nonhuman primate model of Parkinson's disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 21(11), 1879-1891.
- Walker, L., Stefanis, L., & Attems, J. (2019). Clinical and neuropathological differences between Parkinson's disease, Parkinson's disease dementia and dementia with Lewy bodies—current issues and future directions. *Journal of neurochemistry*, 150(5), 467-474.
- Wang, Q., Li, J., Wei, X., Liao, J., Xu, Y., Lu, T., . . . Huang, X. (2014). Alterations of NMDA receptor binding in various brain regions among 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonian rats. *International Journal of Neuroscience*, 124(6), 457-465.
- Wang, Y., & Le, W.-D. (2019). Autophagy and ubiquitin-proteasome system. In Z.-H. Qin (Ed.), *Autophagy: biology and diseases* (Vol. 1206, pp. 527-550): Springer, Singapore.
- Ward, K. M., & Citrome, L. (2018). Antipsychotic-related movement disorders: Drug-induced parkinsonism vs. tardive dyskinesia—Key differences in pathophysiology and clinical management. *Neurology and therapy*, 7, 233-248.
- Watson, M. B., Richter, F., Lee, S. K., Gabby, L., Wu, J., Masliah, E., . . . Chesselet, M.-F. (2012). Regionally-specific microglial activation in young mice over-expressing human wildtype alpha-synuclein. *Experimental neurology*, 237(2), 318-334.
- Weintraub, D., Aarsland, D., Chaudhuri, K. R., Dobkin, R. D., Leentjens, A. F., Rodriguez-Violante, M., & Schrag, A. (2022). The neuropsychiatry of Parkinson's disease: advances and challenges. *The Lancet Neurology*, 21(1), 89-102.

- Wenthold, R. J., & Hunter, C. (1990). *Immunocytochemistry of glycine and glycine receptors in the central auditory system*: John Wiley and Sons, Ltd., New York.
- Werling, L. L., Keller, A., Frank, J. G., & Nuwayhid, S. J. (2007). A comparison of the binding profiles of dextromethorphan, memantine, fluoxetine and amitriptyline: treatment of involuntary emotional expression disorder. *Exp Neurol*, *207*(2), 248-257. doi:10.1016/j.expneurol.2007.06.013
- Wichmann, T., & DeLong, M. R. (1996). Functional and pathophysiological models of the basal ganglia. *Current opinion in neurobiology*, *6*(6), 751-758.
- Williams, D. R., Warren, J. D., & Lees, A. J. (2008). Using the presence of visual hallucinations to differentiate Parkinson's disease from atypical parkinsonism. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, *79*(6), 652-655.
- Wilson, J. S., Turner, B. H., Morrow, G. D., & Hartman, P. J. (1987). MPTP produces a mosaic-like pattern of terminal degeneration in the caudate nucleus of dog. *Brain research*, *423*(1-2), 329-332.
- Wilton, D. K., Dissing-Olesen, L., & Stevens, B. (2019). Neuron-glia signaling in synapse elimination. *Annual review of neuroscience*, *42*, 107-127.
- Winslow, A. R., Chen, C.-W., Corrochano, S., Acevedo-Arozena, A., Gordon, D. E., Peden, A. A., . . . Imarisio, S. (2010). α -Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *Journal of Cell Biology*, *190*(6), 1023-1037.

- Winter, M., Funk, J., Körner, A., Alberati, D., Christen, F., Schmitt, G., . . . Singer, T. (2016). Effects of GlyT1 inhibition on erythropoiesis and iron homeostasis in rats. *Experimental hematology*, 44(10), 964-974.
- Wolf, E., Seppi, K., Katzenschlager, R., Hochschorner, G., Ransmayr, G., Schwingenschuh, P., . . . Auff, E. (2010). Long-term antidyskinetic efficacy of amantadine in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 25(10), 1357-1363.
- Wolters, E. C. (1999). Dopaminomimetic psychosis in Parkinson's disease patients: diagnosis and treatment. *Neurology*, 52(7 Suppl 3), S10-13.
- Wood, L. D. (2010). Clinical review and treatment of select adverse effects of dopamine receptor agonists in Parkinson's disease. *Drugs aging*, 27(4), 295-310.
- Wu, P.-L., Tang, H.-S., Lane, H.-Y., Tsai, C.-A., & Tsai, G. E. (2011). Sarcosine therapy for obsessive compulsive disorder: a prospective, open-label study. *Journal of clinical psychopharmacology*, 31(3), 369-374.
- Yang, C. R., & Svensson, K. A. (2008). Allosteric modulation of NMDA receptor via elevation of brain glycine and D-serine: the therapeutic potentials for schizophrenia. *Pharmacology and therapeutics*, 120(3), 317-332.
- Yue, Z., & Lachenmayer, M. L. (2011). Genetic LRRK2 models of Parkinson's disease: Dissecting the pathogenic pathway and exploring clinical applications. *Movement Disorders*, 26(8), 1386-1397.

Zafra, F., Aragon, C., Olivares, L., Danbolt, N. C., Gimenez, C., & Storm-Mathisen, J. (1995). Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *Journal of Neuroscience*, *15*(5), 3952-3969.

Zaja-Milatovic, S., Milatovic, D., Schantz, A., Zhang, J., Montine, K., Samii, A., . . . Montine, T. (2005). Dendritic degeneration in neostriatal medium spiny neurons in Parkinson disease. *Neurology*, *64*(3), 545-547.

Zeng, B. Y., Bukhatwa, S., Hikima, A., Rose, S., & Jenner, P. (2006a). Reproducible nigral cell loss after systemic proteasomal inhibitor administration to rats. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association the Child Neurology Society*, *60*(2), 248-252.

Zeng, B. Y., Iravani, M. M., Lin, S. T., Irifune, M., Kuoppamäki, M., Al-Barghouthy, G., . . . Medhurst, A. (2006b). MPTP treatment of common marmosets impairs proteasomal enzyme activity and decreases expression of structural and regulatory elements of the 26S proteasome. *European Journal of Neuroscience*, *23*(7), 1766-1774.

Zeng, Z., O'Brien, J. A., Lemaire, W., O'Malley, S. S., Miller, P. J., Zhao, Z., . . . Sur, C. (2008). A novel radioligand for glycine transporter 1: characterization and use in autoradiographic and in vivo brain occupancy studies. *Nuclear medicine and biology*, *35*(3), 315-325.

Zhang, Q.-S., Heng, Y., Yuan, Y.-H., & Chen, N.-H. (2017). Pathological α -synuclein exacerbates the progression of Parkinson's disease through microglial activation. *Toxicology letters*, *265*, 30-37.

6. ANNEXES

Échelles d'évaluation comportementales

Tableau S. 1. Échelle d'évaluation des mouvements anormaux involontaires chez le rat lésé à la 6-OHDA

paramètre	score
durée	
axial	0 = absence de dyskinésie; 1 = dyskinésie légère, présente pendant moins que 50% de la période d'observation;
membres	2 = dyskinésie modérée, présente plus que 50% de la période d'observation; 3 = dyskinésie marquée, présente de manière continue plus que 50% de la période d'observation, mais suppressible avec un stimulus externe;
oro-lingual	4 = dyskinésie sévère continue, qui n'est pas suppressible avec un stimulus externe.
amplitude	
axial	0 = absence de dyskinésie; 1 = une déviation soutenue avec un angle de 30° de la tête et du cou; 2 = une déviation soutenue avec un angle de 60° de la tête et du cou; 3 = une déviation soutenue avec un angle supérieur à 60 et inférieur à 90° de la tête, du torse et du cou; 4 = une torsion soutenue avec un angle supérieur à 90° de la tête, du torse et du cou, menant à une perte d'équilibre.
membres	0 = absence de dyskinésie; 1 = petits mouvements de la patte autour du museau avec une position fixe; 2 = déplacement de l'ensemble du membre (horizontal ou de haut en bas); 3 = grand déplacement du membre avec contraction visible du muscle de l'épaule; 4 = déplacement vigoureux des membres à une amplitude maximale, avec contraction des deux groupes musculaires de l'épaule et des muscles extenseurs.
oro-lingual	0 = absence de dyskinésie; 1 = contractions des muscles faciaux accompagnées de petits mouvements masticateurs sans ouverture de la mâchoire; 2 = contractions musculaires du visage, accompagnées de mouvements masticateurs, et de l'ouverture de la mâchoire; 3 = mouvements impliquant les muscles faciaux et les muscles masticateurs, avec ouverture fréquente de la mâchoire et protrusion occasionnelle de la langue; 4 = implication de toutes les catégories musculaires ci-dessus au niveau maximal.

Tableau S. 2. Échelle d'évaluation de la dyskinésie induite par la L-DOPA chez le ouistiti lésé au MPTP

comportement	score
amplitude des mouvement	0 = courir, sauter et utiliser les membres pour différentes activités;
	1 = monter et descendre des murs ou le long d'un perchoir;
	2 = grimper sur le mur de la cage / sur le perchoir;
	3 = sauter sur le sol de la cage;
	4 = marcher sur le sol de la cage;
	5 = mouvement des membres, mais pas de locomotion, sur le mur de la cage ou du perchoir;
	6 = mouvement de la tête, sur le mur de la cage ou sur le perchoir;
	7 = mouvement des membres mais pas de locomotion, sur le sol de la cage;
	8 = mouvement de tête, sur le sol de la cage;
9 = aucun mouvement.	
bradykinésie	0 = initiation et vitesse de mouvement normales;
	1 = ralentissement du mouvement;
	2 = ralentissement modéré du mouvement, difficulté à initier et maintenir le mouvement;
	3 = figement prolongée, akinésie et immobilité.
posture	0 = équilibre normal avec une posture droite du corps et la tête relevée;
	1 = équilibre altéré, posture du corps courbée avec la tête baissée.
attention/vigilance	0 = tête normale la vérification et le mouvement du cou sont fluides dans différentes directions et dans de petits mouvements;
	1 = moins ou pas de contrôle de la tête et la tête est dans la même position pendant plus de 50 % du temps.

Tableau S. 3. Échelle d'évaluation de la dyskinésie induite par la L-DOPA chez le ouistiti lésé au MPTP

comportement	score
chorée	0 = absent;
	1 = légère, passagère, présente moins de 70 % de la période d'observation;
	2 = modérée, présente plus de 70 % de la période d'observation, mais n'interférant pas avec l'activité normale;
	3 = marqué, présente moins de 70% de la période d'observation et interférant parfois avec l'activité normale;
	4 = sévère, invalidant, présente plus de 70% de la période d'observation et interférant avec l'activité normale.
dystonie	0 = absent;
	1 = légère, passagère, présente moins de 70 % de la période d'observation;
	2 = modérée, présente plus de 70 % de la période d'observation, mais n'interférant pas avec l'activité normale;
	3 = marqué, présente moins de 70% de la période d'observation et interférant parfois avec l'activité normale;
	4 = sévère, invalidant, présente plus de 70% de la période d'observation et interférant avec l'activité normale.

Tableau S. 4. Échelle d'évaluation des comportements de types psychotiques chez le ouistiti lésé au MPTP

comportement	score
Hyperkinésie	0 = absente;
	1 = légère, présente moins de 30% de la période d'observation et l'animal est capable d'avoir une activité normale;
	2 = modérée, présente plus de 30% de la période d'observation et l'animal est capable d'avoir une activité normale;
	3 = marquée, présente moins de 30% de la période d'observation et remplaçant l'activité normale;
	4 = sévère, présente plus de 30% de la période d'observation et remplaçant l'activité normale.
réponse à un stimulus non-apparent	0 = absente;
	1 = légère, présente moins de 30% de la période d'observation et l'animal est capable d'avoir une activité normale;
	2 = modérée, présente plus de 30% de la période d'observation et l'animal est capable d'avoir une activité normale;
	3 = marquée, présente moins de 30% de la période d'observation et remplaçant l'activité normale;
	4 = sévère, présente plus de 30% de la période d'observation et remplaçant l'activité normale.
toiletage excessif	0 = absent;
	1 = léger, présent moins de 30% de la période d'observation et l'animal est capable d'avoir une activité normale;
	2 = modéré, présent plus de 30% de la période d'observation et l'animal est capable d'avoir une activité normale;
	3 = marqué, présent moins de 30% de la période d'observation et remplaçant l'activité normale;
	4 = sévère, présent plus de 30% de la période d'observation et remplaçant l'activité normale.

	0 = absentes;
	1 = légères, présentes moins de 30% de la période d'observation et l'animal est capable d'avoir une activité normale;
stéréotypies	2 = modérées, présentes plus de 30% de la période d'observation et l'animal est capable d'avoir une activité normale;
	3 = marquées, présentes moins de 30% de la période d'observation et remplaçant l'activité normale;
	4 = sévères, présentes plus de 30% de la période d'observation et remplaçant l'activité normale.

Liste des publications lors du doctorat

Revue de littérature

1. **Frouni, I.**, & Huot, P. (2022). Glutamate modulation for the treatment of levodopa induced dyskinesia: A brief review of the drugs tested in the clinic. *Neurodegenerative Disease Management*, 12(04), 203-214.
2. Huot, P., Kang, W., Kim, E., Bédard, D., Belliveau, S., **Frouni, I.**, & Kwan, C. (2022). Levodopa-induced dyskinesia: A brief review of the ongoing clinical trials. *Neurodegenerative Disease Management*, 12(2), 51-55.
3. Hamadjida, A., **Frouni, I.**, Kwan, C., & Huot, P. (2019). Classic animal models of Parkinson's disease: A historical perspective. *Behavioural Pharmacology*, 30(4), 291-310.

Chapitres de livre

1. Kwan, C., Kang, W., Kim, E., Belliveau, S., **Frouni, I.**, & Huot, P. (2022). Metabotropic glutamate receptors in Parkinson's disease. *International Review of Neurobiology*, 168, 1-31.
2. **Frouni, I.**, Kwan, C., Belliveau, S., & Huot, P. (2022). Cognition and serotonin in Parkinson's disease. *Prog. Brain Res.*, 269, 373-403.
3. Kwan, C., **Frouni, I.**, & Huot, P. (2020). Pharmacotherapy of Psychosis in Parkinson's Disease. *NeuroPsychopharmacotherapy*, 1-39.

Articles scientifiques

1. **Frouni, I.**, Bédard, D., Bourgeois-Cayer, É., Hamadjida, A., Gaudette, F., Beaudry, F., & Huot, P. (2023). Pharmacokinetic profile of bitopertin, a selective GlyT1 inhibitor, in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 1-8.
2. **Frouni, I.**, Kwan, C., Belliveau, S., Hamadjida, A., Bédard, D., Nuara, S. G., ... & Huot, P. (2023). Anti-parkinsonian effect of the mGlu2 positive allosteric modulator LY-487,379 as monotherapy and adjunct to a low L-DOPA dose in the MPTP-lesioned marmoset. *European Journal of Pharmacology*, 939, 175429.
3. Kwan, C., Lévesque, C., Bédard, D., **Frouni, I.**, Yesuf, J. M., Hamadjida, A., ... & Huot, P. (2022). Autoradiographic labelling of 5-HT3 receptors in the hemi-parkinsonian rat brain. *Neuroscience Research*, 177, 135-144.
4. Kwan, C., **Frouni, I.**, Nuara, S. G., Belliveau, S., Kang, W., Hamadjida, A., ... & Huot, P. (2021). Combined 5-HT2A and mGlu2 modulation for the treatment of dyskinesia and psychosis in Parkinson's disease. *Neuropharmacology*, 186, 108465.
5. **Frouni, I.**, Belliveau, S., Maddaford, S., Nuara, S. G., Gourdon, J. C., & Huot, P. (2021). Effect of the glycine transporter 1 inhibitor ALX-5407 on dyskinesia, psychosis-like behaviours and parkinsonism in the MPTP-lesioned marmoset. *European Journal of Pharmacology*, 910, 174452.
6. **Frouni, I.**, Kwan, C., Nuara, S. G., Belliveau, S., Kang, W., Hamadjida, A., ... & Huot, P. (2021). Effect of the mGlu 2 positive allosteric modulator CBiPES on dyskinesia, psychosis-like behaviours and parkinsonism in the MPTP-lesioned marmoset. *Journal of Neural Transmission*, 128, 73-81.

7. Kwan, C., **Frouni, I.**, Bédard, D., Hamadjida, A., & Huot, P. (2021). Granisetron, a selective 5-HT₃ antagonist, reduces L-3, 4-dihydroxyphenylalanine-induced abnormal involuntary movements in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat. *Behavioural Pharmacology*, 32(1), 43-53.
8. Kwan, C., Bédard, D., **Frouni, I.**, Gaudette, F., Beaudry, F., Hamadjida, A., & Huot, P. (2020). Pharmacokinetic profile of the selective 5-HT₃ receptor antagonist ondansetron in the rat: an original study and a minireview of the behavioural pharmacological literature in the rat. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 98(7), 431-440.
9. Hamadjida, A., Sid-Otmane, L., Kwan, C., **Frouni, I.**, Nafade, V., Bédard, D., ... & Huot, P. (2020). The highly selective mGlu₂ receptor positive allosteric modulator LY-487,379 alleviates l-DOPA-induced dyskinesia in the 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience*, 51(12), 2412-2422.
10. Kwan, C., **Frouni, I.**, Bédard, D., Hamadjida, A., & Huot, P. (2020). Ondansetron, a highly selective 5-HT₃ receptor antagonist, reduces L-DOPA-induced dyskinesia in the 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease. *European Journal of Pharmacology*, 871, 172914.
11. Nuara, S. G., Hamadjida, A., Kwan, C., Bédard, D., **Frouni, I.**, Gourdon, J. C., & Huot, P. (2020). Combined mGlu₂ orthosteric stimulation and positive allosteric modulation alleviates l-DOPA-induced psychosis-like behaviours and dyskinesia in the parkinsonian marmoset. *Journal of Neural Transmission*, 127, 1023-1029.
12. **Frouni, I.**, Gaudette, F., Bédard, D., Nuara, S. G., Kwan, C., Hamadjida, A., ... & Huot, P. (2020). Development and validation of a sensitive HPLC-HESI-MS/MS method for

- quantitative determination of bitopertin in rat and marmoset plasma. *MNI Open Research*, 4, 2.
13. Hamadjida, A., Nuara, S. G., Kwan, C., **Frouni, I.**, Bédard, D., Gourdon, J. C., & Huot, P. (2020). Monoamine oxidase A inhibition with moclobemide enhances the anti-parkinsonian effect of L-DOPA in the MPTP-lesioned marmoset. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 393, 2157-2164.
 14. Hamadjida, A., Nuara, S. G., **Frouni, I.**, Kwan, C., Bédard, D., Gourdon, J. C., & Huot, P. (2020). Monoamine oxidase A inhibition as monotherapy reverses parkinsonism in the MPTP-lesioned marmoset. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 393, 2139-2144.
 15. Kwan, C., **Frouni, I.**, Bédard, D., Nuara, S. G., Gourdon, J. C., Hamadjida, A., & Huot, P. (2019). 5-HT 2A blockade for dyskinesia and psychosis in Parkinson's disease: is there a limit to the efficacy of this approach? A study in the MPTP-lesioned marmoset and a literature mini-review. *Experimental Brain Research*, 237, 435-442.
 16. **Frouni, I.**, Kwan, C., Bédard, D., Belliveau, S., Bourgeois-Cayer, E., Gaudette, F., ... & Huot, P. (2019). Effect of the selective 5-HT 2A receptor antagonist EMD-281,014 on l-DOPA-induced abnormal involuntary movements in the 6-OHDA-lesioned rat. *Experimental brain research*, 237, 29-36.
 17. Gaudette, F., Bedard, D., Kwan, C., **Frouni, I.**, Hamadjida, A., Beaudry, F., & Huot, P. (2019). Highly sensitive HPLC-MS/MS assay for the quantitation of ondansetron in rat plasma and rat brain tissue homogenate following administration of a very low subcutaneous dose. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 175, 112766.