

Université de Montréal

**Nur77 au sein des désordres dopaminergiques inhérents
à la schizophrénie, la maladie de Parkinson ou la
dépendance aux drogues d'abus**

Par

Emmanuelle Bourhis

Faculté de pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.
en sciences pharmaceutiques
Option pharmacologie

Août, 2012

© Emmanuelle Bourhis, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :
Nur77 au sein des désordres dopaminergiques inhérents à la schizophrénie, la maladie de
Parkinson ou la dépendance aux drogues d'abus

Présentée par :
Emmanuelle Bourhis

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Sylvie Marleau, président-rapporteur
Dr Daniel Lévesque, directeur de recherche
Dr Claude Rouillard, co-directeur
Dr Graciela Pineyro, membre du jury
Dr Michel Cyr, examinateur externe
Dr Sylvie Marleau, représentant du doyen de la FES

Résumé

Cette thèse vise à mieux comprendre le rôle du facteur de transcription Nur77 au sein des fonctions physiologiques et pathologiques des voies de neurotransmission dopaminergiques des ganglions de la base. Nous basant sur une implication motrice de Nur77 au sein des dyskinésies induites à la L-DOPA (LIDs), nous avons voulu tester *in vivo* son implication éventuelle dans les phénomènes moteurs et de sensibilisation associés à l'amphétamine ainsi qu'une implication possible du récepteur nucléaire aux rétinoïdes RXR dont nous avons déjà démontré une implication dans les effets moteurs des antipsychotiques. Un deuxième volet de la recherche a consisté en l'étude de l'implication des *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) et de la protéine kinase C (PKC) dans l'induction de l'ARNm des membres de la famille des NURS suite à l'activation des cascades de signalisation des récepteurs dopaminergiques D1 et D2 *in vivo* pour une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques liés aux désordres dopaminergiques.

Pour ce faire, nous avons, premièrement, soumis des souris sauvages et Nur77^{-/-} à un paradigme de sensibilisation à l'amphétamine ainsi qu'à différents agonistes antagonistes RAR/RXR afin de tester l'implication de Nur77 et d'un éventuel complexe Nur77/RXR dans les effets de l'amphétamine. Deuxièmement, soumis des souris sauvages à une combinaison d'agonistes D1/D2 ou une injection d'antagoniste D2 avec ou sans inhibiteur (ERK1/2 ou PKC) afin de tester l'implication de ces kinases sur l'induction de l'ARNm des membres de la famille des NURS par hybridation *in situ*.

Nous avons ainsi pu démontrer 1- un rôle moteur de Nur77 dans les effets liés à l'amphétamine notamment avec une absence de stéréotypies et un allongement de la durée de la phase de locomotion chez les souris Nur77^{-/-}; ainsi qu'un rôle éventuel du complexe potentiel Nur77/RXR dans les D1 à mieux définir. 2- un rôle des kinases ERKs et PKCs dans les cascades de signalisation des récepteurs dopaminergiques D1 et D2 menant à l'induction des ARNm de Nur77, Nor-1 et Nurr-1.

En perspective, ces résultats nous ouvrent la voie vers une implication éventuelle de Nur77 dans les mécanismes d'apprentissage que sont le Long Terme Potentiation (LTP) et la Long Terme Depotentialisation (LTD) liés aux LIDs et à l'amphétamine.

Mots-clés : Nur77, RXR, dopamine, L-DOPA, antipsychotiques, amphétamine, ERK, PKC, Long Terme Potentiation (LTP), Long Terme Depotentialisation (LTD).

Abstract

This thesis aims to better understand the role of the transcription factor Nur77 in the physiological and pathological functions of dopaminergic neurotransmission pathways of the basal ganglia. Based on a motor involvement of Nur77 in L-DOPA induced dyskinesias (LIDs), we wanted to test its possible involvement in the motor mechanisms associated with amphetamine, a drug of abuse that targets the direct neuronal population of the basal ganglia such as L-DOPA. Involvement of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and protein kinase C (PKC) has been widely demonstrated in the LIDs and the effects of amphetamine, we wanted to know whether Nur77 mRNA was controlled by these kinases in both the striatonigral and striatopallidal neurons in response to specific activation of the D1 and D2 receptors *in vivo*. Finally, a possible involvement of RXR has been demonstrated in the motor effects of antipsychotic drugs, so we wanted to test its potential involvement in the effects of amphetamine.

To do this, we subjected wild-type mice and Nur77^{-/-} mice to a paradigm of sensitization to amphetamine with or without RXR agonist (DHA) and antagonist (HX531) to test: 1 - the involvement of Nur77 in the motor effects and the phenomenon of sensitization to amphetamine and 2 - the involvement of any complex Nur77/RXR in these effects. Second, wild-type mice were subjected to a combination of D1/D2 agonists or antagonists D2 with or without ERK inhibitor or PKC inhibitor to test *in vivo* the induction of the mRNA of the Nur members family by *in situ* hybridization.

We were able to demonstrate a role of Nur77 in the motor effects associated with amphetamine namely in the absence of stereotypy and a lengthening of the duration of the phase of locomotion in Nur77^{-/-} mice; and a possible role of the potential complex Nur77/RXR in D1 neurons needed to be better defined. In addition, it is clearly demonstrated that the induction of Nur members mRNA responds to the activation of signaling cascades of dopaminergic D1 or D2 receptors within the involvement of PKC and ERK kinases is undubtable which opens us the way to a possible involvement of Nur77 in learning mechanisms associated with LIDs and amphetamine that are the Long Term Potentiation (LTP) and the Long Term Depotentialisation (LTD).

Keywords : Nur77, RXR, dopamine, L-DOPA, antipsychotics, amphetamine, ERK, PKC, Long Terme Potentiation (LTP), Long Terme Depotentialisation (LTD).

Table des matières

Préambule.....	2
1. La Dopamine.....	4
1. 1. Définition de la dopamine.....	4
1. 2. Anabolisme de la dopamine.....	4
1. 3. Catabolisme de la dopamine.....	4
1. 4. Mécanisme d'action en tant que neurotransmetteur.....	4
2. Structures anatomiques et fonctionnelles des voies de neurotransmission dopaminergiques au sein des ganglions de la base.....	5
2. 1. Définition et rôle des structures dopaminergiques.....	5
2. 2. Fonctionnalité des voies de neurotransmission dopaminergiques.....	6
2. 2. 1 Le striatum.....	6
2. 2. 1. 1. Structure fonctionnelle du striatum.....	6
2. 2. 1. 2. Structure anatomique cellulaire et moléculaire du striatum.....	7
2. 2. 2 Le mésencéphale.....	7
2. 2. 2. 1. La substance noire.....	7
2. 2. 2. 2. L'aire tegmentaire ventrale.....	8
3. Les récepteurs dopaminergiques.....	8
3. 1. Découverte et définition des récepteurs dopaminergiques.....	8
3. 2. Les récepteurs dopaminergiques de type D1.....	8
3. 2. 1. Le récepteur D1.....	9
3. 2. 2. Le récepteur D5.....	9
3. 3. Les récepteurs dopaminergiques de type D2.....	9
3. 3. 1. Le récepteur D2.....	9
3. 3. 2. Le récepteur D3.....	10
3. 3. 3. Le récepteur D4.....	10
3. 4. Localisation cérébrale des récepteurs dopaminergiques.....	11
3. 4. 1. Localisation striatale des récepteurs dopaminergiques.....	11
3. 5. Fonctionnalités des récepteurs dopaminergiques au sein des structures des voies de neurotransmissions dopaminergiques.....	14
3. 6. Découvertes au sein du laboratoire sur les récepteurs dopaminergiques.....	14

4. Les récepteurs nucléaires	15
4. 1. Définition des récepteurs nucléaires	15
4. 2. Structure générale des récepteurs nucléaires.....	15
4. 3. Les récepteurs nucléaires de la famille des NR4A.....	16
4. 3. 1. Structure générale des récepteurs nucléaires de la famille des NR4A	16
4. 3. 2. Activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires de la famille des NR4As	17
4. 3. 2. 1. Activité monomérique des membres de la famille des NR4As	17
4. 3. 2. 2. Activité dimérique des membres de la famille des NR4As	17
4. 3. 3. Les membres de la famille des NR4As en tant que gènes d'induction précoce (Immediate Early Gene (IEG)).....	19
4. 3. 4. Les récepteurs nucléaires de la famille des NR4As au sein du système nerveux central	21
4. 3. 4. 1. NR4A2 (Nurr-1) au sein du système nerveux central.....	21
4. 3. 4. 1. 1. Caractérisation protéique de NR4A2	21
4. 3. 4. 1. 2. Caractérisation génétique de NR4A2.....	22
4. 3. 4. 1. 3. Knockout de NR4A2.....	23
4. 3. 4. 2. NR4A3 (Nor-1) au sein du système nerveux central	24
4. 3. 4. 2. 1. Caractérisation protéique de NR4A3	24
4. 3. 4. 2. 2. Caractérisation génétique de NR4A3	25
4. 3. 4. 2. 3. Knockout de NR4A3.....	25
4. 3. 4. 3. NR4A1 (Nur77) au sein du système nerveux central.....	26
4. 3. 4. 3. 1. Caractérisation protéique de NR4A1	26
4. 3. 4. 3. 2. Caractérisation génétique de NR4A1	27
4. 3. 4. 3. 3. Knockout de NR4A1	29
4. 4. Les récepteurs aux rétinoïdes au sein du système nerveux central	29
4. 4. 1. Knockout RXR.....	31
4. 5. Découvertes au sein du laboratoire sur les NR4As et RXR.....	32
5. Les antiparkinsoniens.....	33
5. 1. Pharmacopée contre la maladie de Parkinson.....	34

5. 1. 2. La lévodopa	34
5. 1. 2. 1. Dyskinésies Induites à la lévodopa	34
5. 1. 3. Les agonistes dopaminergiques.....	35
5. 2. Les LIDs dans la maladie de Parkinson	35
5. 2. 1. Altérations moléculaires observées lors des LIDs dans la maladie de Parkinson.....	36
5. 2. 2. Corolaire scientifique concernant les LIDs dans la maladie de Parkinson ..	37
5. 2. 3. Population neuronale touchée dans les LIDs	40
5. 3. Altérations moléculaires observées dans la maladie de Parkinson	41
5. 3. 1. Cascades de signalisation impliquées dans la maladie de Parkinson	41
5. 3. 2. Gènes d'induction précoce induits dans la maladie de Parkinson	43
5. 4. Découvertes au sein du laboratoire sur la maladie de Parkinson	44
6. Les kinases ERKs et PKCs	46
6. 1. Les Extracellular signal-Regulated Kinases (ERK).....	46
6. 1. 1. Définition des Extracellular signal-Regulated Kinases ERKs	46
6. 1. 2. Les Extracellular signal-Regulated Kinases 1 et 2 (ERK1 et ERK2)	47
6. 1. 2. 1. Localisation anatomique des kinases ERK1 et ERK2	47
6. 1. 2. 2. Cascade de signalisation générale des kinases ERK1 et ERK2.....	47
6. 1. 2. 2. 1. Spécificité fonctionnelle des kinases ERK1 et ERK2.....	48
6. 1. 2. 3. Les souris ERK1 et ERK2 knockout.....	48
6. 1. 2. 3. 1. Les souris ERK1 knockout	48
6. 1. 2. 3. 2. Les souris ERK2 knockout	49
6. 1. 3. Activation des kinases ERK1 et ERK2 au sein des neurones du système dopaminergique.....	50
6. 1. 3. 1. Les kinases ERK1 et ERK2 dans les neurones de la voie D1.....	50
6. 1. 3. 2. Les kinases ERK1 et ERK2 dans les neurones de la voie D2.....	51
6. 1. 3. 3. Les cibles moléculaires des kinases ERKs au sein des neurones du striatum.....	52
6. 1. 4. Dichotomie signalétique entre le striatum dorsal et le striatum ventral sur l'activation des kinases ERKs.....	53

6. 1. 4. 1. Qui des ERKs ou de DARPP-32 agit comme un intégrateur signalétique au sein de la population neuronale striatal?	53
6. 2. Les Protéines Kinases C ou PKCs	59
6. 2. 1. Découverte et définition des Protéines Kinases C (PKC).....	59
6. 2. 2. Cascades d'activation des Protéines Kinases C (PKC).....	59
6. 2. 2. 1. Particularités des Protéines Kinases C (PKC).....	60
6. 2. 3. Classification des Protéines Kinases C (PKC).....	60
6. 2. 4. Les Protéines Kinases C au sein du système nerveux central	61
6. 2. 4. 1. Cascades de signalisation des PKCs au sein du système dopaminergique	62
6. 2. 4. 2. Les Protéines Kinases C dans la maladie de Parkinson	64
6. 2. 4. 3. Action moléculaire de la Protéine Kinase C dans les mécanismes d'action de l'amphétamine	65
7. L'amphétamine	65
7. 1. Découverte et définition de l'amphétamine	65
7. 2. Mécanismes d'action de l'amphétamine.....	66
7. 3. Structures cérébrales cibles de l'amphétamine	67
7. 3. 1. Le mésencéphale	67
7. 3. 2. Le cortex préfrontal.....	67
7. 3. 3. Le striatum.....	67
7. 4. Modèles animaux et effets comportementaux liés à l'amphétamine	68
7. 4. 1. Sensibilisation comportementale.....	69
7. 4. 1. 1. Définition de la sensibilisation comportementale.....	69
7. 4. 1. 2. Neuro-anatomie de la sensibilisation comportementale	70
7. 4. 2. Stéréotypies	70
7. 4. 2. 1. Définition des stéréotypies.....	70
7. 5. Pathologie liée à l'amphétamine : la toxicomanie	72
7. 5. 1. Définition de la toxicomanie.....	72
7. 5. 1. 2. Évidences scientifiques concernant l'hypothèse des Drs Hyman, Malenka et Nestler, sur la toxicomanie.....	72

7. 6. Altérations moléculaires liées à la prise d'amphétamine	74
7. 6. 1. Altération de certains facteurs de transcription liés à la prise d'amphétamine	74
7. 6. 2. Gènes d'induction précoces liés à la prise d'amphétamine.....	74
7. 6. 3. Neuropeptides liés à la prise d'amphétamine.....	75
7. 6. 4. Signalisation intracellulaire liée à la prise d'amphétamine.....	75
7. 6. 4. 1. Voies des ERK/MAPK kinases liées à la prise d'amphétamine	75
7. 6. 4. 2. Voie AMPc/PKA liée à la prise d'amphétamine	76
7. 7. Problématique du laboratoire liée à l'amphétamine.....	78
8. Travaux et résultats antérieurs au sein du laboratoire.....	78
8. 1. Les antipsychotiques et les NR4As.....	78
8. 1. 1. Les antipsychotiques	78
8. 1. 2. Injections d'antipsychotiques en dose unique.....	80
8. 1. 3. Injections chroniques d'antipsychotiques	80
8. 2. Dyskinésies induites par un traitement de L-DOPA ou des antipsychotiques typiques.....	81
8. 2. 1. Nur77 dans les aspects moléculaires des dyskinésies tardives ou induites à la L-DOPA	83
8. 2. 2. Nur77 et l'anatomie fonctionnelle des voies de sorties striatales directes et indirectes liées aux dyskinésies tardives ou induites à la L-DOPA	83
8. 3. La L-DOPA et les NR4As	85
8. 4. Impact de la délétion du gène de <i>nur77</i> dans un modèle murin de maladie de Parkinson.....	87
9. Hypothèses et objectifs du projet de recherche.....	89
9. 1. Première hypothèse de recherche : Nur77 et RXR jouent-ils un rôle dans les phénomènes de sensibilisation et moteurs liés à la consommation d'amphétamine?.....	89
9. 1. 1. Objectifs de l'étude visant à tester l'hypothèse n°1	89
9. 2. Deuxième hypothèse de recherche : les kinases ERKs et PKCs jouent-elles un rôle dans l'induction de l'ARNm des Nurs <i>via</i> les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 <i>in vivo</i> au sein du striatum, du Nac, de la SN et de la VTA?	90

9. 2. 1. Objectifs de l'étude visant à tester l'hypothèse n°2	90
IMPAIRED BEHAVIOR AND MOLECULAR ADAPTATIONS TO DOPAMINE DENERVATION AND REPEATED L-DOPA TREATMENT IN <i>NUR77</i> KNOCKOUT MICE.....	93
Abstract	95
Introduction	96
Materials and methods	98
Results	103
Discussion	107
References	113
Figures	119
THE TRANSCRIPTION FACTORS <i>NUR77</i> AND RETINOID X RECEPTORS PARTICIPATE IN AMPHETAMINE-INDUCED LOCOMOTOR ACTIVITIES.....	130
Abstract	132
1. Introduction	133
2. Material and methods.....	136
3. Results	141
4. Discussion	147
References	154
Legends to figures	159
EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASES (ERK) AND PROTEIN KINASE C (PKC) ACTIVITIES ARE INVOLVED IN THE MODULATION OF <i>NUR77</i> AND <i>NOR-1</i> EXPRESSION BY DOPAMINERGIC DRUGS.....	173
Abstract	175
Introduction	176
Materials and Methods.....	179
Results	183
Discussion	186
References	192
Figure legends	198

10. Résultats non publiés sur l'implication de Nur77 en tant que facteur de transcription sur le promoteur de l'enképhaline.....	208
10. 1. Séquences consensus NBRE et DRn sur les promoteurs des gènes de l'enképhaline et de la neurotensine.....	208
10. 2. Chromatoimmunoprécipitation (ChIP) Nur77 dirigée sur le promoteur de l'enképhaline et de la neurotensine.....	210
10. 3. Limites méthodologiques de l'étude sur les mécanismes d'action moléculaires par lesquels Nur77 diminuerait les dyskinésies tardives induites par les antipsychotiques typiques.....	211
11. Première hypothèse de recherche : Nur77 et RXR jouent-ils un rôle dans les phénomènes de sensibilisation et moteurs liés à la consommation d'amphétamine?.....	214
11. 1. Récapitulatif des résultats concernant le rôle de Nur77 et des rétinoïdes dans les phénomènes de sensibilisation et moteurs liés à la consommation d'amphétamine.....	214
11. 2. Conclusions sur le rôle de Nur77 et des rétinoïdes dans les phénomènes de sensibilisation et moteurs liés à la consommation d'amphétamine	215
11. 3. Discussion sur le rôle de Nur77 et des rétinoïdes dans les phénomènes de sensibilisation et moteurs liés à la consommation d'amphétamine	218
11. 4. Limites et perspectives sur le rôle de Nur77 et des rétinoïdes dans les phénomènes de sensibilisation et moteurs liés à la consommation d'amphétamine.....	221
12. Deuxième hypothèse de recherche : les kinases ERKs et PKCs jouent-elles un rôle dans l'induction de l'ARNm des Nurs <i>via</i> les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 <i>in vivo</i> au sein du striatum, du Nac, de la SN et de la VTA?	222
12. 1. Récapitulatif des résultats concernant le rôle des kinases ERKs et PKCs dans l'induction de l'ARNm des Nurs <i>via</i> les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 <i>in vivo</i> au sein du striatum, du Nac, de la SN et de la VTA	222
12. 2. Conclusions concernant le rôle des kinases ERKs et PKCs dans l'induction de l'ARNm des Nurs <i>via</i> les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 <i>in vivo</i> au sein du striatum, du Nac, de la SN et de la VTA.....	225

12. 3. Discussion concernant le rôle des kinases ERKs et PKCs dans l'induction de l'ARNm des Nurs <i>via</i> les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 <i>in vivo</i> au sein du striatum, du Nac, de la SN et de la VTA.....	226
12. 4. Perspectives concernant le rôle des kinases ERKs et PKCs dans l'induction de l'ARNm des Nurs <i>via</i> les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 <i>in vivo</i> au sein du striatum, du Nac, de la SN et de la VTA.....	227
12. 5. Limites de l'étude concernant le rôle des kinases ERKs et PKCs dans l'induction de l'ARNm des Nurs <i>via</i> les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 <i>in vivo</i> au sein du striatum, du Nac, de la SN et de la VTA.....	228
13. Perspectives générales du rôle de NR4A1 au sein des désordres dopaminergiques....	229
13. 1. Rôle d'NR4A1 dans les dyskinésies tardives (VCMs)	229
13. 2. Rôle d'NR4A1 dans les dyskinésies induites à la L-DOPA (LIDs)	229
13. 3. Rôle d'NR4A1 dans les désordres liés à la prise d'amphétamine	231
13. 4. NR4A1 et les mécanismes d'apprentissage?	232
Annexe 1	ii
Apprentissage, mémoire, plasticité synaptique et Long Term Potentialisation (LTP) / Long Term Depotentialisation (LTD).....	ii
Annexe 2	viii
RESEARCH HIGHLIGHTS NATURE	viii

Liste des tableaux

Tableau n°1 : Distribution des récepteurs dopaminergiques dans le cerveau des vertébrés 13

Tableau n°2 : Nomenclature officielle et alternative des récepteurs nucléaires de la sous-famille des Nurs 18

Liste des schémas

Schéma n°1 : schéma récapitulatif des cascades de signalisations des MAPKKK présentes dans les neurones gabaergiques du striatum activées par les différents récepteurs dans les neurones D1 (en rouge) comme dans les neurones D2 (en bleu) qui sont sollicités lors de l'administration de L-DOPA, amphétamine, cocaïne, antipsychotiques... décrit dans la littérature 58

Schéma n°2 : schéma récapitulatif des résultats d'hybridation in situ Nur77 et Nor-1 dans le striatum et le noyau accumbens de souris sauvages sous agonistes D1/D2 ou antagonistes D2 avec ou sans inhibiteurs de MEK ou de PKC 224

Schéma n°3 : schéma récapitulatif des résultats comportementaux chez des souris sauvages sous agonistes D1/D2 ou antagonistes D2 avec ou sans inhibiteurs de MEK ou de PKC 225

Liste des figures

Figure n°1 : Schématisation de la distribution des neurones du striatum en voie directe (D1) et indirecte (D2) selon les récepteurs dopaminergiques, les neuropeptides exprimés et les projections au globus pallidus externe et interne	12
Figure n°2 : Anatomie des récepteurs nucléaires	15
Figure n°3 : Consensus NR4A	19
Figure n°4 : Divers stimuli induisent les gènes de la famille des NR4A	20
Figure n°5 : Organes et tissus avec des effets spécifiques des membres de la sous-famille des NR4A	20
Figure n°6 : Relations entre l'isoforme RXR γ 1 et les Nurs dans le système dopaminergique du système nerveux central	33
Figure n°7 : Diagramme schématique illustrant les cascades de signalisation affectées par les LIDs dans les neurones épineux moyens striataux nigraux	39
Figure n°8 : Représentation schématique des mécanismes moléculaires ciblés par une drogue psychostimulante qu'est la cocaïne	54
Figure n°9 : Cascades de signalisation régulant l'activation de ERK1/2 dans les neurones striataux	55
Figure n°10 : Signalisation des extracellular signal-regulated kinase (ERK) dans les neurones	64
Figure n°11 : Projections dopaminergiques au prosencéphale.	68
Figure n°12 : Complexité de la réponse de signalisation <i>in vivo</i> ; réseau des cascades de signalisations régulés par les récepteurs dopaminergiques D1 (D1R) et les récepteurs dopaminergiques D2 (D2R) au sein des neurones du striatum de souris.	77
Figure n°13 : Effet de la délétion du gène nur77 sur le comportement rotatoire de souris hémi parkinsoniennes suite à des injections de véhicule ou de L-DOPA.	88
Figure n°14 : Séquences consensus NBRE et DRn identifiées au sein des promoteurs des gènes de l'enképhaline et de la neurotensine (séquences génomiques NCBI)	209
Figure n°15 : Résultats de chromatoprécipitation (ChIP) avec l'anticorps Nur77 sur de l'ADN total de striatum de souris sauvages	210
Figure n°16 : Co-localisation Nur77, substance P (SubP), enképhaline (ENK) dans le striatum suite à une injection aigue d'amphétamine	217

Liste des abréviations

3-MT : 3-méthoxytyramine
6-OHDA : 6-hydroxydopamine
9-cis-Ra : 9 cis rétinolique acide, agoniste RXR
AC : adénylate cyclase
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
AF-1 : fonction activatrice de transcription 1, *Activatrice Fonction 1*
AF-2 : fonction activatrice de transcription 2, *Activatrice Fonction 2*
AIMs : mouvements anormaux involontaires
Akt : Akt ou protéine kinase B
AM80 : acide 4-[[[5, 6, 7, 8-Tétrahydro-5, 5, 8, 8-tétraméthyl-2-naphthalenyl) amino] carbonyl] benzoïque acide, agoniste RAR
AMPA : acide alpha-amino-3-hydroxyl-5-méthyl-4-isoxazole propionique
AMPAR : récepteur de l'AMPA
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
AP-1 : activateur protéine 1 (c-Fos combiné avec c-Jun forment AP-1)
ARNm : acide ribonucléique messenger
ATF1 : *activation transcription factor 1*
Boîte CArG : boîte CArG riche en A/T
BRET : *bioluminescence resonance energy transfer*
Ca²⁺ : calcium
Cabin1 : *calcineurin-binding protéine 1*
CaMKII : protéine kinase calcium/calmoduline dépendante
CBP : *CREB-binding protein*
Cdk5 : kinase dépendante de la cycline 5
COMT : catéchol-O-méthyl transférase
COUP-TF : *chicken ovalbumine upstream promoter transcription factor*
CPP : *Condition Place Preference*
CRE : élément de réponse à l'AMPc pour CREB
CREB : *cAMP reponse element binding protein*

Ct : carboxyterminale
CTE : extension en Ct
D-amph : amphétamine dextrogyre ou amphétamine
D1 : récepteur dopaminergique D1
D2 : récepteur dopaminergique D2
D3 : récepteur dopaminergique D3
D4 : récepteur dopaminergique D4
D5 : récepteur dopaminergique D5
DAG : 1, 2-diacylglycérol
DARPP-32 : *dopamine and cAMP-regulated phosphoprotéine 32 kDa* ou *dopamine et adénosine 3', 5'- mono phosphate-regulated phosphoprotéine M_r 32KDa*
DAT : transporteur de la dopamine
DBD : *DNA binding domaine*, domaine de liaison à l'ADN
DDC : DOPA décarboxylase
DHA : *docosahexaenoic acid*
DOPAC : dihydroxyphénylacétate
DR5 : DR pour *direct repetition* (de séquences HREs (*hormones response element*)) et 5 pour espacées de 5 nucléotides
DYN : dynorphine
E-LTP : *Early-LTP*
eCB-LTD : *long terme depotentialisation* dépendant des récepteurs canabinoïdes
Egr3 : C-5 stérol desaturase ou Ergostérol Delta (5,6) desaturase
Elk-1 : *E twenty-six (ETS)-like transcription factor 1*, aussi connu sous le nom de Elk1
ENK : enképhaline
ERK1 : *Extracellulaire signal-regulated kinases 1*
ERK2 : *Extracellulaire signal-regulated kinases 2*
Fos : facteurs de transcription (c-Fos, FosB, et fra2)
FRET : *fluorescence résonance énergie transfert*
GABA : acide γ -aminobutyrique
GABA_A : récepteur GABA_A

GRE : élément de réponse aux glucocorticoïdes

GSK3 : glycogène synthase kinase 3

H3 : Histone H3

HVA : acide homovanillique

HX531 : 4 - (7, 8, 9, 10 -Tetrahydro -5, 7, 7, 10, 10 - pentamethyl - 2 - nitro - 5H - benzo [b] naphtho [2, 3-*e*] [1, 4] - diazépín - 12 - yl) - benzoïque acide, antagoniste RXR

HX630 : 4 - (7, 8, 9, 10 - Tetrahydro - 7, 7, 10, 10 - tetramethylbenzo [b] naphtho [2, 3 - *f*] [1, 4] thiazépín - 12 - yl - benzoic acide, agoniste spécifique RXR

HZF-3 : *immediate-early orphan receptor* homologue de Nurr-1

I-LTP : *initial LTP*

IEG : *immediate early gene*

IP₃ : inositol 1, 4, 5 triphosphate (IP₃)

IP₄ : 1, 3, 4, 5 - tetrakisphosphate

JunD : facteur de transcription (comme c-Jun)

KDa : Kilo Dalton

L-DOPA : lévodopa ou L-dihydroxyphénylalanine

L-LTP : *late-LTP*

LBD : *ligand binding domain*, domaine de liaison au ligand

LE135 : 4 - (7, 8, 9, 10 - Tetrahydro - 5, 7, 7, 10, 10 - pentamethyl - 5H - benzo [e] naphtho [2,3-*b*] [1, 4] diazépín - 13 - yl) benzoïque acide, antagoniste RARβ

LG268 : LG100268, agoniste RXR spécifique

LIDs : *L-DOPA induced dyskinesias*

LTD : *long - term depotentiation*

LTM : *long - term memory*

LTP : *long - term potentiation*

MAO : monoamine oxydase (de type A ou B)

MAPK : MAP kinase

MAPKAPKs ou MKs : *MAPK activated protein kinases*

PP1 : MAPK kinase phosphatase 1

MAPKK : MAP kinase kinase
MAPKKK : MAP kinase kinase kinase
MDMA : *MDMA*, ou MD pour 3, 4 – méthylène – dioxy – N - méthylamphétamine ou ecstasy
NMDA : *N* – methyl – D- aspartique acide ou *N* – methyl – D- aspartate
NMDAR : *N* – methyl – D- aspartique acide receptor
MEF2 : *myocyte enhancer factor-2* (MEF2B, MEF2D)
MEK : *mitogen - activated protein kinase*
MEKK : MEK kinase
MAPK : *mitogen activated protein kinase*
MKK : *MAP (mitogen - activated protein) kinase kinase*
MKP-1 : MAPK phosphatase 1
MSK1 : stress activated kinase-1
Myo-D : appartient à la famille des *myogenic regulatory factors* (MRFs)
Nac : noyau accumbens
NAPs : *NMDAR - associated - proteine*
NBRE : *consensus NGFI-B response element*
NDR : note du rédacteur
NF-AT : *nuclear factor of activated T-cells*
NGF : *nerve growth factor*
NGFI-B : *nerve growth factor inducible B*
NOR-2 : forme tronquée de NOR-1
NPC-15347 : inhibiteur général de PKC
NR4A : *nuclear receptor subfamily 4 groupe; A member 1 (NR4A1) ou 2 (NR4A2) ou 3 (NR4A3)*
Nt : aminoterminal
Nurr-1 : *nur - related factor 1*
NurRE : *nur-responsive element*
p300 : Co-activateur transcriptionnel
PH : phénylalanine hydroxylase

PI : phosphatidyl inositol
PIP₂ : 4, 5 – biphosphate
PKA : protéine kinase A
PKC : protéines kinases C ou calcium dépendante protéine kinase
PLC : phospholipase C
PMA ou TPA : 12 – O – tetradecanoyl – phobol – 13 - acetate, esters de phorbol
POMC : pro - opiomélanocortine C
PP1 : protéine phosphatase 1
PP2A : protéine phosphatase 2 A
PP2B : protéine phosphatase 2 B
PPSI : potentiels post synaptiques inhibiteurs
PRK1/PRK2 : *PKC – related - kinase 1 ou 2*
PS : phosphatidyl sérines
RA : acides rétinoïques trans
RACKs : *receptor for activated C kinase*
RAR : *retinoïc acide receptor (RAR α , RAR β , RAR γ)*
Ras : petites GTPases qui fait partie de la famille des protéines G monomériques
Récepteur A2a : récepteur de l'adénosine (récepteur couplé aux protéines G)
Rin : *Ras-like in neurone*
RNR-1 : *regenerating liver nuclear receptor 1*
RSK1/2 : protéine kinase ribosomale S6 p90
RT-PCR : *reverse transcription*
RXR : *retinoïc acide - X receptor* ou reXinoïdes acides récepteurs (RXR α , RXR β , RXR γ)
RXR γ 1 : récepteur aux rétinoïdes γ 1
SL327 : inhibiteur de MEK
SN : substance noire
SNc : substance noire *pars compacta*
SNr : substance noire *pars reticulata*
SP1 : *specificity protein 1*

SRE : élément de réponse au sérum

SRF : facteur de réponse au sérum

SST₅ : somatostatine

TCR : récepteur des lymphocyte T

TH : tyrosine hydroxylase.

THC : delta-9-tétrahydrocannabinol (molécule contenue dans le cannabis)

TPA ou PMA : *12 – O – tetradecanoyl – phobol – 13 - acetate, esters de phorbol*

VCM : *vacuous chewing movements*

VTA : aire tegmentaire ventrale

Zif268 : en fait EGR-1 (*early growth response protein 1*) aussi connu sous le nom de

Zif268 (*zinc finger protein 225*) ou NGFI-A (*nerve growth factor - induced protein A*)

ΔFosB : *FBJ murine ostéosarcome viral oncogène homologue B delta*

Remerciements

Tout au long de ma thèse, j'ai rencontré au sein de mon milieu professionnel et personnel, des personnes formidables, chaleureuses, accueillantes et ouvertes d'esprit ainsi qu'un système éducatif jeune, dynamique, proactif et professionnel, que ce soit à l'Université Laval et plus particulièrement à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Montréal.

Il me serait beaucoup trop fastidieux de les nommer tous! De plus, selon ma vision des choses, la recherche est plus une affaire de personnalité que de personnes.

En effet, pour moi, la recherche est synonyme d'altruisme, de don de son temps, de ses capacités intellectuelles et du travail d'équipes, au sein de la communauté scientifique, toutes orientées vers un seul et unique but : guérir le plus de maladies possibles.

C'est une vision plutôt utopique je l'avoue, mais c'est la mienne. C'est pourquoi, par reconnaissance envers toutes ces personnes oeuvrant pour le bien d'autrui, je ne peux me résoudre à n'en citer que quelques-unes.

Chapitre 1 : introduction

Préambule

Le cerveau humain contient de l'ordre de mille milliards de neurones. Chacun pouvant être classé selon sa forme, son (ses) neurotransmetteur(s), ses neuromédiateurs voire même les récepteurs membranaires exprimés. Cependant, l'organisation de ces neurones en circuits cérébraux complexes et spécifiques augmente de beaucoup la difficulté du travail de recherche tant a niveau de l'interprétation des résultats que de la mise au point de modèles expérimentaux adéquats. C'est pourquoi, lorsque l'on étudie le cerveau, les résultats obtenus au niveau moléculaire (exemple : Nur77 dans les neurones gabaergiques exprimant les récepteurs dopaminergiques D1 ou D2) ne peuvent être dissociés de l'intégration de l'information, premièrement au niveau neuronale (afférences corticales glutamatergiques, inter-neurones cholinergiques, gabaergiques...), puis local (dans la partie dorsale) au sein d'une structure particulière (le striatum) qui fait parti d'un système (système dopaminergique) particulier.

Dans la présente thèse, portant sur le rôle du facteur de transcription et gène d'induction précoce Nur77 au sein des désordres dopaminergiques que sont la schizophrénie, la maladie de maladie de Parkinson et les phénomènes de sensibilisation aux drogues d'abus, nous aborderons premièrement :

- la dopamine,
- le système dopaminergique qui fait partie du système des ganglions de la base,
- les récepteurs dopaminergiques, leurs fonctions, leur localisation,
- puis la famille des récepteurs nucléaires de Nur77, Nor-1, Nurr1 et RXR

Par la suite, après une brève description du mécanisme d'action des antiparkinsoniens, de l'amphétamine et des cascades de signalisation des kinases ERKs (Mitogen Activated Protéine kinases ERK) et PKCs (Protein Kinase C), nous introduirons une vision globale des résultats précédemment trouvés au sein du laboratoire sur Nur77, RXR et les antipsychotiques, ce qui nous permettra, dans une section ultérieur, au travers de certains résultats non encore publiés d'aborder la perspective scientifique qu'ils suggèrent.

Ensuite, viendra : l'article du Dr Michel St-Hilaire auquel j'ai collaboré et sur lequel repose, en grande partie, nos hypothèses et nos objectifs de travail exposés dans les chapitres 3 et 4 de la présente thèse qui constitue nos travaux de recherche publiés.

La discussion conclusion, portera sur le rôle de l'hétérodimer RXR/Nur77 dans les effets secondaires moteurs associés à l'halopéridol, le rôle de Nur77 dans les LIDs puis les phénomènes d'addiction aux drogues d'abus et en perspective, le rôle qu'il pourrait jouer dans les mécanismes d'apprentissage liés aux LIDs et à la toxicomanie *via* les cascades de signalisation des protéine kinases ERKs et PKCs.

1. La Dopamine

1. 1. Définition de la dopamine

La dopamine fait partie des neurotransmetteurs catécholaminergiques dont les principaux sont : l'adrénaline, la noradrénaline et la dopamine (Wise and Bozarth, 1987). La dopamine, acronyme de **dihydroxyphényléthylamine**, fut découverte en 1952 par Arvid Carlson (Thibault et al. 2010) puis fut caractérisée en tant que neurotransmetteur quinze années plus tard (pour un bref historique voir (Seeman and Van Tol, 1994)). Il serait, en réalité, plus juste de dire que la dopamine possède un rôle de neurotransmetteur au sein du système nerveux central et d'hormone catécholaminergique en périphérie.

1. 2. Anabolisme de la dopamine

La voie de biosynthèse de la dopamine consiste en la conversion de la phénylalanine en tyrosine, puis en lévo-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA). Pour ce faire, trois enzymes agissent en cascade, la phénylalanine hydroxylase, la tyrosine hydroxylase (enzyme limitante) et la DOPA décarboxylase respectivement (Costentin, 1995).

1. 3. Catabolisme de la dopamine

Son catabolisme, en revanche, peut s'effectuer de différentes façons. Soit la dopamine est dégradée en dihydroxyphénylacétate (DOPAC) par la monoamine oxydase (MAO) puis en acide homovanillique (HVA) par la catéchol-O-méthyle transférase (COMT) ou inversement, en 3-méthoxytyramine (3-MT) *via* la COMT puis en acide homovanillique (HVA) par la MAO (Costentin, 1995).

1. 4. Mécanisme d'action en tant que neurotransmetteur

Au sein du système nerveux central, ce sont les neurones de la substance noire *pars compacta* ainsi que ceux l'aire tegmentaire ventrale (VTA) qui synthétisent la très grande majorité de la dopamine (Bjorklund and Dunnett, 2007).

La dopamine est tout d'abord synthétisée au sein des terminaisons axonales puis stockée à l'intérieur de vésicules de stockage dont l'exocytose est calcium dépendante. Une fois libérée dans la fente synaptique, la dopamine est un agoniste de cinq sous-types de récepteurs dopaminergiques qui sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G. Ce mode d'action, comparé aux canaux ioniques, est dit lent. De plus, si la dégradation de la dopamine est son mode d'inactivation principal dans certaines régions du cortex et du mésencéphale (substance noire (SN), aire tegmentaire ventrale (VTA)), sa recapture, environ 80%, *via* un transporteur spécifique : le transporteur de la dopamine (DAT), est son mode d'inactivation principal dans le striatum dorsal et le striatum ventral (Wise and Bozarth, 1987) (Seeman and Van Tol, 1994) (Costentin, 1995).

2. Structures anatomiques et fonctionnelles des voies de neurotransmission dopaminergiques au sein des ganglions de la base

2. 1. Définition et rôle des structures dopaminergiques

Les structures dopaminergiques citées précédemment font parties du système des ganglions de la base. Anatomiquement, ces structures sont constituées d'un groupement de quatre noyaux localisés à la base du cerveau antérieur et qui comprennent, selon la nomenclature officielle chez le rongeur :

- le striatum qui se subdivise en striatum dorsal et striatum ventral (aussi appelé noyau accumbens)
- le *globus pallidus* (segments internes et externes)
- la substance noire *pars compacta* (SNc)
- l'aire tegmentaire ventrale (VTA)

Elles jouent un rôle primordial dans la motricité volontaire normale, les troubles cognitifs ainsi que les troubles comportementaux.

2. 2. Fonctionnalité des voies de neurotransmission dopaminergiques

2. 2. 1 Le striatum

2. 2. 1. 1. Structure fonctionnelle du striatum

Le striatum constitue la principale voie d'entrée et de sortie des ganglions de la base. Il reçoit, les afférences dopaminergiques venant de la substance noire compacte et de l'aire tegmentaire ventrale (Smith et al., 1994) qu'il intègre à des afférences glutamatergiques excitatrices du cortex et du thalamus (Kemp and Powell, 1971). Ensuite, sa population neuronale double lui permet de constituer deux voies de sortie, la voie dite directe ou striatonigrale et la voie indirecte ou striatopallidale.

La voie directe est constituée de neurones renvoyant directement l'information au globus pallidus interne et à la substance noire *pars reticulata* qui sont les deux portes de sortie des ganglions de la base. Lorsqu'activée, cette voie va libérer de l'acide γ -aminobutyrique (GABA), un neurotransmetteur inhibiteur, directement sur le globus pallidus interne et la substance noire *pars reticulata* qui, se voyant inhibés, vont à leurs tour lever l'inhibition qu'ils exercent déjà (*via* eux aussi le GABA) sur le thalamus qui va ainsi pouvoir activer (*via* le glutamate, un neurotransmetteur activateur) les cortex préfrontaux, pré-moteurs et moteurs ce qui au final facilite le mouvement.

La voie indirecte quant à elle passe par le globus pallidus externe et le noyau sous-thalamique avant d'atteindre le globus pallidus interne et la substance noire *pars reticulata*. Les afférences glutamatergiques excitatrices du cortex vont provoquer une libération gabaergique inhibitrice des neurones de la voie indirecte sur le globus pallidus externe qui se verra forcé de lever l'inhibition gabaergique qu'il produit sur le noyau sous-thalamique. C'est donc le noyau sous-thalamique, noyau glutamatergique excitateur, qui va aller activer les neurones du globus pallidus interne et de la substance noire *pars reticulata*. Ces deux noyaux vont ainsi renforcer leur inhibition sur le thalamus qui ne pourra plus activer le cortex, ce qui a pour effet de diminuer les mouvements.

Pour revue sur l'organisation fonctionnelle des ganglions de la base voir : (Gerfen, 1992) (Gerfen, 1996).

2. 2. 1. 2. Structure anatomique cellulaire et moléculaire du striatum

Anatomiquement parlant, cette ségrégation : voie directe, voie indirecte n'est pas aussi distincte que cela. Il existe, inévitablement, un enchevêtrement de neurones les uns avec les autres (Gerfen and Young, 1988). Au niveau cellulaire, les neurones du striatum sont majoritairement composés (90-95%) de neurones épineux moyens gabaergiques (Kemp and Powell, 1971) (Kitai, 1981). Dans le striatum ventral, il est retrouvé cette même organisation à la fois cellulaire et anatomique (Lu et al., 1998). Différentes techniques, hybridations *in situ* et immunohistochimie, ont démontrées, que les neurones de la voie directe exprimaient préférentiellement les récepteurs dopaminergiques D1, les neuropeptides dynorphine et substance P et que ceux de la voie indirecte exprimaient plus les récepteurs dopaminergiques D2 ainsi que l'enképhaline (Gerfen et al., 1990) (Le Moine et al., 1990) (Curran and Watson, 1995) (Hersch et al., 1995) (Yung et al., 1995) avec, cependant, une faible proportion de neurones co-exprimants les deux récepteurs (Surmeier et al., 1992).

2. 2. 2 Le mésencéphale

Il s'agit de la deuxième structure des ganglions de la base dont nous allons parler car la substance noire *pars compacta* (SNc) et *pars reticulata* (SNr) ainsi que l'aire tegmentaire ventrale (VTA) font parties du mésencéphale.

2. 2. 2. 1. La substance noire

Les neurones de la substance noire *pars reticulata*, projettent au globus pallidus, au thalamus, au colliculus supérieur et au noyau pédonculo-pontin et sont de nature GABAergique (Bjorklund and Dunnett, 2007).

Juste à côté, les neurones de la substance noire *pars compacta* sont essentiellement dopaminergiques et projettent depuis le mésencéphale jusque dans le striatum constituant ainsi la voie nigro-striée (Bjorklund and Dunnett, 2007). Il s'agit de la voie

qui contrôle la motricité automatique et c'est celle qui dégénère progressivement dans la maladie de Parkinson.

2. 2. 2. L'aire tegmentaire ventrale

Les neurones de l'aire tegmentaire ventrale sont aussi dopaminergiques. Ils projettent vers différentes structures limbiques (striatum ventral ou noyau accumbens, septum, tubercules olfactifs, amygdale, hippocampe et différentes régions corticales). Ils forment les voies méso-cortico-limbiques (Bjorklund and Dunnett, 2007) impliquées dans les réactions comportementales liées à l'émotivité, à l'anxiété, à la motivation et dans différentes fonctions cognitives. Son dysfonctionnement est probable dans les états psychotiques associés aux drogues d'abus ou à la schizophrénie.

3. Les récepteurs dopaminergiques

3. 1. Découverte et définition des récepteurs dopaminergiques

C'est en 1978 que les récepteurs dopaminergiques, appelés ainsi à cause de leurs propriétés pharmacologiques particulières pour la dopamine, ont été découverts (Spano et al., 1978) (Kebabian and Calne, 1979). À la fin des années 80, les techniques de clonage moléculaire ont permis la caractérisation des cinq sous-types de récepteurs dopaminergiques qui furent dès lors classés en récepteurs dopaminergiques de type D1 ou de type D2 (Sibley et al., 1993); en raison de l'action opposée des récepteurs D1 et D2 sur l'adénosine mono-phosphate cyclique (AMPC) caractérisée dès 1981 (Stoof and Kebabian, 1981). De même, dès 1987, la synergie D1/D2 nécessaire aux effets moteurs fut démontrée dans le striatum de rat (Clark and White, 1987). À l'intérieur de chaque sous-famille de type D1 ou de type D2, les récepteurs dopaminergiques possèdent des homologies structurales et un profil pharmacologique similaire.

3. 2. Les récepteurs dopaminergiques de type D1

Les récepteurs dopaminergiques de type D1 sont le D1 et le D5. En général, les agonistes et antagonistes ont la même affinité pour le D1 que pour le D5 à l'exception de

la dopamine qui a cinq à dix fois plus d'affinité pour le récepteur D5 que pour le récepteur D1 (Sibley et al., 1993).

3. 2. 1. Le récepteur D1

En 1990, le récepteur D1 fut cloné et caractérisé comme étant lié à l'activation de l'adénylate cyclase (AC) par quatre groupe différents (Dearry et al., 1990) (Monsma et al., 1990) (Sunahara et al., 1990) (Zhou et al., 1990). Des analyses d'hydrophobicité lui prédisent la présence de sept domaines transmembranaires avec une extrémité amino-terminale extracellulaire et l'autre carboxyterminale cytosolique ce qui fut la topologie suggérée pour tous les autres récepteurs couplés aux protéines G par la suite (Strader et al., 1989) (Dohlman et al., 1991).

3. 2. 2. Le récepteur D5

En 1991, cette fois-ci, trois laboratoires différents clonèrent le récepteur D5 (Grandy et al., 1991) (Sunahara et al., 1991) (Weinshank et al., 1991). Deux pseudo-gènes dont des codons stop empêchent la traduction en récepteurs fonctionnels ont également été identifiés (Grandy et al., 1991) (Nguyen et al., 1991a) (Nguyen et al., 1991b) (Weinshank et al., 1991). Le récepteur D5 est également un récepteur à sept domaines transmembranaires avec 50% d'homologie générale au D1 et 80% d'homologies en ce qui concerne les régions transmembranaires et un profil pharmacologique identique à celui du D1 (Grandy et al., 1991) (Sunahara et al., 1991) (Weinshank et al., 1991).

3. 3. Les récepteurs dopaminergiques de type D2

Les récepteurs dopaminergiques de type D2 sont les récepteurs D2, D3 et D4.

3. 3. 1. Le récepteur D2

En 1988, le récepteur D2 fut le premier de tous à être cloné à partir de la sonde du récepteur β -adrénergique (Bunzow et al., 1988). D'un point de vue structural, la région carboxyterminale est plutôt petite comparée aux récepteurs D1 et la troisième boucle cytoplasmique (entre les segments transmembranaires 5 et 6) est large, ce qui constitue

deux caractéristiques communes aux récepteurs inhibant l'adénylate cyclase (Sibley et al., 1993). Il est à noter qu'il existe deux isoformes du récepteur D2. Un isoforme court (D2_S), avec une délétion de 29 acides aminés dans la troisième boucle cytoplasmique, qui constitue la forme la moins abondante des récepteurs D2 par rapport à la forme longue (D2_L) (Dal Toso et al., 1989) (Giros et al., 1989) (Grandy et al., 1989) (Monsma et al., 1989).

Remarque : dans le striatum, plus de la moitié des neurones enképhaline positif (voie indirecte) co-expriment le D2_L et le D2_S, moins de 8% de ces neurones n'expriment que le D2_S. Dans les neurones n'exprimant que la substance-P (voie directe), la colocalisation D2_L/D2_S n'existe pas (Surmeier et al., 1996).

3. 3. 2. Le récepteur D3

Il s'agit du second récepteur de cette famille à avoir été cloné (Sokoloff et al., 1990) (Sokoloff et al., 1992) pour le rat et (Giros et al., 1990) chez l'humain. Ce récepteur possède 52% d'homologie générale avec le D2 et 75% dans les régions conservées que sont les segments transmembranaires (Sibley et al., 1993). Ses propriétés pharmacologiques sont similaires à celles du D2 (Sokoloff et al., 1990) (Sokoloff et al., 1992).

3. 3. 3. Le récepteur D4

Le récepteur D4 fut isolé pour la première fois en 1991 (Van Tol et al., 1991). Sa structure génétique, une séquence répétée de 16 nucléotides dont le nombre de répétitions varie selon les allèles en fait le plus hétérogène des récepteurs dopaminergiques (Seeman and Van Tol, 1994) (Van Tol et al., 1992). La topographie membranaire du récepteur D4 est la même que pour le récepteur D2 et le récepteur D3 avec 41 à 39% d'homologie générale et 56% d'homologie structurale pour les segments transmembranaires. Ses propriétés pharmacologiques sont similaires à celles du D2 et du D3 (Van Tol et al., 1991).

Remarque : certaines évidences de la littérature indiquent que les récepteurs dopaminergiques D1, D2 et D3 sont capables de former des homodimères (Dziedzicka-

Wasylewska, 2004) ainsi que des hétérodimères (le D5 y compris) avec soit des membres de la même famille (D2/D3 (Scarselli et al., 2001)) soit d'autres récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G comme le récepteur D1 avec l'adénosine A1 (Gines et al., 2000) ou le récepteur NMDA (Lee et al., 2002), le récepteur D2 avec le récepteur A2a (Hillion et al., 2002), ou la somatostatine (SST₅) (Rocheville et al., 2000) ou encore le récepteur D5 et le récepteur GABA_A (Liu et al., 2000) (Callier et al., 2003).

3. 4. Localisation cérébrale des récepteurs dopaminergiques

Le tableau n°1 ci-dessous résume la localisation au sein du tissu cérébrale des récepteurs dopaminergiques en fonction des sous-familles et sous-types de récepteurs (Callier et al., 2003).

3. 4. 1. Localisation striatale des récepteurs dopaminergiques

Il est communément admis que le récepteur D1 est exprimé par les neurones exprimant la substance P ou la dynorphine qui sont les neurones striatonigraux de la voie D1 qui projettent au globus pallidus interne et à la substance noire *pars reticulata* (Surmeier et al., 1996). Le récepteur D2 est exprimé par les neurones enképhaline positifs qui sont les neurones striatopallidaux projetant au *globus pallidus* externe et au noyau sous-thalamique avant d'atteindre le *globus pallidus* interne et la substance noire *pars reticulata* (Surmeier et al., 1996). Les neurones co-exprimants la substance-P et l'enképhaline sont les seuls à présenter un fort pourcentage de D1 et de D2 comme schématisé dans la figure n°1 (Surmeier et al., 1996).

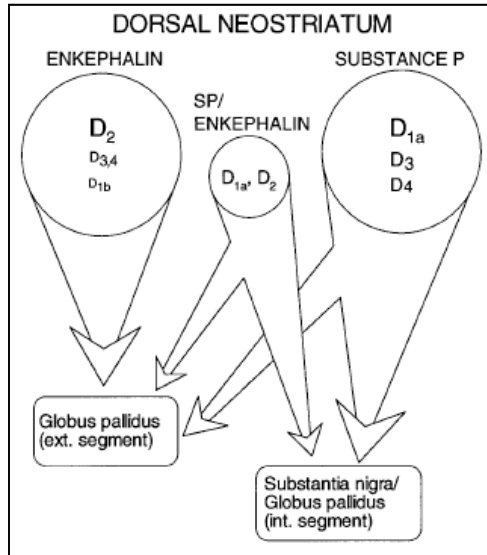


Figure n°1 : Schématisation de la distribution des neurones du striatum en voie directe (D1) et indirecte (D2) selon les récepteurs dopaminergiques, les neuropeptides exprimés et les projections au globus pallidus externe et interne. L'abondance des récepteurs est relative à la taille de la police avec laquelle ils sont indiqués. Remarque : le récepteur D_{1b} correspond au récepteur D5. Adaptée de (Surmeier et al., 1996).

Tableau n°1 : Distribution des récepteurs dopaminergiques dans le cerveau des vertébrés :

Le tableau rapporte de façon semi-quantitative la distribution tissulaire relative des différents sous-types de récepteurs dopaminergiques. Cette distribution relative est bien conservée pour toutes les espèces de gnathostomes (NDR : du grec *gnathos*, mâchoire, et *stoma*, bouche) représentant un groupe majeur de vertébrés (Encyclopédie Universalis)) étudiés jusque là (Callier et al., 2003).

Brain region	Dopamine receptors				
	D1like		D2 like		
	D1A/D1	D1B/D5	D2	D3	D4
Cortex	+	+	+	+	+
Hippocampus	-	++	+	+	+
Basal ganglia					
Striatum ventral	++	+	++	++	+
Striatum dorsal	++	+	++	+	
Nucleus accumbens	++	++	+	++	
Olfactory tubercle	+	-	++	+	
Globus pallidus	+		+	+	+
Ventral tegmental area	+	-	+		
Substantia nigra	+	+	++	+	+
Midbrain and Brainstem					
Nucleus tractus solitarius	++	+	++		
Optic tract	+				
Vegetative areas of spinal cord?	-		+		
<i>Thalamus</i>	+	++	+		+
<i>Hypothalamus</i>					
Dorsal hypothalamus	+	+			
Ventral hypothalamus	+	-	+	+	+
<i>Hypophyse</i>	-	-	++	-	
Amydaloid complex	++	+	+	+	+
Retina	+	+	+		++

3. 5. Fonctionnalités des récepteurs dopaminergiques au sein des structures des voies de neurotransmissions dopaminergiques

D'un point de vue fonctionnel, les récepteurs de type D1 augmentent l'activité de l'AC tandis que les récepteurs de type D2 la diminue. Dans les neurones de la SN et de la VTA, le récepteur D2 est celui qui régule la synthèse et la libération de la dopamine (Dickinson et al., 1999) (Rouge-Pont et al., 2002) (Benoit-Marand et al., 2001) (Schmitz et al., 2002) (De Mei et al., 2009). Un rôle d'autorécepteur pour le D2 semble être exclusif à l'isoforme D2_S (Usiello et al., 2000). La forme courte D2_S inhibe plus l'AC que la forme longue ce qui suggère un couplage préférentiel avec les Gi (Dal Toso et al., 1989) alors que la transduction du signal par les D2_L peut se faire normalement *via* les Gi et Go (Senogles et al., 1987) (Ohara et al., 1988) (Elazar et al., 1989).

3. 6. Découvertes au sein du laboratoire sur les récepteurs dopaminergiques

Des expériences menées au sein du laboratoire sur la maladie de Parkinson, la dépendance aux drogues d'abus et la schizophrénie nous ont permis de déterminer que : l'activation par la L-DOPA (St-Hilaire et al., 2003) (St-Hilaire et al., 2005) (St-Hilaire et al., 2006), les drogues d'abus (Bourhis et al., 2009) des récepteurs D1/D2 ainsi que l'inactivation des D2 par les antipsychotiques (Gervais et al., 1999) (Beaudry et al., 2000) (Langlois et al., 2001) (Ethier et al., 2004a) (Maheux et al., 2005) provoquaient l'induction de l'ARNm des trois membres de la famille des Nurs (Nur77, Nurr-1 et Nor-1) dans les différentes régions dopaminergiques des ganglions de la base avec une spécificité populationnelle des neurones des voies directes ou indirectes selon les conditions (Levesque and Rouillard, 2007). Ces résultats justifient, selon nous, l'étude des Nurs dans ces désordres dopaminergiques.

4. Les récepteurs nucléaires

4. 1. Définition des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription (Yamamoto, 1985) très bien représentés (94%) au sein du système nerveux central (Gofflot et al., 2007). Bien qu'ils puissent être sous différentes formes, inactifs au sein du cytoplasme ou complexés avec des protéines chaperonnes pour ensuite transloquer au noyau en présence de ligands, ou présents de façon constitutive au noyau, fixés à l'ADN, en réprimant la transcription de leurs gènes cibles en absence de leur ligands; ils agissent généralement avec beaucoup de protéines co-régulatrices (des co-répresseurs, des co-activateurs, des co-intégrateurs) et plusieurs molécules de la machinerie transcriptionnelle générale (Giguere, 1999).

4. 2. Structure générale des récepteurs nucléaires

Bien que chaque famille de récepteurs nucléaires possède des caractéristiques qui lui sont propres; la structure générale des récepteurs nucléaires se décompose en quatre modules : le domaine régulateur, la domaine de liaison à l'ADN (DBD), la région charnière et le domaine de liaison au ligand (LBD) (figure n°2).

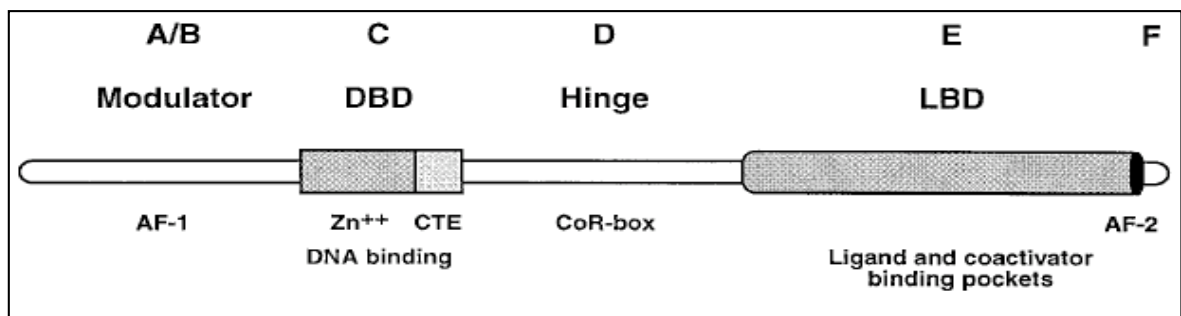


Figure n°2 : Anatomie des récepteurs nucléaires. Les récepteurs nucléaires sont composés de domaines fonctionnels indépendants qui incluent le DBD et le LBD, leur fonction principale est de reconnaître des séquences spécifiques d'ADN et de ligands respectivement. Les récepteurs nucléaires possèdent généralement deux fonctions activatrices de transcription (AF-1 et -2) localisées aux terminaisons amino et carboxy-terminales. La division des récepteurs nucléaires en domaines allant de A à F est basée sur le degré de conservation des séquences d'acides aminés du même récepteur entre les différentes espèces (Giguere, 1999).

Le domaine régulateur, aussi appelé domaine A/B sur le schéma, est celui qui démontre le plus de variabilité en terme de séquence et de taille. Il contient, en générale, un domaine d'activation de la transcription (appelé AF-1 (Fonction Activatrice 1)) spécifique de la cellule et du gène cible ce qui laisse suggérer une action avec des cofacteurs spécifiques. Le domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding Domaine : DBD) des récepteurs nucléaires est le plus conservé. Il est composé de deux doigts de zinc codés par 66 à 70 acides aminés et une extension en Ct (CTE) d'environ 25 résidus (Giguere, 1999). La région charnière, ou « hinge » sur le schéma, sert de lien entre le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de liaison au ligand. Elle est fortement variable à la fois en taille et en séquence. Cette région se doit d'être très flexible pour permettre au domaine de liaison à l'ADN de tourner de 180° pour permettre à certains récepteurs de se fixer soit en monomères, homodimères ou hétérodimères sur les séquences consensus de façon directe ou inversée. Cette région pourrait également servir de point d'encrage à des corépresseurs (Giguere, 1999). Le domaine de liaison au ligand (Ligand Binding Domain LBD), est multifonctionnel et possède un rôle clef dans l'activation de la transcription en régulant la liaison au ligand, la dimérisation, l'interaction avec les protéines chaperonnes ou encore, la localisation nucléaire des récepteurs. Il est à noter que l'activité transcriptionnelle ligand dépendante dépend d'un motif fortement conservé appelé Fonction Activatrice 2 (AF-2) qui joue un rôle obligatoire (Giguere, 1999).

4. 3. Les récepteurs nucléaires de la famille des NR4A

4. 3. 1. Structure générale des récepteurs nucléaires de la famille des NR4A

Les membres de la famille des NR4A possèdent plusieurs noms selon l'espèce ou le tissu où ils ont été répertoriés d'où la nécessité d'une nomenclature officielle (tableau n°2). Leurs particularités structurelles résident en la présence d'un domaine AF-1 très puissant pour le recrutement de co-activateurs transcriptionnels et un domaine AF-2 atypique dépourvu de cavité à cause de la présence de résidus hydrophobes volumineux

ce qui leurs confèrent une activité transcriptionnel constitutive (Maxwell and Muscat, 2006).

4. 3. 2. Activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires de la famille des NR4As

4. 3. 2. 1. Activité monomérique des membres de la famille des NR4As

Nurr-1, Nur77 et Nor-1 sont capables de se fixer en monomères sur le consensus NGFI-B Response Element (NBRE) 5'-AAAGGTCA-3' (Nurr-1 (Searce et al., 1993), Nur77 (Wilson et al., 1991), Nor-1 (Ohkura et al., 1994)). La séquence **AGGTCA** est également reconnue par les récepteurs aux estrogènes, les hormones thyroïdiennes, la vitamine D et les rétinoïques acide-X receptors (RXR) mais ce sont les deux adénines supplémentaires qui caractérisent la séquence consensus NBRE reconnue par le DBD des Nurs (Wilson et al., 1991).

4. 3. 2. 2. Activité dimérique des membres de la famille des NR4As

Au sein de la famille des NR4As, chacun des membres peut former soit des homodimères soit des hétérodimères qui reconnaissent une séquence consensus appelée Nur-responsive Element (NurRE) (figure n°3) (Maxwell and Muscat, 2006). Certains membres de la famille des NR4As (Nurr-1 et Nur77) sont capables de s'hétérodimériser avec RXR (un membre des récepteurs nucléaires activé par l'acide 9 cis rétinoïque) sur les séquences consensus DR5 (Perlmann and Jansson, 1995) et dans certains cas sur la séquence NBRE (Forman et al., 1995) (figure n°3). Ceci permet à Nurr-1, Nur77 et surtout RXR, puisqu'il devient le partenaire actif, de réguler d'autres champs d'activité transcriptionnelle que les gènes qui leurs sont associés (Levesque and Rouillard, 2007). Il a également été démontré que Nor-1, quant à lui, n'était pas capable de former d'hétérodimères avec RXR (Zetterstrom et al., 1996a).

Tableau n°2 : Nomenclature officielle et alternative des récepteurs nucléaires de la sous-famille des Nurs, adapté de (Maruyama et al., 1998).

Nomenclature officielle (Germain et al., 2006)	Humann	Rat	Souris
NR4A1	TR3 (Chang et al., 1989)	NGFI-B (Milbrandt, 1988)	Nur77 (Hazel et al., 1988)
	NAK1 (Nakai et al., 1990)		N10 (Ryseck et al., 1989)
	ST59 (Bondy, 1991)		TIS1 (Varnum et al., 1989)
NR4A2	NOT (Mages et al., 1994)	RNR-1 (Searce et al., 1993)	Nurr-1 (Law et al., 1992)
	TINUR (Okabe et al., 1995)	HZF-3 (Pena de Ortiz and Jamieson, 1996)	
NR4A3	MINOR (Hedvat and Irving, 1995)	NOR-1 (Ohkura et al., 1994)	
	TEC (Labelle et al., 1995)	NOR-2 (Petropoulos et al., 1995)	
	NOR-1 (Ohkura et al., 1996)		
	CHN (Clark et al., 1996)		



Figure n°3 : Consensus NR4As : les membres de la famille des NR4As peuvent se fixer en monomères sur le consensus NBRE (A), en homodimères et hétérodimères NR4As sur le consensus NurRE (B) ou en hétérodimères avec RXR sur le motif DR5 (C). Le consensus NurRE correspond au consensus trouvé sur le promoteur de la pro-opiomélanocortine (POMC) (Maxwell and Muscat, 2006).

4. 3. 3. Les membres de la famille des NR4As en tant que gènes d'induction précoce (Immediate Early Gene (IEG))

La structure génétique du promoteur de chacun des NR4As en fait des gènes d'induction précoce. Ils sont induits par une foule de signaux physiologiques comme les acides gras, le stress, les prostaglandines, les facteurs de croissance, le calcium, les cytokines inflammatoires, les hormones peptidiques, les esters de phorbol, l'AMPc et les neurotransmetteurs (Maxwell and Muscat, 2006) (figure n°4). En outre, les gènes des NR4As sont aussi induits par des stimuli physiologiques tels que la dépolarisation membranaire, l'agitation mécanique (à cause des déplacements de fluides) et les champs magnétiques (Maruyama et al., 1998) (Maxwell and Muscat, 2006) (figure n°4). Ainsi, la multitude de signaux capables d'induire les gènes puis donc d'activer les fonctions physiologiques des membres de la famille des NR4As nous laisse supposer un rôle dans le système périphérique des NR4As probablement multi-systémique, multi-tissulaire et multifonctionnel comme schématisé de façon non exhaustive dans le figure n°5. Cependant comme la présente thèse porte sur l'implication des membres de la familles des NR4As dans les désordres dopaminergiques au sein du système nerveux central, il n'en sera pas fait mention de façon plus approfondie ici.

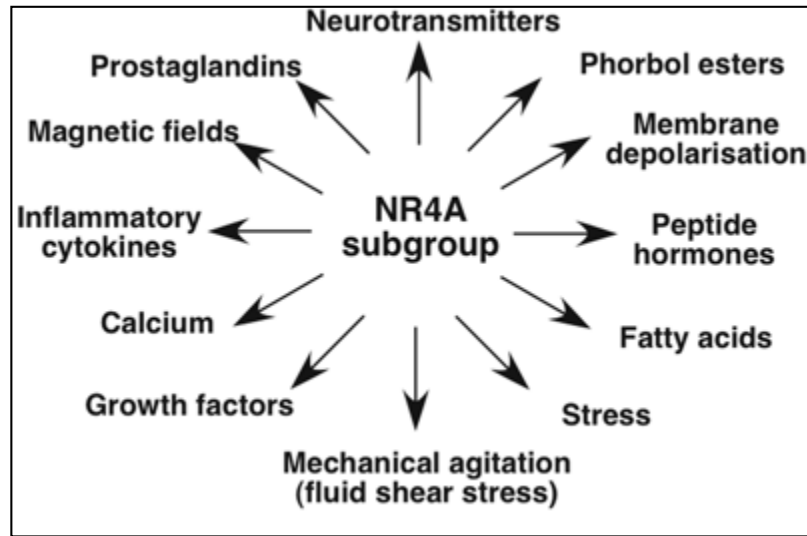


Figure n°4 : Divers stimuli induisent les gènes de la famille des NR4As. Nur77, Nor-1 et Nurr-1 sont des gènes d'induction précoce qui sont induits en réponse à des changements de l'environnement cellulaire provoqués par des stimuli physiologiques et physiques (Maxwell and Muscat, 2006).

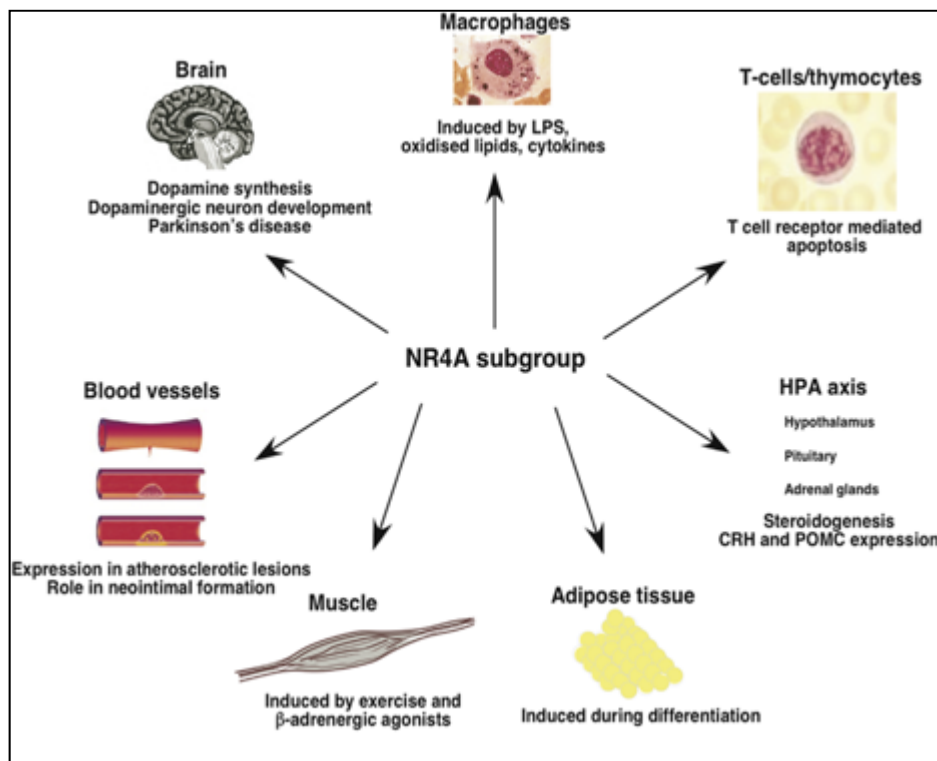


Figure n°5 : Organes et tissus avec des effets spécifiques des membres de la sous-famille des NR4As. Résumé schématique de l'effet pleiotropique cellules spécifiques des NR4As

en tant que gènes d'induction précoce dans une variété de conditions physiopathologiques (Maxwell and Muscat, 2006).

4. 3. 4. Les récepteurs nucléaires de la famille des NR4As au sein du système nerveux central

Il existe une chronologie dans l'expression des NR4As au sein du système nerveux central. Un rôle dans le développement du cerveau est attribué à Nurr-1 et à Nor-1 puisque Nurr-1 est fortement exprimé en milieu de gestation et qu'un pic d'expression de Nor-1 se retrouve en fin de gestation ce qui n'est pas le cas de Nur77 dont l'expression est maximale dans le cerveau adulte (Zetterstrom et al., 1996b), (Ohkura et al., 1998), (Gofflot et al., 2007).

4. 3. 4. 1. NR4A2 (Nurr-1) au sein du système nerveux central

4. 3. 4. 1. 1. Caractérisation protéique de NR4A2

L'ADNc total de *nurr-1* code une protéine de 66 KDa, de 597 (Searce et al., 1993) à 598 (Law et al., 1992) acides aminés. Le domaine de liaison à l'ADN de Nurr-1 présente 94% d'homologie avec celui de Nur77 (Searce et al., 1993). L'épissage alternatif de *nurr-1* génère deux transcrits différents : *nurr-1* et *nurr-1a* dont l'épissage alternatif de l'exon 7 fait apparaître un codon stop donnant une protéine de 455 acides aminés avec une région carboxy-terminale tronquée (Law et al., 1992). Un troisième isoforme de Nurr-1 est Nurr-2a qui, en plus de la région carboxy-terminale (Ct) tronquée de Nurr-1a, possède une région amino-terminale (Nt) déficiente de trois acides aminés (Ohkura et al., 1999). On retrouve chez Nurr-1 (Nur-Related Receptor 1) les particularités structurales des Nurs avec un domaine de liaison au ligand repliée de façon agoniste actif constitutif, pas de cavité pour des ligands à cause de la présence de chaînes latérales hydrophobes et un domaine modulateur (A/B (figure n°2)) qui ne possède pas de site classique pour les co-activateurs transcriptionnels (Wang et al., 2003). Comme nous le disions en début de chapitre, Nurr-1 est exprimé à un fort niveau dans le cerveau (Searce et al., 1993). Il est exprimé lors du développement précoce du système nerveux central; son expression persiste pendant la période près et post natale et il est également

exprimé dans certaines régions du système nerveux adulte, le tubercule olfactif, certaines parties du cortex, l'hippocampe et la substance noire (Zetterstrom et al., 1996b).

4. 3. 4. 1. 2. *Caractérisation génétique de NR4A2*

Les conditions de la découverte de Nurr-1 ne sont pas claires. Une étude affirme que Nurr-1 aurait été isolé d'une banque d'ADNc de cerveau néonatal de souris avec une sonde codant le domaine de liaison à l'ADN de COUP-TF (un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires orphelins) (Law et al., 1992) tandis qu'une autre explique que Nurr-1, alors appelé RNR-1 pour (regenerating liver nuclear receptor 1), ait été identifié lors du processus de régénération cellulaire du foie par Scearce et al. en 1993 (Scearce et al., 1993). Cette dichotomie scientifique a donné lieu, à certaines dissemblances concernant la caractérisation génétique de *nr4a2*. Selon la source utilisée, mais toujours chez la souris, certaines études lui attribuent un gène de 6,2 kilo bases, organisé en 7 exons séparé de 6 introns (Saucedo-Cardenas et al., 1997) alors que d'autres, se basant sur la découverte de Law et al., en 1992, lui attribue 8 exons et 7 introns pour un total de 7 kilo bases sur le chromosome 2 (Castillo et al., 1997). Ceci en fait un gène avec tantôt le premier exon non traduit (Saucedo-Cardenas et al., 1997) tantôt les deux premiers exons non traduits (Castillo et al., 1997).

La même « incertitude » persiste au niveau de la structure promotrice de *nr4a2*. En effet, le promoteur de *nr4a2* ne contenant pas de TATA boîte ni de CCAAT boîte mais plusieurs GC boîtes certaines études trouvent 5 sites potentiels d'initiation de la transcription (Saucedo-Cardenas et al., 1997) alors que d'autres en trouvent 2 (Castillo et al., 1997).

Le promoteur de *nurr-1* contient également plusieurs séquences consensus bien identifiées dont :

- un élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) -TGTTCTT-
- un élément de réponse à l'AMPc pour CREB (CRE) -TGACGTCA-
- une boîte CArG [CC(A/T)₇GG]
- deux consensus c-Jun -TAGC-

- des consensus SP1 –GGCGGG- qui sont des consensus AP-1/c-Jun espacés de régions riches en GC (AP-1 est le consensus spécifique des membres de la famille des Jun et Fos (Halazonetis et al., 1988) (Kouzarides and Ziff, 1988) (Nakabeppu et al., 1988) (Rauscher et al., 1988) (Sassone-Corsi et al., 1988). La plupart des gènes avec des consensus AP1 sont des IEGs (Karin, 1995)).

Aucun élément de réponse au sérum (SRE) ni de consensus ETS n'ont été trouvés (Castillo et al., 1997). Cependant, deux autres consensus peuvent faire de *nurr-1* un gène d'induction précoce; c'est à dire un gène inductible sans nécessité de synthèse protéique. Premièrement, le consensus CArG de *nurr-1* qui contient 7 (A/T) est similaire à celui de *c-fos* qui est aussi un gène d'induction précoce induit dans le striatum suite à des déséquilibres dopaminergiques (Castillo et al., 1997). Deuxièmement, *nurr-1* possède un consensus CRE que l'on retrouve chez *c-fos* et qui est responsable de l'induction de ce dernier *via* CREB en réponse soit à une entrée de KCl ou à l'activation de l'AMPc (Saucedo-Cardenas et al., 1997) (Castillo et al., 1997).

Parmi les sites potentiels d'initiation de la traduction nous retrouvons en 5' de l'exon 1 et en aval, au nucléotide +38, une thymidine (T) entourée d'une adénosine et d'une guanine (A et G) qui représente la séquence la plus fréquente des sites d'initiation de la traduction chez les eucaryotes (consensus GCCA/GCCATGG) (Kozak, 1987) (Castillo et al., 1997). De plus, il a été démontré que tous les sites d'épissage de l'ARNm de *nr4a2*, suivaient la loi du donneur accepteur GT/AG établie en 1982 par Mount et al. (Mount, 1982). En ce qui concerne le dernier exon de *nr4A2*, il possède un codon stop et une région 3' riche en répétitions AUUUA qui facilite la dégradation ciblée de l'ARNm ou sa déstabilisation en enlevant la queue poly(A) (Saucedo-Cardenas et al., 1997).

4. 3. 4. 1. 3. Knockout de NR4A2

Trois souches de souris Nurr-1 knockout ont été générées séparément (Zetterstrom et al., 1997) (Saucedo-Cardenas et al., 1998) (Castillo et al., 1998). Elles possèdent toutes le même phénotype. Elles se développent normalement *in utero* sans altérations anatomiques mais meurent 24h00 après leur naissance (Zetterstrom et al., 1997) (Saucedo-Cardenas et al., 1998) (Castillo et al., 1998). En effet, il a été démontré qu'en

absence de Nurr-1, les cellules neuroépithéliales générant les neurones dopaminergiques adoptent une localisation mésencéphalique normale ainsi qu'un phénotype neuronal mais elles ne se différencient pas en neurones dopaminergiques (Maruyama et al., 1998) et dégèrent par apoptose suggérant que Nurr-1 puisse jouer un rôle dans la différenciation et la survie des neurones dopaminergiques de la SN et de la VTA (Zetterstrom et al., 1997) (Saucedo-Cardenas et al., 1998) (Castillo et al., 1998). En effet, chez ces souris, les neurones dopaminergiques du diencephale, de l'hypothalamus et du tubercule olfactif sont préservés avec une diminution des niveaux de dopamine de 98% dans le striatum et 65% dans le tubercule olfactif ce qui n'est pas le cas des souris Nurr-1 hétérozygotes qui sont semblables aux souris sauvages (Le et al., 1999). Ce phénotype chez les souris Nurr-1 knockout est probablement due au rôle de ce dernier dans l'activation transcriptionnelle de la tyrosine hydroxylase (Sakurada et al., 1999) qui est une enzyme essentielle pour le développement et le maintien du phénotype dopaminergique (Zetterstrom et al., 1997) (Kadkhodaei et al., 2009).

Le deuxième récepteur nucléaire à être exprimé chronologiquement parlant dans le développement du système nerveux central en fin de gestation est Nor-1 même si ce fut le dernier découvert en 1994 (Ohkura et al., 1994) après Nurr-1 en 1992 (Law et al., 1992) et Nur77 en 1988 (Milbrandt, 1988) (rat) (Hazel et al., 1988) (souris).

4. 3. 4. 2. NR4A3 (Nor-1) au sein du système nerveux central

4. 3. 4. 2. 1. Caractérisation protéique de NR4A3

Nor-1, découvert par réplique de l'ARNm en ADNc (RT-PCR) sur cultures primaires de neurones (Ohkura et al., 1994) est une protéine de 628 acides aminés pesant 68 kilo Daltons dont le domaine de liaison à l'ADN possède de fortes homologies avec celui des autres membres de la famille des NR4As (Ohkura et al., 1994). D'ailleurs, il existe 91 à 97% d'homologie dans l'alignement des séquences d'acides aminés de Nor-1, Nur77 et Nurr1 ce qui en fait une famille de récepteurs nucléaires distincte et singulière (Ohkura et al., 1996). Dans le système nerveux central, Nor-1 est induit dans le cerveau fœtal en fin de gestation où il pourrait avoir un rôle dans le processus de développement du

système nerveux (embryogenèse, apoptose, différenciation) et il est également présent à un faible niveau, dans le cerveau adulte, au niveau du striatum (Ohkura et al., 1994). Le rat exprime un deuxième isoforme de Nor-1, Nor-2, qui est une forme tronquée de Nor-1 (Ohkura et al., 1998). L'ADNc de Nor-2 possède 100% d'homologies avec le domaine de transactivation et le domaine de liaison à l'ADN de Nor-1, pas de domaine de liaison au ligand et deux régions non traduites, en 5' et en 3', non répertoriées chez les membres de la famille des Nurs (Petropoulos et al., 1995). Chez l'humain, deux isoformes également ont été identifiés, Nor-1 β et Nor-1 β ' (Ohkura et al., 1998).

4. 3. 4. 2. 2. *Caractérisation génétique de NR4A3*

Les structures génétiques de *nor-1* et de *nur77* possèdent de fortes similarités, particulièrement pour les jonctions exons/introns (Ohkura et al., 1996) ce qui est également le cas de *nurr-1* (Saucedo-Cardenas et al., 1997).

Le promoteur de *nor-1* contient, chez l'humain :

- trois sites de liaison possibles pour SP-1
- deux consensus AP-1
- trois sites CRE
- un élément ressemblant à Myo-D (Ohkura et al., 1998).

Chez le rat, deux consensus DR-4 en -97 et -982 ont plus récemment été identifiés (Kumar et al., 2009) en plus de la confirmation des trois sites CRE dans la région proximale (de -79 à -46) du promoteur (Rius et al., 2004). L'initiation de la traduction de *nor-1* se fait selon deux consensus ATG (en +347 et en +700) avec une préférence pour le deuxième ATG (Ohkura et al., 1994). La région 3' non codante possède deux signaux de polyadénylation (position 3,126 et 4,115) et 5 répétitions de séquences AUUUA ce qui en fait un ARNm à durée de vie courte (Ohkura et al., 1994).

4. 3. 4. 2. 3. *Knockout de NR4A3*

Deux souches de souris Nor1 knockout ont été générées. La première en 2003 où les souris Nor-1 knockout présentent un développement interrompu dans les premières phases du développement embryonnaire (8,5 jours de gestation) ce qui suggère un rôle

de Nor-1 dans la gastrulation (DeYoung et al., 2003). La deuxième en 2004, où les souris Nor-1 knockout sont viables mais présentent un défaut de l'oreille interne, une perte de comportement bidirectionnel circulaire associé à une diminution de l'espace du fluide endolymphatique ce qui est en accord avec l'expression de Nor-1 dans le canal semi-circulaire formant la fusion des plaques et des cellules épithéliales non sensorielles (Ponnio et al., 2002); une plus forte sensibilité à des agonistes glutamatergiques et une augmentation de l'activité des « seizures limbiques ». Ce phénotype neuronale est associé à un défaut postnatal de développement de l'hippocampe, une guidance anormale des axones et une mort postnatale des neurones pyramidaux de l'hippocampe (Ponnio and Conneely, 2004).

4. 3. 4. 3. NR4A1 (Nur77) au sein du système nerveux central

Historiquement, Nur77 est le premier membre de la famille des NR4As découvert et identifié en tant que gène d'induction précoce en réponse au Nerve Growth Factor (NGF) chez le rat (NGFI-B) (Milbrandt, 1988) et en réponse au sérum dans les fibroblastes de souris (Hazel et al., 1988). Sa séquence d'acides aminés fut comparée à celles de la National Biomedical Research Foundation data base (release 14.0) où ils trouvèrent des homologies, dans le domaine de liaison à l'ADN, avec les facteurs de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires (Evans and Hollenberg, 1988). Bien qu'ayant une plus forte homologie avec les récepteurs nucléaires appartenant à la famille des récepteurs nucléaires aux hormones stéroïdiennes/thyroïdiennes; ce qui a attiré l'attention chez Nur77 c'est qu'il possédait un site d'épissage alternatif supplémentaire, localisé dans la région codant le domaine de liaison à l'ADN, qui en faisait un membre distinct constituant une autre étape dans l'évolution génétique de cette famille de récepteurs (Watson and Milbrandt, 1989).

4. 3. 4. 3. 1. Caractérisation protéique de NR4A1

L'ARNm de *nur77* code une protéine de 64,738 Kilo Daltons avec un point isoélectrique de 6,72 (Lau and Nathans, 1987). Il existe, entre les résidus de lysine 32 et 104, une région riche en proline, en acide glutamique, en sérine et thréonine; typique des

protéines à demie vie courte comme les produits des gènes des membres de la superfamille des récepteurs nucléaires (Rogers et al., 1986). Le domaine Nt d'NGFI-B est responsable de l'activité transactivationnelle et le domaine Ct du LBD régule la localisation subcellulaire et la transactivation (Davis et al., 1993). Dans le DBD un motif en aval des doigts de zinc appelé la A box est requis pour la forte affinité de la fixation à l'ADN (Wilson et al., 1992). Nur77 est riche en sérines et thréonines et contient beaucoup de sites de phosphorylation potentiels dans sa région amino-terminale alors que la région carboxy-terminale en est dépourvue (Davis et al., 1993). Il a été démontré que, dans les PC12, la forme sous phosphorylée de Nur77 était présente au noyau alors que la forme hautement phosphorylée était présente dans le cytoplasme (Fahrner et al., 1990). Nur77 est fortement exprimé dans le cerveau adulte (tubercule olfactif, cortex, ganglions de la base, et hippocampe) (Zetterstrom et al., 1996b) (Gofflot et al., 2007) et plus particulièrement dans les structures où est exprimé le récepteur aux réxinoïdes RXR γ 1 pour les ganglions de la base et le cortex (Levesque and Rouillard, 2007).

4. 3. 4. 3. 2. *Caractérisation génétique de NR4A1*

Le gène de Nur77 est constitué de 7 exons, l'exon 1 ne contient qu'une région 5' non traduite et la division du domaine de liaison à l'ADN entre deux exons, l'exon 2 et 3 est unique (Evans, 1988). Une autre particularité de Nur77 par rapport aux récepteurs des hormones stéroïdiennes/thyroïdiennes est que le domaine de liaison du ligand est codé sur 3 exons avec un premier intron de seulement 89 nucléotides (le plus petit du gène) plutôt que 4 exons de même taille séparés par trois grand introns de taille identiques (Watson and Milbrandt, 1989). Le promoteur de *nur77* ne possède pas de TATA boxe. Ceci en fait un gène dont le site d'initiation de la transcription est hétérogène. Il s'agit d'une caractéristique qui est fréquemment retrouvée chez les housekeeping gènes exprimés de façon constitutive à un faible niveau dans tous les tissus tandis que *nur77* est un gène d'induction tissus spécifique ce qui suggère d'autres éléments de régulation (Watson and Milbrandt, 1989).

Si plusieurs données de la littérature sont d'accord pour attribuer au promoteur de *nur77* certains consensus dont :

- plusieurs boîtes GC –CCGCCC- dont trois aux locus -62, -121 et - 181 qui constituent des sites de fixation pour SP-1 (Dyner and Tjian, 1983)
- quatre sites AP-1 –TGCGTCA- localisés en -49, -78, -222, - 242 (Fisch et al., 1989)
- deux sites ETS (Eells JB, 2000)
- deux consensus MEF2 qui répondent aux éléments de régulation de l'ADN *via* le calcium (Youn et al., 1999).

D'autres données divergent quant à la présence de sites CArG-like (Williams and Lau, 1993) ou l'absence de sites CArG-like (Watson and Milbrandt, 1989). Ces auteurs expliquent l'induction de *nur77* initialement observée dans les PC12 *via* le NGF par une augmentation de l'activité transcriptionnelle cellulaire globale (Watson and Milbrandt, 1989). Cependant, d'autres études plus récentes, montrent la présence d'un site CArG-like entre les nucléotides -86 et -126 et de deux consensus SRE (aussi appelés RSRE) expliquant que le SRF sur CArG-like recrute Elk-1 sur le SRE (Ryseck et al., 1989) (Woronicz et al., 1995) (Williams and Lau, 1993).

*Remarque : la boîte CArG-like est un motif similaire à celui reconnu par le Facteur de Réponse au Sérum (SRF) impliqué i) dans la régulation du gène cardiaque α -actine (Minty and Kedes, 1986) et ii) en l'absence (Watson and Milbrandt, 1989) de séquences Serum Response Element (SRE) qui est reconnue par le SRF (Norman et al., 1988). La boîte CArG-like confère une induction d'IEG *via* le SRF et le NGF (Sheng et al., 1988) (Treisman, 1986).*

L'ARNm de *nur77* contient trois séquences d'initiation de la traduction (ATG) en 5' de l'ADNc aux positions +112, +214 et +280. De plus, il existe un ATG hors du cadre de lecture en position +134. Le premier ATG, en position +112, a une faible ressemblance avec le consensus d'initiation de la transcription décrit par Kozak (Kozak, 1986) alors que les ATG en position +214 et +134 sont entourés d'une séquence plus favorable (Kozak, 1980) (Wilson et al., 1992). En accord avec ses fonctions de gène d'induction

précoce, l'ARNm de *nur77* a une demie vie courte d'environ 20 minutes (Lau and Nathans, 1987) à cause, notamment, de trois motifs répétés ATTTA (ou AUUUA) en 3' (région non codante incluse dans l'exon 7 (Milbrandt, 1988)) contribuant à l'instabilité de l'ARNm (Shaw and Kamen, 1986).

4. 3. 4. 3. 3. *Knockout de NR4A1*

À l'inverse des souris Nor-1 et Nurr-1 knockout, les souris Nur77 knockout (Milbrandt, 1988), se développent normalement sans altération de leurs fonctions physiologiques (Milbrandt, 1988) (Crawford et al., 1995). On retrouve cependant un défaut de sélection des lymphocytes T responsable de maladies auto-immunes chez les souris Nur77 knockout (Lee et al., 1995).

4. 4. Les récepteurs aux rétinoïdes au sein du système nerveux central

Il existe deux sous-familles de récepteurs nucléaires aux rétinoïdes (les rétinoïdes sont des dérivés de la vitamine A) : les *Retinoïc Acide Receptors* (RAR) qui sont activés par tous les acides rétinoïques trans et par l'acide 9-cis rétinoïque et les *Retinoïdes acides Receptors* (RXR) qui sont activés exclusivement par l'acide 9-cis rétinoïque (Maden, 2002) (Chambon, 1996). Cependant, dans le cerveau, RXR serait également capable de répondre à l'acide docosahexaénoïque (DHA, agoniste RXR) (de Urquiza et al., 2000). Chacune de ces deux sous-familles est composée de trois isotypes (RAR α , RAR β , RAR γ) et (RXR α , RXR β , RXR γ) codés par des gènes différents (Chambon, 1996).

Remarque : Le DHA, une longue chaîne d'acides gras polyinsaturés fortement présente dans le cerveau de mammifères, est essentiel à la maturation du cerveau. Une déficience en DHA, à la fois chez le rongeur et chez l'humain, conduit, entre autre, à une altération de l'apprentissage spatial qui pourrait passer par RXR via le DHA (de Urquiza et al., 2000).

Les RXRs sont des partenaires d'hétérodimérisation de beaucoup d'autres récepteurs nucléaires. D'un point de vue consensus, orientation, espacement et séquences

nucléotidiques alentoures, les hétérodimères RXRs sont plus sélectifs dans leur fixation à l'ADN que les homodimères. Ces derniers se fixent sur la séquence DR1 tandis que les hétérodimères peuvent se fixer sur les séquences DR1, DR2, DR3, DR4 et DR5 dépendamment du partenaire (Chambon, 1996). Les séquences DR1 à DR5 sont des séquences **GGTTCAA** et **AGTTCA** plus ou moins conservés, espacées de 1 à 5 nucléotides d'où le nom DR1 à DR5 (figure n°3). Il a été biochimiquement établi qu'RXR occupait la position 5' des motifs DR2, DR3, DR4 et DR5 alors que le partenaire d'hétérodimérisation occupait le motif 3' (Perlmann and Jansson, 1995) (Chambon, 1996) tandis que sur le motif DR1, RXR est en 3' (Kurokawa et al., 1994) ou peut occuper les deux positions (Chambon, 1996). Les hétérodimères RXR/Nurr-1 et RXR/Nur77 se fixent sur la séquences DR5 (GGTTCAAccgaaAGTTCA) qui est le site privilégié pour la fixation de l'hétérodimère RXR/RAR (Perlmann and Jansson, 1995) mais peuvent aussi se fixer sur les séquences DR1 et DR2 (Chambon, 1996).

En ce qui concerne les NR4As, seuls Nurr-1 (Law et al., 1992) et Nur77 (Searce et al., 1993) sont capables de former des hétérodimères avec RXR (Perlmann and Jansson, 1995). Nor-1 n'en est pas capable (Perlmann and Jansson, 1995) en raison d'une incapacité structurelle (Zetterstrom et al., 1996a). Les hétérodimères RXR α /Nurr-1 et RXR γ /Nurr-1 se fixent sur les séquences répétées directes NBRE sans importance pour l'espacement entre les séquences mais avec un minimum requis de trois NBREs (donc la présence de trois hétérodimères) pour obtenir une activité transcriptionnelle répondant à la signalisation des rétinoïdes (Sacchetti et al., 2002). Or, si l'on considère que l'hétérodimère RXR/Nurr-1 est plus actif sur le consensus NBRE (figure n°3) que sur la séquence préférentielle d'RXR (Forman et al., 1995) Nor-1 devient un inhibiteur de l'activité transcriptionnelle du complexe RXR/Nurr-1 en entrant en compétition sur le même site de liaison à l'ADN (Zetterstrom et al., 1996a).

Dépendamment de son partenaire d'hétérodimérisation, RXR peut être le partenaire actif (comme avec les Nurs) répondant à la stimulation de l'acide 9 cis rétinoïque ou le partenaire silencieux répondant à la stimulation spécifique de son partenaire (comme avec RAR) (Chambon, 1996). Il a été démontré qu'une ou deux mutations nulles dans

les gènes des récepteurs RAR β , RXR β et RXR γ menaient à des défauts de la locomotion dus à des dysfonctions de la signalisation dopaminergique du mésencéphale et une diminution de l'expression des récepteurs D1 et D2 dans le striatum ventral des souris adultes mutantes (Krezel et al., 1998). Cependant, ce sont les isoformes RXR γ et RAR β qui sont les plus fortement exprimés dans les régions innervées par les neurones dopaminergiques (caudé/putamen, noyau accumbens core et shell, tubercule olfactif (Zetterstrom et al., 1999)) ainsi que certaines parties de l'amygdale, toutes les parties de l'hypothalamus, la moelle épinière et la partie antérieure de la glande pituitaire (Krezel et al., 1999). De plus, l'isoforme RXR γ majoritairement exprimé dans le striatum est RXR γ 1 (Saga et al., 1999) dont le marquage correspond aux voies principales de projection dopaminergiques, à la fois les neurones de projection majeurs et leurs cibles telles que les systèmes mésolimbiques et nigrostriataux (Levesque and Rouillard, 2007).

4. 4. 1. Knockout RXR

Les données scientifiques concernant les souris knockout RXR ne sont pas homogènes. Un article de 1996 montre que les souris RXR γ ^{-/-} se développent normalement et possèdent un phénotype non distinct de celui des souris RXR γ ^{+/-} ou RXR γ ^{+/+} concluant que RXR γ n'exerce aucun rôle qui ne puisse être exercé par RXR α ou RXR β et qu'une seule copie d'RXR α est suffisante pour exercer la plupart des fonctions d'RXR (Krezel et al., 1996). Une étude plus spécifique sur l'isoforme RXR γ 1 montre que la plupart des souris RXR γ 1^{-/-} meurent avant le sevrage ou dans les 1 à 2 mois suivant la naissance et démontrent une grande faiblesse et une perte de poids sévère (Saga et al., 1999). Leurs souris homozygotes RXR γ 1^{-/-} étant générées à partir de croisement d'hétérozygotes, ils ont pu aussi déterminer que ce taux de létalité dépendait du background génétique des souris, les souches 129 étant plus fragiles (Gerlai, 1996), voir même des lignées de cellules ES et du vecteur utilisé pour le clonage puisque les souris homozygotes RXR γ 1^{-/-} (B6/CBA (NDR : lignées de souris)) venant des cellules ES TT2 avec le vecteur TV-2 étaient en santé (Saga et al., 1999). De plus, ces auteurs ont pu définir qu'indépendamment du background génétique, il existait, chez les souris RXR γ 1^{-/-}, une

réduction de l'expression de la choline acétyl transférase dans les interneurons cholinergiques du striatum, ainsi qu'une réponse altérée à l'administration d'halopéridol et de chlorpromazine qui normalement induisent des catalepsies chez la souris en aigue (Saga et al., 1999). Donc indépendamment du bagage génétique des souris RXR γ 1 déficientes il a pu être démontré que cet isoforme intervenait dans l'action des antipsychotiques typiques.

4. 5. Découvertes au sein du laboratoire sur les NR4As et RXR

En résumé, les membres de la famille des NR4As sont des gènes d'induction précoce induits par la présence d'agents exogènes agissant sur le système dopaminergique comme les antipsychotiques, les antiparkinsoniens ou encore des drogues d'abus *via* un mécanisme non encore complètement élucidé ni exploré. C'est pourquoi, dans la présente thèse, nous nous baserons sur les altérations moléculaires connues induites par ces différentes drogues pour explorer un rôle plurifonctionnel des NR4As selon la population neuronale activée (neurones de la voie D1 ou D2) de façon contexte dépendante (présence d'antagonistes D2, d'agonistes D1 sur un striatum dénervé (modèle animal de maladie de Parkinson) ou intacte, activation pharmacologique ou contexte de drogues d'abus.

La figure n°6 résume la localisation au sein du système nerveux central adulte de l'expression des NR4As; expression circonscrite au sein des structures exprimant le récepteur nucléaire RXR γ 1 qui sont les structures anatomiques appartenant au système dopaminergique localisé dans les ganglions de la base. Ce schéma montre que Nur77 et Nor-1 sont principalement exprimés dans les structures cibles des neurones dopaminergiques de la SN et de la VTA où Nurr-1 est indispensable à la différenciation et au maintien des neurones dopaminergiques. Vous remarquerez dans la partie (a) de la figure que l'isoforme RXR γ 1, coloré en bleu, est spécifique des neurones du système dopaminergique, que ce soit le striatum dorsal, ventral, la SN ou la VTA (Levesque and Rouillard, 2007) (figure n°6).

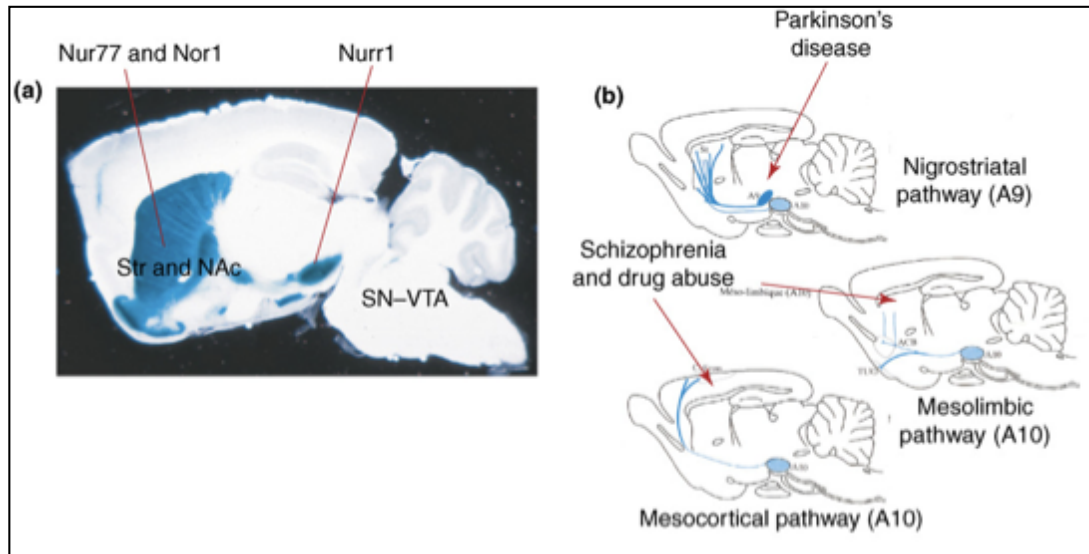


Figure n°6 : Relation entre l'isoforme RXR γ 1 et les NURS dans le système dopaminergique du système nerveux central. **(a)** la distribution d'RXR γ 1 est montrée en coloration bleu sur une section sagittale dans le cerveau adulte d'une souris RXR γ 1 $^{+/-}$. Nur77 et Nor-1 sont exprimés dans les aires recevant les afférences dopaminergiques telles que le striatum (Str) et le noyau accumbens (Nac), tandis que Nurr1 est exprimé dans les neurones dopaminergiques de la substance noire et de l'aire tegmentale ventrale (SN-VTA). **(b)** il est à noter la similarité de la distribution d'RXR γ 1 en (a) avec les voies dopaminergiques nigrostriatales (qui sont associés au contrôle des comportements moteurs et à la maladie de Parkinson) ainsi qu'avec les voies mésolimbiques et mésocorticales qui sont impliquées dans les fonctions associatives et limbiques, la schizophrénie et les drogues d'abus. Les noyaux A9 et A10 sont des groupes de neurones dopaminergiques identifiés par Dahlström et Fuxe [72]. Les cellules A9 ont été trouvées dans la substance noire *pars compacta* (SNpc) et les neurones A10 ont été trouvés dans l'aire tegmentaire ventrale (VTA) ; en conséquence, la SNpc et la VTA sont souvent référencés en tant que noyaux A9 et A10 respectivement (Levesque and Rouillard, 2007).

5. Les antiparkinsoniens

Les antiparkinsoniens constituent la pharmacopée actuelle contre la maladie de Parkinson. La maladie de Parkinson, décrite pour la première fois par James Parkinson (Parkinson, 1817), est une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques pigmentés de la substance noire *pars compacta* (SNc) projetant aux neurones corticaux et striataux par différentes voies (Ehringer and Hornykiewicz, 1960). Cette découverte donna lieu à une thérapie dite de remplacement avec l'utilisation de la lévodopa (Carlsson et al., 1957) (Birkmayer and Hornykiewicz, 1961).

5. 1. Pharmacopée contre la maladie de Parkinson

5. 1. 2. La lévodopa

La lévodopa ou L-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA), est le précurseur de la dopamine. Sa prescription sert à remplacer la dopamine qui, ne passant pas la barrière hémato-encéphalique, est inefficace par voie orale. Son précurseur immédiat, la L-DOPA, possède une structure similaire à celle de l'acide aminé précurseur de la dopamine, la tyrosine, ce qui lui permet d'utiliser son transporteur pour traverser la barrière hémato-encéphalique et se rendre au cerveau. Il est à noter que la L-DOPA, dès le système périphérique, est convertie en dopamine par la dopa-décarboxylase ce qui en limite sa biodisponibilité cérébrale. Ainsi, il est nécessaire d'associer à la L-DOPA un inhibiteur de dopa décarboxylase périphérique ce qui en augmente sa biodisponibilité pour le système nerveux central d'un facteur 5 mais aussi, réduit les effets indésirables périphériques (nausées, vomissements) et permet une action plus rapide avec des doses plus faibles. Il existe deux inhibiteurs de dopa décarboxylase, le carbidopa et le bensérazide. Il est à noter que, comme tout agent dopaminergique, la lévodopa a un potentiel d'abus puisque le noyau accumbens est relativement bien préservé dans la maladie de Parkinson.

5. 1. 2. 1. Dyskinésies Induites à la lévodopa

Le principal effet secondaire de la thérapie de remplacement à la L-DOPA réside en l'apparition de complications motrices à long terme appelées Lévodopa Induced Dyskinésias (LIDs) (Marsden and Parkes, 1977). Ces mouvements peuvent être classés comme des chorées, c'est à dire une hyper-kinésie sans but comme des mouvements de danse et des dystonies qui sont des contractions musculaires anormales soutenues. Duvoisin, en 1974, fut le premier à observer que plus de la moitié des patients avec la maladie de Parkinson développaient des dyskinésies dans les six mois suivant le traitement (Duvoisin, 1974). De plus, l'augmentation de la durée du traitement induit une augmentation de la sévérité des dyskinésies (Marsden, 1982); dyskinésies, qui seraient associées à une stimulation pulsatile des récepteurs dopaminergiques due à une

administration intermittente de lévodopa (prise orale essentiellement). Ces dyskinésies sont observées chez 20 à 30% des patients recevant de la lévodopa depuis une moyenne de 20,5 mois (1996) et chez 80% des patients sous traitement depuis 5 ans (Quinn, 1995) (Rascol et al., 2000).

5. 1. 3. Les agonistes dopaminergiques

Seuls les agonistes D2 et D3 semblent avoir des propriétés antiparkinsoniennes; les agonistes D1 ne sont pas cliniquement intéressants et il semble y avoir un problème de désensibilisation pour ces récepteurs. Les agonistes dopaminergiques furent introduits sur le marché pour leurs caractéristiques pharmacologiques. En effet, leur demie vie est plus longue (donc moins de stimulation pulsatile) et ils vont directement stimuler les récepteurs dopaminergiques, ce qui crée moins de fluctuations motrices et donc une apparition de dyskinésies plus faible. Cependant, une perte d'efficacité est observée. De plus, avec l'évolution dégénérative de la maladie, les agonistes dopaminergiques ne sont donnés qu'en première intention pour les stades précoces et en combinaison avec la dopa-thérapie lors des stades plus avancés. Il existe deux catégories d'agonistes dopaminergiques, les dérivés de l'ergot de seigle (bromocriptine=Parlodel®, pergolide=Permax®, cabergoline=Cabaser, Dostinex) et les agonistes synthétiques non-ergoliniques (apomorphine=Apokinson, Britaject; pramipexole=Mirapex; ropinirole=Requip; rotigotine=Neupro).

5. 2. Les LIDs dans la maladie de Parkinson

Le phénomène des LIDs est complexe et résulte de l'intrication de plusieurs processus moléculaires, comportementaux et moteurs. Au niveau moléculaire, certains auteurs pensent que l'apparition des LIDs est due à une forme d'apprentissage pathologique causé par une stimulation pulsatile chronique des récepteurs dopaminergiques *via* la L-DOPA conduisant à l'activation erronée de cascades moléculaires et biochimiques initiants l'apprentissage et la mémorisation de façon non appropriée (Calon et al., 2000) (Calabresi et al., 2000b) (Picconi et al., 2003) (Picconi et al., 2005) (Picconi et al., 2008) (Jenner, 2008). Or, de par la nature même de la L-DOPA qui est une drogue

psychoactive, ce qui est initié ici d'un point de vue comportemental, est un phénomène de sensibilisation, c'est à dire que la même dose de L-DOPA procure un effet de plus en plus prononcé sur un système anatomique des ganglions de la base intrinsèquement responsable des mouvements moteurs liés à la motricité normalement volontaire ce qui fait que les LIDs sont des mouvements moteurs involontaires anormaux qui apparaissent et en même temps perdurent en un apprentissage erroné de mouvements involontaires de plus en plus prononcés (sensibilisation) puisqu'il s'agit de la cascade de signalisation de l'apprentissage (les ERKs) qui est déclenchée du fait de la répétition systématique de l'activation des récepteurs dopaminergiques *via* la L-DOPA (Jenner, 2008).

5. 2. 1. Altérations moléculaires observées lors des LIDs dans la maladie de Parkinson

Il a été démontré que la potentialisation à long terme ou Long Terme Potentialisation (LTP) et la dépotentialisation à long terme ou Long Term Depotentialisation (LTD), deux mécanismes associés à l'apprentissage des habitudes et des procédés au sein du striatum (Bliss and Gardner-Medwin, 1973) (Bliss and Lomo, 1973) (Atkins et al., 1998) (Orban et al., 1999) (Impey et al., 1999) (Hyman et al., 2006)..., étaient altérés dans la maladie de Parkinson. Ces altérations conduisant à une dérégulation de la transmission corticostriatale (Picconi et al., 2005) (Calabresi et al., 2007) (Surmeier et al., 2007) suggèrent que l'information stockée de façon anormale dans les synapses corticostriatales des neurones de la voie D1 soit liée au priming des dyskinésies (Jenner, 2008). La dénervation dopaminergique causerait la perte du LTD (Picconi et al., 2005) et à plus long terme, celle du LTP (Centonze et al., 1999). Or, seul un traitement de L-DOPA restaure une certaine forme de plasticité synaptique qui n'est plus la même que sur un striatum intacte (des agonistes D1 ou D2 ne peuvent le faire (Picconi et al., 2005)) chez des rats 6-OHDA lésés (Picconi et al., 2003). De plus, des antagonistes NMDA (les récepteurs NMDAs sont des récepteurs glutamatergiques impliqués dans le LTP striatal) diminuent les dyskinésies induites à la L-DOPA (Picconi et al., 2005) (Blanchet et al., 1998) (Blanchet et al., 2003) (Chase et al., 2000) (Del Dotto et al., 2001) (Verhagen Metman et al., 1998). En outre, au sein du striatum, ce phénomène d'apprentissage et de

mémorisation nécessite l'activation normale de la cascade des MAP kinases ERK1/2 dans les neurones D2 de la voie indirecte (Gerfen et al., 2002), activation qui se voit induite cette fois-ci dans les neurones D1 de la voie directe suite à une dénervation et un traitement de L-DOPA (Gerfen, 2000).

5. 2. 2. Corolaire scientifique concernant les LIDs dans la maladie de Parkinson

Une des hypothèses les plus documentées sur le phénomène de plasticité synaptique altéré dans les LIDs est exposée par le Dr Charles R. Gerfen. Selon certaines de ses expérimentations, il a été démontré que le comportement moteur normal dépend de la régulation de la voie des ERK1/2/MAP kinases qui serait normalement restreinte à la voie indirecte D2 du striatum (Gerfen et al., 2002) où elle participe aux mécanismes d'apprentissage et de mémorisation (Brambilla et al., 1997) (Atkins et al., 1998) (Blum et al., 1999) de façon physiologique. Or, selon lui, les LIDs résulteraient de l'activation aberrante des MAP kinases ERK1/2 dans les neurones striataux de la voie D1 devenus hypersensibles en réponse à l'activation chronique de ces derniers par la L-DOPA. Ainsi, les LIDs seraient le résultat de l'initiation erronée du LTP dans les neurones striataux de la voie D1 (Gerfen et al., 2002) (Gerfen et al., 2008). De ce fait, le blocage de cette réponse aberrante par des inhibiteurs de MEK (kinase directement en amont des ERK1/2) pourrait constituer une nouvelle avenue thérapeutique (Gerfen et al., 2002).

Cependant, le Dr Emanuela Santini, dans son article de 2008, propose une vision des choses légèrement différente. Cette dernière suggère que l'hypersensibilité des récepteurs dopaminergiques D1 soit une compensation de la déplétion en dopamine causée par la dégénération de la SNc *via* une activation accrue de la protéine G α olf suite à l'accrochage de la dopamine sur le récepteur. En effet, l'affinité pour la dopamine et le nombre des récepteurs D1 restant identiques, les LIDs pourraient résulter d'une hyperactivation persistante de la signalisation de l'AMPC dans les neurones de la voie directe (Santini et al., 2008). Une des cascades de signalisation du récepteur D1 au sein du striatum consiste en une augmentation d'AMPC ce qui va activer la PKA pour ensuite phosphoryler DARPP-32 sur la thréonine 34 qui devient ainsi un inhibiteur de PP-1, une

phosphatase qui, en empêchant la déphosphorylation de protéines cibles en aval de la PKA, renforce la réponse véhiculée par le D1 (Santini et al., 2008). Le fait qu'une lésion à la 6-OHDA augmente la phosphorylation de DARPP-32; qu'un traitement de L-DOPA vienne re-diminuer cette augmentation de phosphorylation de DARPP-32 sauf dans le cas d'apparition des dyskinésies et que les souris DARPP-32 knockout présentent une nette diminution des LIDs étaye non seulement l'hypothèse du Dr Santini mais confère à DARPP-32 un rôle permissif dans les LIDs (Santini et al., 2008).

Ces deux hypothèses ne s'excluent aucunement l'une l'autre. En effet, on observe une augmentation de la phosphorylation des effecteurs en aval de DARPP-32 comme la sous unité mGluR1 du récepteur AMPA qui est impliquée dans le LTP NMDA dépendant du striatum incriminé par le Dr Charles R. Gerfen. De plus, cette théorie n'exclue pas non plus un rôle des kinases ERK comme le montre la figure n°7.

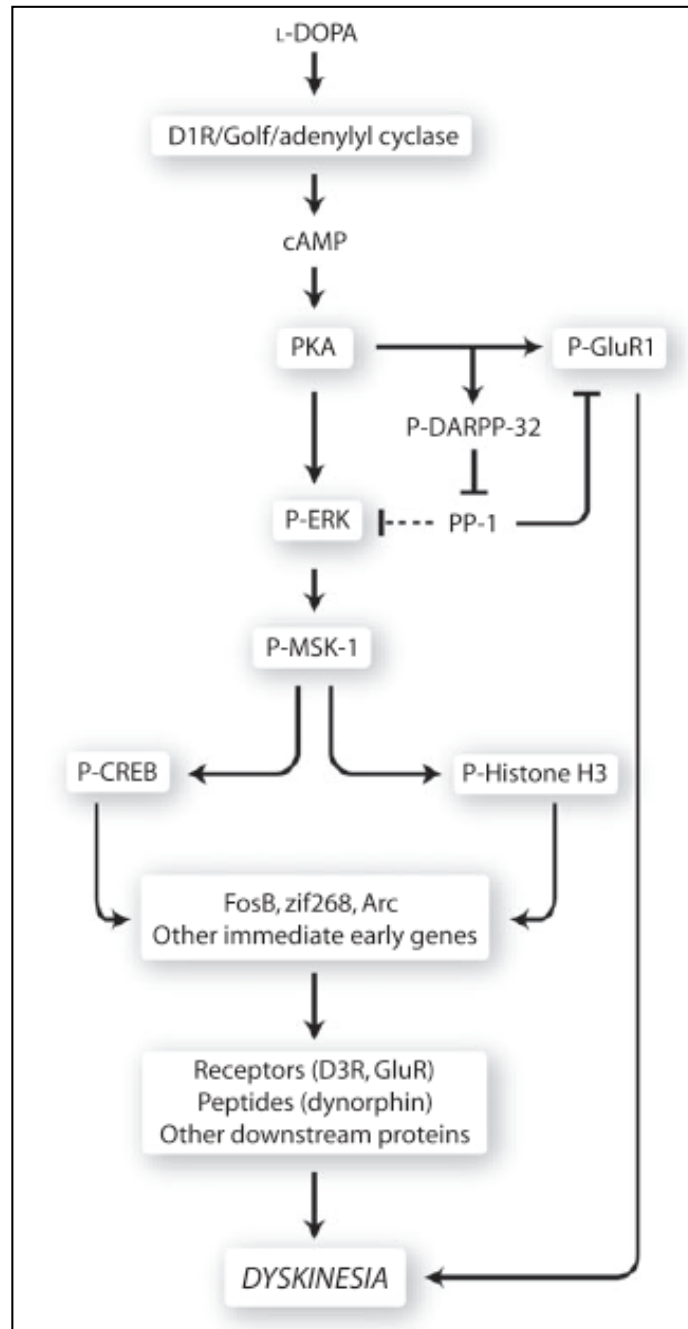


Figure n°7 : Diagramme schématisant les cascades de signalisation affectées par les LIDs dans les neurones épineux moyens striataux nigraux. Dans la maladie de Parkinson, la déplétion en dopamine provoque une augmentation de la réponse des récepteurs D1 qui sont sélectivement exprimés par les neurones épineux moyens de la voie directe striatonigrale. Cet effet est attribuable à l'augmentation du couplage du récepteur D1 à la protéine G α olf qui stimule l'adénylate cyclase. L'administration de L-DOPA conduit à l'activation de la PKA par le D1 qui résulte en une phosphorylation anormale de

la sous-unité GluR1 du récepteur AMPA et de DARPP-32. La phosphorylation de GluR1 par la PKA promeut la transmission glutamatergique (qui se fait de concert avec le développement des dyskinésies) et qui est intensifiée par DARPP-32 *via* l'inhibition de la PP1. De plus, l'augmentation de la signalisation PKA/DARPP-32 conduit à l'activation de ERK, qui catalyse la phosphorylation de MSK-1 dans le noyau. MSK-1 phosphoryle les histones H3 et CREB, conduisant à augmenter la transcription et le réarrangement de la chromatine. Cette cascade est connue pour réguler l'expression de plusieurs gènes d'induction précoces. L'augmentation des niveaux FosB, zif268, l'activité cytosquelettique des protéines associées pourrait, en retour, participer au contrôle des protéines en aval, incluant le récepteur dopaminergique D3, les récepteurs glutamatergiques, et les neuropeptides qui sont pensés être impliqués dans les dyskinésies (Santini et al., 2008).

5. 2. 3. Population neuronale touchée dans les LIDs

La littérature scientifique regorge d'évidences impliquant la population des neurones de la voie directe au sein du striatum. Les singes MPTP présentant des LIDs voient la densité de leurs récepteurs D1 augmenter (NDR : ceci n'est pas le cas chez le rat) ce qui pourrait contribuer à une augmentation de l'expression de messagers secondaires ou à un changement du mode d'internalisation des récepteurs (Aubert et al., 2005) (Guigoni et al., 2005) (Guigoni et al., 2007). Ces changements de l'expression du D1 sont systématiques alors que ce n'est pas le cas pour le D2 (Hurley and Jenner, 2006). Une hypersensibilité des récepteurs D1 est également très bien documentée (Carta et al., 2001) (Gerfen et al., 1990) (Gerfen et al., 1991) (Andersson et al., 1999) (Duty and Brotchie, 1997) (Cenci et al., 1998) (Engber et al., 1992) (Gerfen et al., 1990) (Gerfen et al., 1991) (Henry et al., 1999) (Henry et al., 2003) (Hurley and Jenner, 2006). D'autres études montrent que les LIDs sont accompagnées d'une augmentation de l'expression des récepteurs dopaminergiques D3 sur les neurones de la voie directe (D1) (Bordet et al., 2000) et chez les singes MPTP des agonistes D3 allègent les LIDs (Bezard et al., 2003). De plus, des injections intra-striatales d'ARNm anti-sens D1 ont démontré que le récepteur D1 était aussi impliqué dans le phénomène de sensibilisation des LIDs (Van Kampen and Stoessl, 2000). Une augmentation de la synthèse du récepteur D3 *via* l'activation du récepteur D1 induit de la sensibilisation comportementale et l'induction de la dynorphine (Bordet et al., 1997). En outre, la sensibilisation à la L-DOPA peut être bloquée par les antagonistes D3 et la sensibilisation induite par des agonistes des récepteurs D1 potentialisée par les agonistes D3 (Pilla et al., 1999) (Bordet et al., 2000).

Toujours dans la population neuronale D1, des antagonistes des récepteurs κ -opioïdes (récepteurs de la dynorphine exprimée dans les D1), réduisent la sensibilisation comportementale chez des rongeur dyskinétiques (Stoessl et al., 1993). En outre, nous retrouvons également la notion de plasticité synaptique dans le phénomène de sensibilisation des LIDs puisque l'inhibition de la PKA, et CaMKII supprime les LIDs alors que l'inhibition de la PKC les augmente (Chase et al., 2000) [la PKA et la PKC ainsi que les ERKs sont fortement impliquées dans les mécanismes de LTP/LTD du système dopaminergique des ganglions de la base (English and Sweatt, 1996) (Kornhauser and Greenberg, 1997) (English and Sweatt, 1997) (Silva et al., 1998) (Impey et al., 1999) (Sweatt, 2004) (Braithwaite et al., 2006) (Mazzucchelli et al., 2002)] et que ces changements dans les cascades de signalisation intracellulaires conduisent au phénomène de sensibilisation des récepteurs glutamatergiques qui cependant n'est pas persistante c'est pourquoi il est difficile de déterminer si c'est une cause ou une conséquence des dyskinésies (Jenner, 2008).

5. 3. Altérations moléculaires observées dans la maladie de Parkinson

5. 3. 1. Cascades de signalisation impliquées dans la maladie de Parkinson

Dans le striatum normal, les D1 inhibent les ERK1/2 MAP kinases, sauf dans l'accumbens où les ERK1/2 MAP kinases sont normalement activées dans les D1 (Gerfen, 2003). La L-DOPA produit une activation prononcée de la signalisation ERK1/2 dans le striatum dénervé *via* un mécanisme d'action D1 dépendant (Westin et al., 2007). Cet effet est associé avec le développement de dyskinésies, la phosphorylation de MSK-1, et l'induction de FosB/ Δ FosB (Westin et al., 2007).

Il a été démontré qu'une déplétion en dopamine s'accompagnait d'une potentialisation de l'habileté du récepteur D1 à activer ERK (Kim et al., 2006). Cette potentialisation persiste malgré l'administration de L-DOPA alors que normalement, la L-DOPA sans dénervation n'affecte pas ERK (Santini et al., 2007). L'habileté de la L-DOPA d'activer

ERK est fortement atténuée chez les souris DARPP-32 KO (Santini et al., 2007). Il est à noter que le mécanisme par lequel DARPP-32 activerait ERK est inconnu. Cependant, l'activation de ERK nécessite celle de MEK et aboutit à la phosphorylation de la *phosphorylated mitogen and stress activated kinase-1* (MSK1) dont les cibles sont CREB un facteur de transcription impliqué dans la régulation de plusieurs gènes incluant ceux codant Fos et la dynorphine (Carlezon et al., 2005) et à la phosphorylation des histones H3 acétylées qui sont une étape critique pour le réarrangement de la chromatine et la régulation transcriptionnelle (Santini et al., 2008). Ces résultats ont d'ailleurs été reproduits chez des souris transgéniques utilisant l'expression de la enhanced green fluorescence protein (EGFP) sous le contrôle du promoteur du récepteur dopaminergique D2 ou D1 (Santini et al., 2009). Chez les souris *Drd2*-EGFP lésées à la 6-OHDA, on observe une augmentation de la phosphorylation de ERK, de la MSK-1 et de l'histone H3 dans les neurones de la voie D1. Les effets de la L-DOPA sont prévenus par le blocage des récepteurs D1. Le même tableau est observé chez les souris dyskinétiques après une administration répétée de L-DOPA (Santini et al., 2009). De plus, le Dr Emanuela Santini fait aussi remarquer que l'hyper phosphorylation de ERK intervient à deux niveaux, elle ne corrèle pas seulement avec les dyskinésies mais est aussi impliqué dans le développement de ces conditions puisque chez des souris 6-OHDA lésées, l'administration de SL327, un inhibiteur de MEK réduit fortement l'habileté de la L-DOPA chronique à générer des LIDs (Santini et al., 2008). De façon parallèle, un autre groupe de recherche a démontré que chez le rat, des changements dans la cascade de signalisation des ERK1/2 MAPK sont systématiquement observés dans le développement des mouvements anormaux involontaires (AIMs) (Westin et al., 2007) qui pourraient représenter l'apparition des dyskinésies et non pas l'expression des mouvements involontaires des dyskinésies. De plus, le lovastin qui, en inhibant la 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA réductase, inhibe l'isopentylation Ras dépendante et par voie de conséquence la phosphorylation de ERK1 et ERK2 (Li et al., 2005) réduit la sévérité des AIMs produits par la L-DOPA chez des rats 6-OHDA lésés (Schuster et al., 2008); ici aussi nous retrouvons une corrélation positive entre la sévérité des dyskinésies et les niveaux de phosphorylation de ERK1/2 (Westin et al., 2001). Le point de

convergence de ces deux théories a été testé dans une étude plus récente où il semblerait qu'il existe un lien de causalité entre une hyperactivité de la cascade Ras-ERK et les LIDs (Fasano et al. 2010). En effet, selon l'échelle des mouvements involontaires anormaux chez le rongeur (AIMs) les souris déficientes en *Ras-guanine nucléotide-releasing factor 1* (Ras-GRF1), un activateur exclusivement cérébral de la cascade Ras-ERK, sont significativement plus résistantes au développement des LIDs pendant un traitement chronique de L-DOPA (Fasano et al. 2010) ce que vient confirmer certaines études chez les primates non humains où l'expression d'un dominant négatif Ras-GRF1 induit une forte réversibilité des dyskinésies tout en laissant intacte l'effet thérapeutique de la L-DOPA ce qui premièrement démontre que Ras-GRF1 n'est pas seulement impliqué dans le processus de priming des dyskinésies mais aussi dans l'expression des mouvements des dyskinésies déjà établies et deuxièmement est très pertinent pour le transfert thérapeutique puisque plusieurs drogues ciblant ERK ont été développées pour des thérapies contre le cancer (Fasano et al. 2010).

5. 3. 2. Gènes d'induction précoce induits dans la maladie de Parkinson

Plus de quarante IEG seraient induits par les D1 hyper-sensibilisés dans le striatum (Berke et al., 1998). Des anti-sens intrastriataux de FosB inhibent le développement des dyskinésies et l'induction de l'ARNm de la pro-dynorphine (Cenci, 2002). Dans cette optique, l'augmentation de l'immuno-radioactivité de FosB associée avec les dyskinésies est impliquée dans l'augmentation de l'ARNm codant pour la dynorphine (Andersson et al., 1999). La dynorphine est un neuropeptide dont l'expression est fortement augmentée par un traitement de L-DOPA consécutif à une dénervation (St-Hilaire et al., 2006) dont le rôle dans les dyskinésies est contradictoire (Samadi et al., 2006a) (Santini et al., 2008). Un autre IEG dont l'expression est affectée pendant les dyskinésies est zif268 (Santini et al., 2008).

5. 4. Découvertes au sein du laboratoire sur la maladie de Parkinson

Au sein du laboratoire il a été découvert que, chez le rat, une lésion à la 6-OHDA augmentait Nur77 et l'enképhaline dans les neurones de la voie D2 du côté lésé (augmentation de la colocalisation Nur77/ENK et diminution de la colocalisation Nur77/DYN) sans effet sur le récepteur dopaminergique D3 ni sur la dynorphine (tous deux associés à la sensibilisation) alors qu'un traitement chronique de L-DOPA (7 jours) augmente pareillement Nur77 dans les neurones de la voie D1 et D2 du côté intacte (colocalisation Nur77/ENK = colocalisation Nur77/DYN) et ne provoque pas de ré-augmentation par rapport à l'induction de Nur77 suite à la lésion du côté lésé tout en augmentant l'expression de dynorphine ce qui accentue le plus faible pourcentage de colocalisation Nur77/DYN comparé au pourcentage de colocalisation Nur77/ENK qui reste le même du côté lésé (St-Hilaire et al., 2003). Selon le Dr St-Hilaire, la dénervation cause une régulation différentielle des deux voies de sorties striatales qu'une administration de L-DOPA vient exacerber tout en induisant de la sensibilisation et des LIDs (St-Hilaire et al., 2003). De plus, il a également été démontré à l'aide d'un antagoniste D1 administré en même temps que la L-DOPA que, chez le rat dénervé, l'antagoniste D1 bloquait l'apparition de toutes les modifications moléculaires ainsi que le développement de la sensibilisation et des LIDs (St-Hilaire et al., 2005). Cependant, un projet auquel j'ai participé ayant pour but de tester les effets de la délétion du gène *nur77* sur le développement des LIDs et de la sensibilisation comportementale dans un modèle animal de maladie de Parkinson utilisant pour se faire des souris sauvages et Nur77 knockout a permis de démontrer entre autre, que la régulation de peptides opioïdiques tel que l'enképhaline n'était pas la même chez le rat et chez la souris (St-Hilaire et al., 2006). En effet, chez la souris sauvage, l'augmentation des niveaux d'enképhaline suite à la dénervation est ramenée au niveau basal par la L-DOPA du côté lésé ce qui n'est pas le cas chez le rat. Cependant, l'induction de dynorphine suite à un traitement chronique de L-DOPA reste inchangée de même qu'aucun effet sur le récepteur dopaminergique D3 n'est observé tandis qu'un antagoniste D1 bloque

également les changements moléculaires observés avec la L-DOPA tels que l'augmentation de dynorphine du côté lésé et l'augmentation de Nur77 du côté intacte et la diminution non significative de Nur77 du côté lésé observée chez la souris sauvage mais pas chez le rat (St-Hilaire et al., 2005). En outre, les souris présentent également de la sensibilisation et des LIDs (St-Hilaire et al., 2005). Si l'on en revient à l'implication du gène de Nur77 dans ce modèle animal de maladie de Parkinson, il a également été démontré qu'une délétion du gène de Nur77 n'avait pas d'influence sur les modulations des niveaux de dynorphine et des récepteurs D3 tout en laissant un phénomène de sensibilisation intacte même si le seuil rotatoire des LIDs commence significativement plus haut chez les souris Nur77^{-/-}. De plus, 7 jours de L-DOPA ne ramènent pas les niveaux d'enképhaline au niveau basal chez les souris Nur77 déficientes contrairement aux souris sauvages et les souris Nur77 déficientes possèdent d'emblée une induction striatale d'enképhaline 6-OHDA dépendante du côté lésé moindre que chez les souris sauvages (St-Hilaire et al., 2005). Les conclusions du Dr St-Hilaire à ce sujet sont que la délétion de Nur77 semble toucher la voie D2 et non la voie D1 (cf. une induction de base diminuée d'enképhaline chez les souris Nur77 déficientes suite à la dénervation) et que d'un point de vue comportemental, Nur77 servirait à installer le seuil des rotations induites par la L-DOPA dans les D2 plutôt que de contrôler le développement de la sensibilisation plus spécifique des D1 (article du Dr St-Hilaire Chapitre 2 : résultats du rôle de Nur77 dans la maladie de Parkinson). L'augmentation de la réponse rotatoire contralatérale après la première administration de L-DOPA chez les souris Nur77^{-/-} va en faveur d'une augmentation de la sensibilité de ces souris à la dénervation dopaminergique, augmentation de sensibilité maintenue tout au long du traitement peut être à cause du manque de réponse régulatrice appropriée (moins d'enképhaline) ce qui aurait pour effet d'accentuer les fluctuations motrices.

Cette hypothèse du Dr St-Hilaire est complémentaire à l'idée que dans un striatum dénervé un switch des cascades de régulation des D2 se fasse vers les D1, procurant à la voie D1 une hyper-sensibilité envers la plasticité neuronale responsable de l'apprentissage progressif des mouvements involontaires causés par la L-DOPA (Gerfen, 2000). Ce processus serait sous-tendu par une activation inopportune des cascades de

signalisations MAP kinases notamment les ERKs. C'est pourquoi, il nous a paru pertinent de tester dans une étude préliminaire si l'induction *via* des agonistes dopaminergiques D1/D2 ou des antagonistes D2 des membres de la famille des NURS pouvait être sous le contrôle des kinases ERK et PKC, principales kinases intéressées pour l'hypothèse d'une éventuelle implication des NURS dans l'intervention des processus du LTP/LTD dans les LIDs (Bourhis et al., 2008). De plus, le fait qu'il existe des inhibiteurs ERK et PKC capables de passer la barrière hémato-encéphalique nous permet une étude *in vivo* (Bourhis et al., 2008).

6. Les kinases ERKs et PKCs

6. 1. Les Extracellular signal-Regulated Kinases (ERK)

6. 1. 1. Définition des Extracellular signal-Regulated Kinases ERKs

Les kinases ERKs font parties de la famille des *Mitogen Activated Protein Kinases* (MAPK) qui sont des cascades de signalisation conservées au cours de l'évolution (Treisman, 1996) (Ferrell, 1996). Ce sont des kinases dites proline dirigées qui phosphorylent des résidus de sérine, thréonine ou tyrosine entourés des séquences consensus Ser/Thr-Pro (Treisman, 1996). Elles sont organisées en trois modules; les MAP kinases kinases kinases (MAPKKK) ou MEK kinases (MEKK) qui activent les MAP kinases kinases (MAPKK) ou MKKs ou MEKs *via* la phosphorylation de deux résidus de sérine et ces MAPKKs activent les MAP kinases (MAPK) ou ERKs *via* la phosphorylation d'un résidus de thréonine ou de tyrosine (MEK2 constitue une exception en ce sens qu'elle est capable de tyrosine ET sérine phosphoryler ERK1 qui voit ainsi son activité kinasique augmenter de plus de 100 fois (Zheng and Guan, 1993)) (Treisman, 1996) (Ferrell, 1996) (Chang and Karin, 2001). La cascade des MAPKs peut être activée par les kinases STE20, ou les petites protéines G qui, en retour, activent des effecteurs spécifiques, les MAPK activated protein kinases (MAPKAPKs ou MKs) et sont inactivées par des MAPK phosphatases (Chang and Karin, 2001) (Aouadi et al., 2006). Les MAPKs ont également la capacité de réguler l'expression des ligands et des

inhibiteurs des récepteurs de surfaces membranaires qui alimentent leurs propres cascades ce qui permet de générer des boucles de régulation autocrines positives et négatives (Chang and Karin, 2001).

6. 1. 2. Les Extracellular signal-Regulated Kinases 1 et 2 (ERK1 et ERK2)

La famille des ERKs comprend ERK1 à ERK8. Cependant, le rôle de ERK3 à ERK8 dans le cerveau n'a pas encore été caractérisé (Nishimoto and Nishida, 2006) (Girault et al., 2007).

6. 1. 2. 1. Localisation anatomique des kinases ERK1 et ERK2

ERK1 et ERK2, encore appelées p44 et p42 en raison de leur masse moléculaire, possèdent 83% d'homologie (Boulton and Cobb, 1991) (Boulton et al., 1991) et sont exprimés de façon plus ou moins forte dans tous les tissus (pour revue (Chen et al., 2001)) (Aouadi et al., 2006) y compris le cerveau (Ortiz et al., 1995) où elles sont particulièrement abondantes dans le système dopaminergique mésocorticolimbique (Zhai et al., 2008).

6. 1. 2. 2. Cascade de signalisation générale des kinases ERK1 et ERK2

La cascade des ERKs a été élucidée pour la première fois lors de l'étude des neurotrophines et de leur récepteurs tyrosine kinase (Trks) mais elles peuvent aussi être régulées par l'activation des GPCRs et l'ouverture des canaux calciques (rapporté dans (Zhai et al., 2008)). La cascade communément admise pour les ERKs est celle des MAPKKKs : Raf-1, les MAPKKs : MEK1/MEK2 (Zheng and Guan, 1993) et les MAPKs : ERK1/ERK2 (Ferrell, 1996). MEK1 et MEK2 constituent les MAPKKs spécifiques pour l'activation de ERK1 et ERK2 (Chang and Karin, 2001). Cependant, chaque MAPKK peut être activée par plus d'une MAPKKK et une MAPKKK peut répondre à différents stimuli (Chang and Karin, 2001). Pour activer ERK1 et ERK2, les stimuli doivent augmenter la forme active de la protéine Ras qui est GTP-Ras; ensuite, GTP-Ras va activer Raf qui phosphoryle et active les MEKs (Thomas and Huganir, 2004). Il s'agit principalement de Raf-1 et B-Raf pour ce qui est du cerveau (Kolch, 2005). Dans les neurones, ERK phosphorylé est désactivé par des protéines

phosphatases comme PP2A (Mansuy and Shenolikar, 2006) (NDR : il existe aussi PP2B et PP1).

6. 1. 2. 2. 1. *Spécificité fonctionnelle des kinases ERK1 et ERK2*

ERK1 et ERK2 sont activées lorsque doublement phosphorylées sur la thréonine 183 et la tyrosine 185 du motif fortement conservé Thr-Glu-Tyr (TEY) (pour revue (Frodin and Gammeltoft, 1999)) (Aouadi et al., 2006). Une fois activées, ERK1 et ERK2 sont des sérines thréonines kinases dont les cibles se répartissent dans tous les compartiments cellulaires et incluent des facteurs de transcription, les protéines de membrane; des substrats nucléaires, des protéines du cytosquelette, et plusieurs MKs ou MAPKAPKs (Chen et al., 2001) telles que les kinases des sous-familles RSKs (un groupe de kinases avec des cibles nucléaires et cytoplasmiques), MSKs (des kinases activées par la mitose et le stress mais restreintes au noyau), et MNKs (Frodin and Gammeltoft, 1999) (Thomas and Huganir, 2004) (Aouadi et al., 2006). Dans les neurones, les formes mono-phosphorylées de ERK1 et ERK2 sont principalement localisés dans le soma et les dendrites (Ortiz et al., 1995) (Fiore et al., 1993) tandis que les formes bi-phosphorylées transloquent au noyau (Chen et al., 1992) pour activer la transcription génique (Sgambato et al., 1998) (Davis et al., 2000) (Valjent et al., 2000) où elles ciblent des facteurs de transcription déjà fixés à l'ADN; en majorité des dimères (Chang and Karin, 2001). Cependant, au niveau cytoplasmiques les ERKs peuvent aussi réguler l'expression génique *via* des mécanismes post-transcriptionnels comme la stabilisation de l'ARNm et *via* certains mécanismes de contrôle de la traduction (Chang and Karin, 2001).

6. 1. 2. 3. **Les souris ERK1 et ERK2 knockout**

6. 1. 2. 3. 1. *Les souris ERK1 knockout*

C'est en 1999 que furent générées les premières souris ERK1 ou plus précisément p44 knockout (Pages et al., 1999). Les souris p44^{-/-} sont viables, fertiles et de taille normale, indiquant que p44 est non indispensable et que p42 compense pour sa perte (Pages et al., 1999). Cependant, nous retrouvons chez les souris p44 knockout un défaut de maturation

des thymocytes qui est réduite de moitié au delà du stade CD4⁺ et CD8⁺ accompagnée d'une réduction similaire dans la sous population de thymocytes exprimant de forts niveaux de récepteurs CD3^{high} (Pages et al., 1999). De plus, toujours chez les souris p44^{-/-}, la prolifération des thymocytes en réponse à l'activation du récepteur TCR est fortement réduite malgré une activation plus soutenue de la p42 (ERK2) ce qui confère à ERK1 un rôle thymocytaire plus spécifique (Pages et al., 1999). Cependant, il est nécessaire de préciser que certaines études effectuées chez des souris consanguines 126Sv et C57BL/6 montrent un développement thymocytaire et une prolifération induite *via* des signaux mitogènes normaux (Nekrasova et al., 2005). De plus, en ce qui concerne le système nerveux central, une forte augmentation de la mémoire striatale à long terme de même qu'une facilitation du L-LTP dans le noyau accumbens ont été observés chez des souris ERK1 déficientes où une augmentation de l'activation de ERK2 *via* des stimuli glutamatergiques est observée (Mazzucchelli et al., 2002). De ce fait, ERK1 au sein du striatum aurait plus un rôle modulateur de la signalisation de ERK2 en entrant en compétition avec ce dernier sur le site de phosphorylation de MEK1 (Mazzucchelli et al., 2002).

6. 1. 2. 3. 2. *Les souris ERK2 knockout*

En ce qui a trait au gène de l'isoforme ERK2, sa délétion dans un background BALB/C est létale au stade embryonnaire E6.5 à cause d'un défaut de différenciation du mésoderme (Yao et al., 2003). L'interruption du locus *erk2* dans un background C57BL/6 conduit à une létalité embryonnaire tôt dans le développement après le stade d'implantation et certaines études montrent que les embryons ERK2^{-/-} ne sont pas capables de former les cônes ectoplacentaires ni l'ectoderme extra-embryonnaire donnant naissance aux dérivés trophoblastiques du fœtus (Saba-El-Leil et al., 2003). De plus, la fonction de ERK2 dans ces effets est spécifique puisque les embryons *erk2*^{-/-} peuvent être sauvés par l'expression transgénique de ERK2 même si ils demeurent plus petits que leurs frères sauvages notamment à cause de la malformation placentaire (Hatano et al., 2003).

6. 1. 3. Activation des kinases ERK1 et ERK2 au sein des neurones du système dopaminergique

6. 1. 3. 1. Les kinases ERK1 et ERK2 dans les neurones de la voie D1

Il est relativement bien établi qu'ERK2 est activé par les D1 de façon NMDA dépendante *via* le point de convergence de DARPP-32 qui inhibe PP1 (Valjent et al., 2006a) et augmente la phosphorylation globale des neurones. La phosphorylation de ERK conduit à la phosphorylation des facteurs de transcription Elk-1 et CREB dans le noyau accumbens (Nestler, 2001b). De plus, l'activation de la voie des ERKs est le principal facteur responsable de l'induction des gènes de la famille des Fos (incluant c-fos, fosB, et fra2), de Zif268, et Egr3 en réponse à la cocaïne, la D-amphétamine et le MDMA (Valjent et al., 2000) (Choe et al., 2002) (Zhang et al., 2004) (Salzmann et al., 2003).

Ces données ont été confirmées avec des souris transgéniques EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) où il a pu être démontré que de la cocaïne et l'amphétamine en aigue augmentaient la phosphorylation de ERK et de ses cibles en aval (MSK1 et H3) dans les neurones D1 du striatum dorsal et du noyau accumbens avec une induction des IEG c-fos et zif268 mais aussi en moindre mesure dans les D2 (Bertran-Gonzalez et al., 2008). En chronique, cette réponse signalétique diminue à l'exception de la phosphorylation de ERK1/2 qui est augmentée dans les D1 du striatum dorsal (Bertran-Gonzalez et al., 2008). Ainsi, dans les D1, la voie des ERK semble être sensibilisée après une exposition répétée de cocaïne ou d'amphétamine (Valjent et al., 2000) (Mattson et al., 2005) (Shi and McGinty, 2007).

Toujours en ce qui concerne les neurones striataux, la signalisation *via* les récepteurs glutamatergiques métabotropiques du groupe I, les mGluR1/5 et la signalisation des récepteurs de type D1 (les D1 et D5) sont capables de converger vers la phosphorylation de ERK2 (Voulalas et al., 2005). Cette interaction entre mGluR1/5 et DR1/5 requière la PKC et induit ERK selon plusieurs mécanismes possibles (Voulalas et al., 2005) : 1) il se pourrait que la libération de calcium véhiculée par mGluR5 conduise à l'activation de

Rap1 et B-Raf PKA dépendante (Grewal et al., 2000) (Morozov et al., 2003) ce qui conduirait à la formation du complexe Rap1/B-Raf qui déclencherait la cascade de signalisation MEK-ERK (Vossler et al., 1997) (Schmitt and Stork, 2000); 2) les récepteurs mGluR5 provoquent la libération de calcium *via* les récepteurs à l'IP₃, de ce fait, les interactions DR1/5 et mGluR5 pourraient faciliter les fonctions des récepteurs IP₃ *via* l'activation de la PKA (Voulalas et al., 2005) et 3) la cascade de signalisation activée par les mGluR5 inclue la PLC β qui elle même augmente le DAG et l'IP₃ ce qui permettrait à des cascades IP₃ ou DAG dépendantes de participer à l'activation indirecte des ERKs (Voulalas et al., 2005). De plus, l'activation des récepteurs DR1/5 inhibe la PP-1 *via* DARPP-32 et la PP-2A ce qui permettrait une augmentation de la phosphorylation de ERK2 *via* les mGluR5 (Braconi Quintaje et al., 1996) (Keyse, 2000) (Voulalas et al., 2005).

6. 1. 3. 2. Les kinases ERK1 et ERK2 dans les neurones de la voie D2

L'haldol en aigue active la phosphorylation de ERK, MSK1, H3 et induit c-fos et zif268 dans les neurones D2 (Bertran-Gonzalez et al., 2008). Bien que le mécanisme par lequel les antagonistes D2 activent ERK ne soit pas connu, l'haldol, l'étilclopride, le raclopride, activent ERK dans les neurones striataux D2 et dans les terminaisons dopaminergiques ce qui suggère que la dopamine possède un effet inhibiteur sur la signalisation D2 (Bertran-Gonzalez et al., 2008). De plus, la phosphorylation de ERK2 serait dépendante de la PKC *via* les D2 alors qu'elle ne l'est pas pour les agonistes D1 (Yan et al., 1999) même si l'implication de la PKC dans la signalisation par les DR1/5 a déjà été décrite (Simpson and Morris, 1995) (Gorelova and Yang, 2000) (Voulalas et al., 2005) (NDR : oui, je sais, il y a contradiction).

Il existe aussi des différences entre les antipsychotiques typiques et atypiques. Dans le cortex, seulement la clozapine mais pas l'halopéridol stimule pERK1 et pERK2 avec une exposition chronique. Cette augmentation de l'activité de ERK, ne se ferait pas *via* les cascades de signalisations D2-Gi/o-PKA ou sérotonine 5HT (2A)-Gq-phospholipase-C-linked signaling pathway mais par celle de du récepteur de l'épidermal growth factor (EGF) (Pereira et al., 2009). De plus, puisque la signalisation du récepteur de l'EGF n'a

pas été précédemment liée à l'action des antipsychotiques, leurs résultats pourraient impliquer que le système de l'EGF soit pour le traitement des schizophrénies résistantes répondant à la clozapine (Pereira et al., 2009).

6. 1. 3. 3. Les cibles moléculaires des kinases ERKs au sein des neurones du striatum

Dans le striatum, il a été établi que ERK exerçait *via* RSK2 un contrôle indirecte sur la phosphorylation de CREB (Xing et al., 1996) SRF (Rivera et al., 1993) c-Fos et Nur77 (Fisher and Blenis, 1996) (Valjent et al., 2001). Une fois activée, la transcription génique CREB dépendante joue un rôle important dans le système nerveux central en terme de survie neuronale, de consolidation de la mémoire, d'addiction, de cycle circadien et de raffinement synaptique. Certaines cibles de CREB sont C/EBP β , Erg1 et Nurr1 d'autres gènes comme Nor-1, Fos et Jun qui possèdent des consensus CRE (Impey et al., 2004). Un autre facteur de transcription striatal cible des ERK serait Elk-1 (Zhai et al., 2008), toujours *via* RSK2 par un mécanisme non identifié (Bruning et al., 2000) (Valjent et al., 2001). En contrôlant l'expression des gènes ayant un consensus SRE dans leur promoteur, tels que *c-fos*, *zif268*, *nur77* ou *junB*, Elk-1 est un fort candidat pour l'adaptation neuronale à long terme induite par ERK (Valjent et al., 2001). Les ERKs sont également capables de cibler directement la CREB-binding protéine (CBP), un cofacteur transactivateur jouant un rôle dans le contrôle transcriptionnel de l'expression des gènes (Goldman et al., 1997) (Janknecht and Hunter, 1996) (Valjent et al., 2001) et la plupart des MAPKs phosphorylent Ets qui est aussi impliqué dans l'induction des fos qui en hétérodimère avec Jun forme le complexe AP-1 (Chang and Karin, 2001). Dans le striatum, une autre des cibles des ERKs est MSK1 (Zhai et al., 2008) qui joue un rôle critique dans l'activation de CREB et de l'histone H3 (Brami-Cherrier et al., 2005) et de Cdk5 *via* *zif268* par Elk-1 (Girault et al., 2007). MSK2 constitue également une cible des ERKs et l'élément de réponse des MSKs a été trouvé sur le site AP-1 like du promoteur de *nur77* probablement en collaboration avec CREB. En outre, les MSKs sont également requises pour la transcription de Nurr-1 et de Nor-1 transcrits de façon CREB ou ATF1 (*activation transcription factor 1*) dépendante (Darragh et al., 2005).

6. 1. 4. Dichotomie signalétique entre le striatum dorsal et le striatum ventral sur l'activation des kinases ERKs

La signalisation des ERKs sous amphétamine ou cocaïne semble différente dans le striatum dorsal et dans le striatum ventral (Dupre, 2008). Chez les souris D1 ou DARPP-32 knockout, l'amphétamine et la cocaïne activent ERK1/2 de façon réduite dans le Nac (66% et 61% respectivement) ce qui n'est pas le cas dans le striatum dorsal mettant en doute la nécessité de DARPP-32 dans le striatum dorsal pour l'activation des ERKs *via* les psychostimulants (Dupre, 2008). Ce pendant, les agonistes D1 et la L-DOPA n'ont pas le même mode d'action que la cocaïne ou l'amphétamine puisque chez les souris DARPP-32 knockout il n'est pas observé cette diminution de 66-61% de l'activation de ERK1/2 dans le striatum ventral (le Nac) sous agonistes D1 ou L-DOPA (Dupre, 2008). Ainsi, ces différences dorsales et ventrales des mécanismes d'action entre la cocaïne, l'amphétamine, les agonistes D1 et la L-DOPA au sein du striatum, pourraient expliquer certaines divergences de résultats, laissant la place à d'autres investigations sur le rôle de DARPP-32 dans les D1 et D2 du striatum dorsal et ventral sous psychostimulants ou dans les modèles animaux de maladie de Parkinson (Dupre, 2008). Investigations qui permettraient de résoudre un débat scientifique encore d'actualité sur le rôle des ERKs ou de DARPP-32 au sein des neurones striataux.

6. 1. 4. 1. Qui des ERKs ou de DARPP-32 agit comme un intégrateur signalétique au sein de la population neuronale striatal?

Dans les neurones striataux, l'activation des synapses glutamatergiques corticostriatales active ERK1/2 (Sgambato et al., 1998) *via* les récepteurs NMDA couplés à la signalisation Ca²⁺/calmoduline qui active les MEK (Gerfen et al., 2008). Sous psychostimulants, DARPP-32 est requis pour l'activation de ERK dans le striatum ventral mais pas dorsal (Valjent et al., 2005) (Gerfen et al., 2008) alors que sous agonistes D1 et L-DOPA, DARPP-32 ne serait pas nécessaire à la phosphorylation de ERK dans le striatum dorsal ni le striatum ventral. Or le problème est que les chercheurs se fient, selon leurs protocoles, à l'induction des IEG pour supputer une activation de l'une ou l'autre de ces kinases alors que l'amphétamine, par exemple, induit les IEG

dans tous les neurones D1 du striatum (ventral et dorsal) bien que ses effets sur la phosphorylation de DARPP-32 ne se fasse que dans le striatum ventral (Gerfen et al., 2002) ce qui laisse place à beaucoup de mal entendus. C'est pourquoi tantôt DARPP-32 est proposée comme un intégrateur de coïncidences des signalisations Drd1a et NMDA notamment sous psychostimulants (Gerfen et al., 2008) (figure n°8).

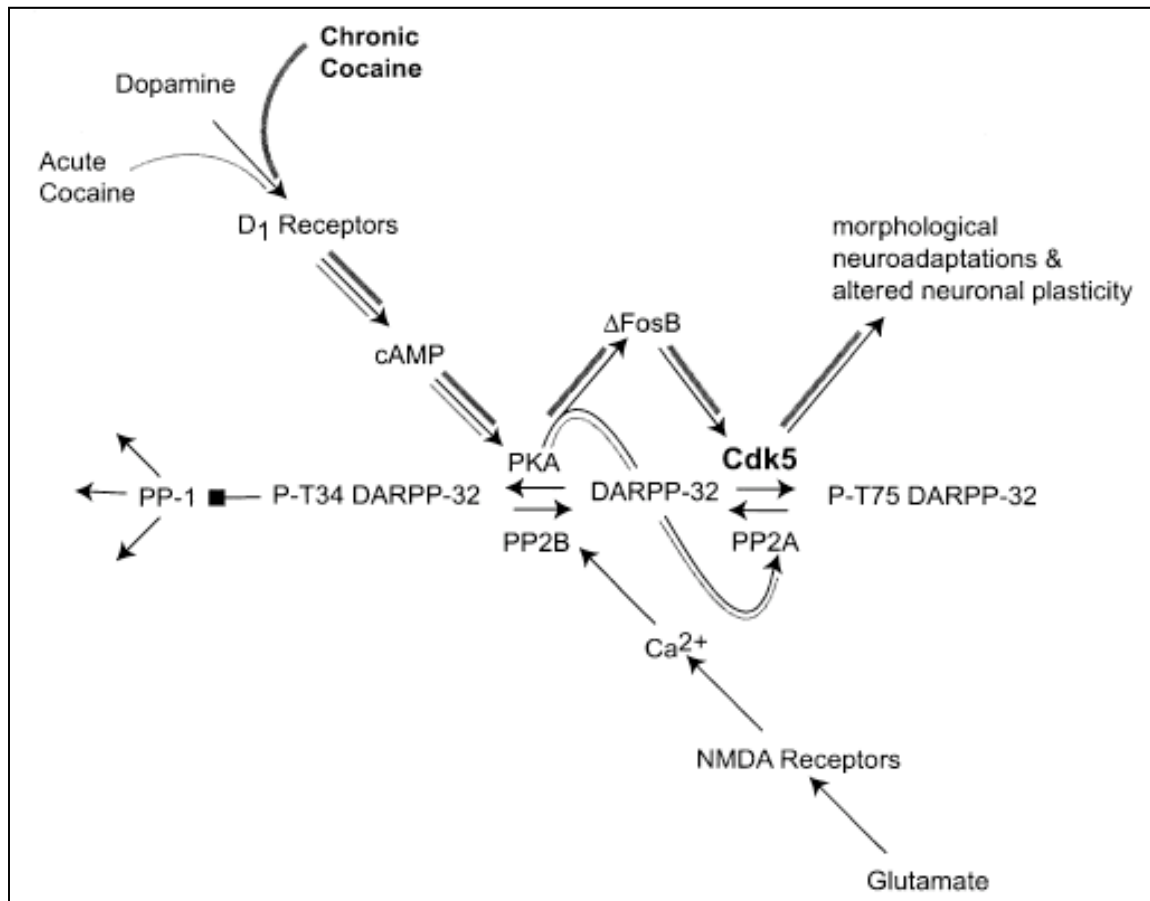


Figure n°8 : Représentation schématique des mécanismes moléculaires ciblés par une drogue psychostimulante qu'est la cocaïne. Les lignes fines représentent la machinerie signalétique associée avec une exposition aiguë d'amphétamine. Les lignes plus larges détaillent les cascades de signalisation cellulaires ciblées par une exposition chronique de cocaïne conduisant à une accumulation de Δ FosB et une induction de l'expression de Cdk5. Les modulations intracellulaires phosphorylations/déphosphorylations de DARPP-32 sont centrales pour la réponse cellulaire à l'activation des récepteurs D1 dans un contexte cellulaire d'utilisation de cocaïne. La contribution des protéines kinases et phosphatases est indiquée. L'activité de la Cdk5 pourrait sous-tendre un certain nombre de neuro-adaptations pour prolonger l'effet des drogues (Benavides and Bibb, 2004).

Tantôt, ERK1/2 sont proposés comme une porte permissive de la plasticité synaptique où convergent des signaux de récompense dopaminergiques (drogues d'abus) et contextuels glutamatergiques (Valjent et al., 2005) (Girault et al., 2007) (figure n°9).

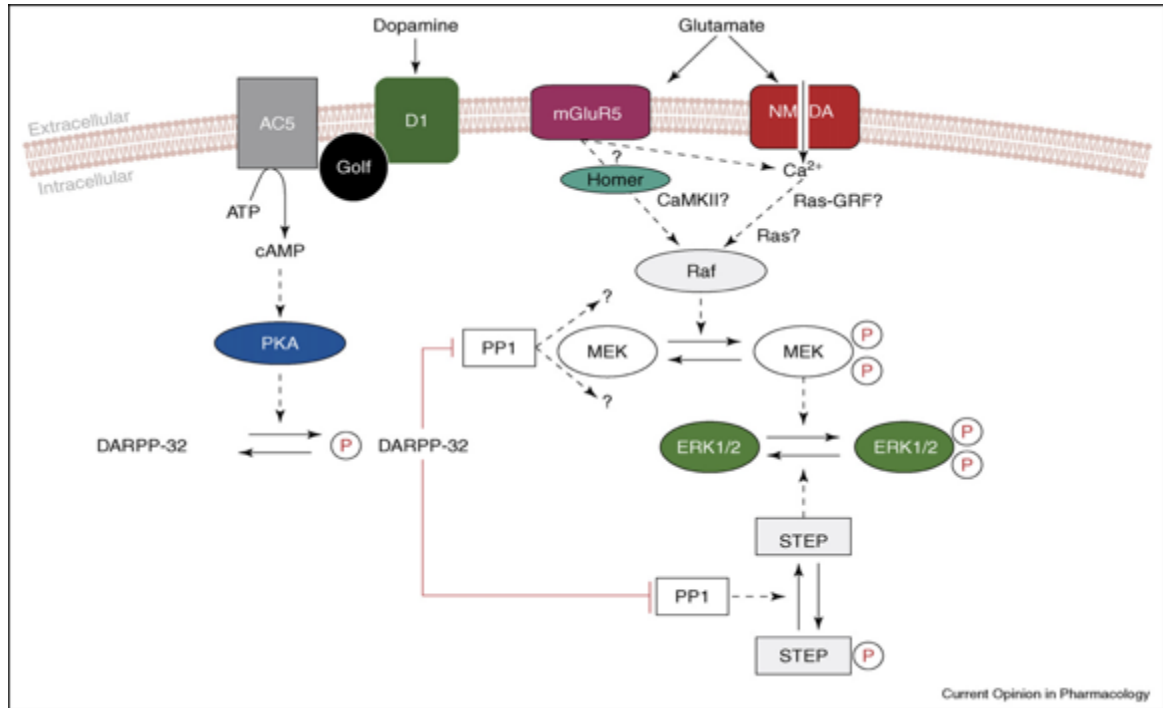


Figure n°9 : Cascades de signalisation régulant l'activation de ERK1/2 dans les neurones striataux. La Ca²⁺/calmoduline dépendante protéine kinase II (CaMKII) semble être requise pour l'activation de ERK1/2 sur des coupes striatales et *in vivo*. Bien que la CaMKII participe à l'activation de Raf-1, sa relation avec la voie des ERKs dans le striatum est inconnue. Un autre lien possible est Ras-GRF, facteur d'échange guanine-nucléotide activé par la fixation de la Ca²⁺/calmoduline et associé à NR2B. La famille des tyrosines kinases Src semble importante pour l'activation de ERK1/2 *via* les récepteurs NMDA dans les neurones striataux en culture, mais leur rôle *in vivo* est inconnu. Dans les neurones striataux en culture, mGluR5 active ERK1/2 *via* des mécanismes Ca²⁺ dépendants et indépendants, ce dernier inclus la protéine chaperonne Homer. Les récepteurs D1 sont principalement couplés à l'adénylate cyclase de type 5 (AC5) *via* les protéines G hétérotrimériques (Golf) contenant les sous-unités α olf, γ 7 et probablement β 1. La protéine kinase AMPc-dépendante (PKA) phosphoryle DARPP-32 sur la Thr34, permettant son activité en tant qu'inhibiteur potentiel de la protéine phosphatase-1 (PP1). L'inhibition de PP1 par DARPP-32 est essentielle pour l'activation de ERK1/2 en réponse aux drogues d'abus dans le striatum, puisque cette activation est sélectivement prévenue dans le striatum de souris DARPP-32 knockout et dans les mutants Thr-34-Ala Knock-in. PP1 n'est pas directement actif sur ERK1/2, mais régule la *striatale enrichie tyrosine phosphatase* (STEP), qui dé-phosphoryle les résidus de tyrosine de la boucle d'activation de ERK1/2.

DARPP-32 est aussi actif en amont de ERK, puisque la phosphorylation de MEK1/2 est perdue chez les mutants DARPP-32 à un ou des niveaux qui restent à identifier (désignés par des flèches avec des points d'interrogation). Des liens additionnels entre les récepteurs D1 et la voie des ERK1/2 sont possibles. Il est à noter que dans toutes les études, ERK2 est plus fortement activé que ERK1 et que ERK1 inhibe la signalisation ERK2. Zif268 (aussi appelé Krox24, NGFI-A) dans l'amygdale est à la fois un facteur de transcription et un IEG. P : phosphate (Girault et al., 2007).

De plus, dans un contexte de maladie de Parkinson, nous savons maintenant que si ERK1/2 est fortement présent dans le striatum ventral, la dénervation des projections dopaminergiques nigrostriatales induit une forte activation de ERK1/2 dans le striatum dorsal suite à l'action d'agonistes D1 (Gerfen et al., 2008). Dans le striatum ventral, selon certaines études, DARPP-32 est requis pour la phosphorylation de ERK1/2 *via* les D1 ce qui n'est toujours pas le cas pour les neurones D1 du striatum dorsal suite à une dénervation dopaminergique indiquant que l'hypersensibilité des récepteurs D1 suite à la dénervation du striatum dorsal ne requiert pas DARPP-32 (Gerfen et al., 2008). Ces résultats contredisent certains résultats du Dr Emanuela Santini qui implique l'activation de ERK1/2 dans les D1 *via* DARPP-32 comme critique dans les LIDs (Santini et al., 2007) ce qui est peut être vrai dans le striatum ventral (bien que le mécanisme d'induction de ERK1/2 dans le striatum ventral lésé est différent de celui qui induit ERK1/2 dans le striatum ventral normal (Gerfen et al., 2008)) mais probablement pas dans le striatum dorsal où des agonistes D1 ou un traitement de L-DOPA ont le même effet chez des souris sauvages ou DARPP-32 knockout dénervées avec une induction de ERK1/2 à travers tout le striatum du côté lésé de la même façon (dans un striatum normal, des agonistes D1 induisent la phosphorylation de ERK de façon nettement moins marquée) (Gerfen et al., 2008). Le Dr Charles R. Gerfen en conclue que 1- la régulation de ERK1/2 dans les D1 *via* DARPP-32 est restreinte au striatum ventral et au noyau accumbens, 2- l'activation de ERK1/2 dans les D1 du striatum dorsal déficient en dopamine n'inclue pas DARPP-32 ce qui ressemblerait plus à la signalisation du D1 observée dans une faible population des neurones du striatum dorsal intacte indiquant deux mécanismes moléculaires de signalisation *via* les récepteurs D1 au sein du striatum (Gerfen et al., 2008) et il va plus loin en émettant l'hypothèse que, selon lui, l'absence de contrôle DARPP-32 et NMDA sur l'activation de ERK1/2 dans le striatum déficient

indiquerait une nouvelle forme de plasticité synaptique pathologique (Gerfen et al., 2008). Or, d'autres données pourraient apporter une certaine lumière sur cette hypothèse en démontrant qu'après un traitement chronique de L-DOPA, l'activation de ERK diminue dans les neurones épineux et augmente dans les interneurons cholinergiques (Ding et al. 2011). Les auteurs ajoutent qu'il se pourrait que les changements observés dans les interneurons cholinergiques soient compensatoires aux altérations des neurones épineux moyens ou à l'excitation corticale durant les LIDs mais qu'ils finissent par jouer un rôle central une fois les LIDs établis (Ding et al. 2011). De ce fait, l'implication des ERKs est évidente au sein des phénomènes que sont, les LIDs, l'éthiopathologie de la maladie de Parkinson, les altérations neuronales induites par les drogues d'abus et même les mécanismes d'action des antipsychotiques sans pour autant que son mécanisme d'action n'ait été élucidé; tout comme l'est, l'implication de Nur77 au sein de ces désordres dopaminergiques (vous trouverez dans le schéma n°1, un récapitulatif des cascades de signalisation des MAPKKKs présentes dans les neurones gabaergiques du striatum activées par les différents récepteurs des neurones D1 (en rouge) tout comme les neurones D2 (en bleu) et sollicitées lors de l'administration de L-DOPA, d'amphétamine, de cocaïne, d'antipsychotiques... décrites dans la littérature).

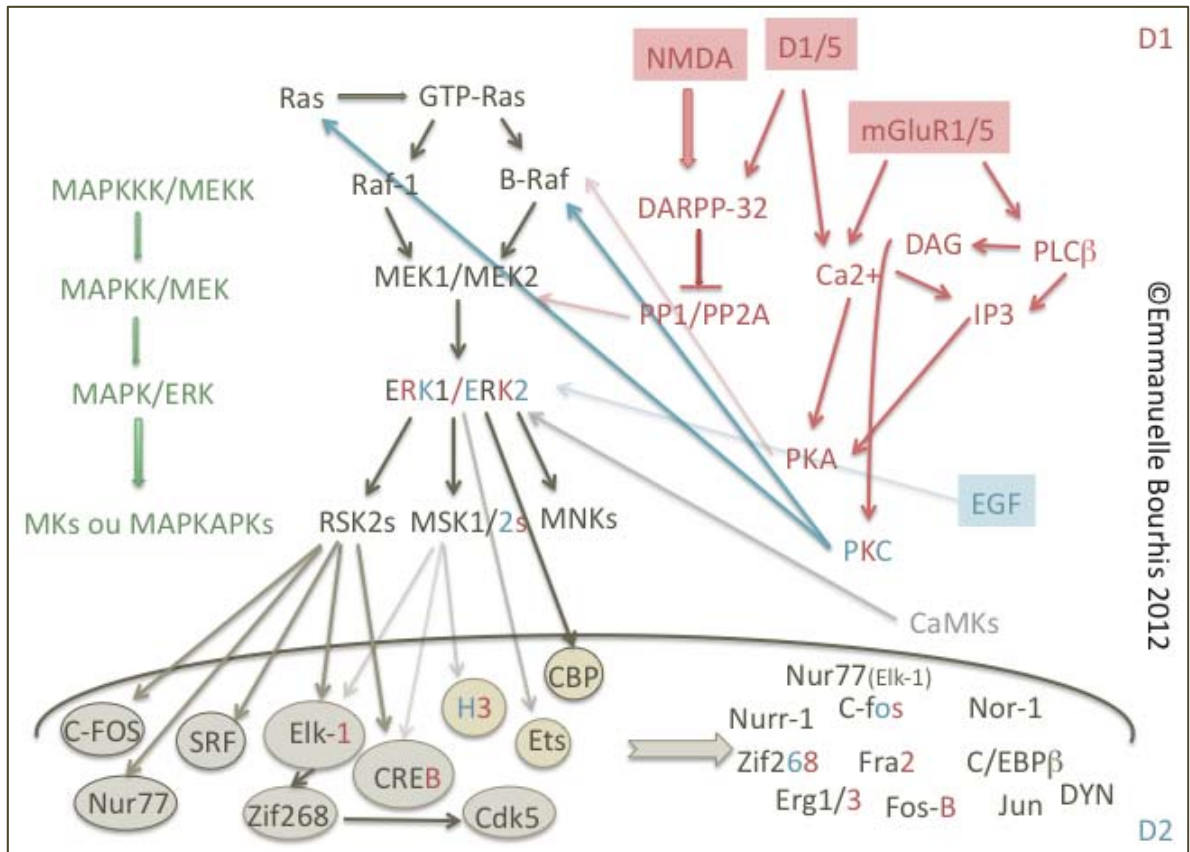


Schéma n°1 : schéma récapitulatif des cascades de signalisations des MAPKKKs présentes dans les neurones gabaergiques du striatum activées par les différents récepteurs dans les neurones D1 (en rouge) comme dans les neurones D2 (en bleu) qui sont sollicitées lors de l'administration de L-DOPA, amphétamine, cocaïne, antipsychotiques... décrites dans la littérature. En vert, séquence de la voie des MAPKKKs, en marron la cascade de signalisation des MAPKKs, MAPKs telle que décrite dans les neurones gabaergiques striataux D1 et D2, en rouge, les différents récepteurs, NMDA, D1/D5 et mGluR1/5 activés par les différentes drogues (dopamine, amphétamine, cocaïne, L-DOPA) capables d'induire la cascade des MAPKKKs dans la population neuronale de la voie directe (D1) en rouge. En bleu, les différents effecteurs décrits dans la littérature, ici l'EGF, capable d'activer les kinases ERK1/2 dans les neurones de la voie D2. Au sein du noyau, les différents facteurs de transcription activés sont c-Fos, Nur77, SRF, Elk-1, CREB, Zif268 qui est capable d'activer Cdk5 ainsi que des cofacteurs H3, Ets ou CBP, ce qui conduit à la transcription des IEG Nur77, Nurr-1, c-fos, Nor-1, zif268, fra2, C/EBPbeta, Erg1/3, Fos-B, Jun et la Dyn © Emmanuelle Bourhis, 2012.

6. 2. Les Protéines Kinases C ou PKCs

6. 2. 1. Découverte et définition des Protéines Kinases C (PKC)

Découvertes en 1977 (Takai et al., 1977), les PKCs sont des sérines thréonines kinases calcium dépendantes (Rose-John et al., 1988) connues dès 1986 pour être ubiquitaires dans tous les tissus et organes (Kuo et al., 1980) (Minakuchi et al., 1981) (Jolles et al., 1981) (Aloyo et al., 1983) (Nishizuka, 1986). Si les PKCs sont généralement codées par des gènes différents sur des chromosomes différents, les isoformes β_I et β_{II} constituent deux produits d'épissage alternatif du même gène (Ono et al., 1986) (Ono et al., 1987).

6. 2. 2. Cascades d'activation des Protéines Kinases C (PKC)

L'activation des PKC se fait suite au déclenchement de la cascade de l'inositol 1, 4, 5 triphosphates (IP_3) et du 1, 2-diacyl glycérol (DAG). L'induction du cycle de l'inositol phosphate (IP) en amont se fait *via* une rapide incorporation de phosphates sur le phosphatidyl inositol (PI) qui devient le 4, 5-biphosphate (PIP_2) hydrolysé par la phospholipase C (PLC) en inositol 1, 4, 5 triphosphate (IP_3) et en DAG (Snyder et al., 1988). Le DAG reste attaché à la membrane et, en réponse à la mobilisation des stocks intracellulaires de calcium endoplasmiques *via* l' IP_3 (Berridge and Irvine, 1984), active la PKC (Hokin and Hokin, 1953) (Michell, 1975) (Durell et al., 1969) (Streb et al., 1983) (Berridge and Irvine, 1984) (Takai et al., 1979) (Kishimoto et al., 1980) (Kawahara et al., 1980) (Sano et al., 1983) (Nishizuka, 1986). De ce fait, la signalisation de la PKC est déclenchée en parallèle de la signalisation de l' IP_3 suite à l'activation calcique du cycle IP (Nishizuka, 1986). Cependant, le DAG peut être généré à partir du PI directement ce qui permet aux cellules ayant peu de PIP_2 d'avoir une signalisation PKC relativement substantielle malgré une faible signalisation d' IP_3 (Snyder et al., 1988). Il est à noter que l'inositol 1, 3, 4, 5-tetrakisphosphate (IP_4) pourrait participer à l'accroissement du calcium intracellulaire mobilisé par l' IP_3 (Batty et al., 1985) et que la PKC peut également s'auto-phosphoryler (Kikkawa et al., 1982).

6. 2. 2. 1. Particularités des Protéines Kinases C (PKC)

Les PKC sont activées par le DAG (qui produit également d'autres métabolites actifs sur les PKCs comme l'acide arachidonique (acides gras cis-insaturés) (Hansson et al., 1986)), les esters de phorbol (le TPA ou PMA = 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate) et les acides rétinoïques trans (RA) (les esters de phorbol, combinés aux acides rétinoïques trans, augmentent de cinq fois l'activité de la PKC; cette synergie démontre qu'il s'agit de deux sites de fixation différents (Bouzinba-Segard et al., 1994)). Si le DAG est présent de façon transitoire à la membrane, le TPA quant à lui est difficilement dégradé. Cette activation (phosphorylation) des PKCs par le DAG ou le TPA accroît l'affinité des PKCs pour le calcium, rendant les PKCs encore plus effectives lorsque les concentrations de calcium augmentent. Les RA quant à eux, favorisent ou induisent l'autophosphorylation de la PKC l'impliquant comme faisant partie des cascades de signalisation déclenchées par les rétinoïdes *via* le récepteur nucléaire RAR β (Bouzinba-Segard et al., 1994).

L'action des PKCs peut être positive ou négative selon leurs protéines cibles ainsi que leurs substrats (Nishizuka, 1986) et si les PKCs et la PKA sont généralement activées par des cascades différentes, à l'intérieur de la cellule, la réponse peut être la même (Ahmad et al., 1984). L'activation de la PKCs est couplée à sa translocation du cytosol à différents sites intracellulaires (Pascale et al., 1998), membranaires et nucléaires (Way et al., 2000) et intervient dans beaucoup de fonctions comme la croissance cellulaire, la différenciation, l'oncogenèse, et l'inflammation (Van der Zee and Douma, 1997). Il est à noter qu'en plus de ces cascades initialement découvertes et communément admises, beaucoup d'autres facteurs cellulaires ont été trouvés capables de moduler l'activité de la PKC dès 1995 (Nishizuka, 1995) (Liu, 1996) (Van der Zee and Douma, 1997).

6. 2. 3. Classification des Protéines Kinases C (PKC)

De façon générale, les PKC, sont constituées d'une seule chaîne de polypeptides de 77-80 kDa et peuvent être coupées en deux fragments d'environ 32 kDa qui représentent le domaine de régulation avec le site de fixation du DAG, et le domaine catalytique de 51 kDa comportant l'activité kinasique (Inoue et al., 1977) (Van der Zee and Douma,

1997). Les différents isoformes de PKC ont des localisations intra cellulaires spécifiques (Tanaka and Saito, 1992) probablement à proximité du substrat ciblé (Van der Zee and Douma, 1997). La littérature scientifique ne s'accorde toujours pas sur le nombre exacte de PKCs qui varie « d'au moins » 12 (Way et al., 2000) à « au moins » 10 (Olive and Newton 2010). Cependant, il est possible de les classer en trois catégories en fonction de leurs différences de structure et de substrats (Way et al., 2000). Les cPKCs pour PKCs conventionnelles (les PKCs α , β I, β II et γ) qui sont dépendantes du calcium et activées par les phosphatidyl sérines (PS) et le DAG, les nPKCs pour nouvelles PKCs (les PKCs δ , ϵ , η et θ) qui sont indépendantes du calcium mais régulées par la PS et le DAG et les aPKCs pour PKCs atypiques (les PKCs ζ , ι/λ (ι et λ sont des homologues murins et humains respectivement)) qui sont indépendantes du calcium et régulées par la PS et l'acide arachidonique mais pas le DAG (Way et al., 2000) (Olive and Newton 2010). Les PKC μ et PKC ν ont un mode d'activation identique à celui des nPKCs mais elles possèdent un domaine fonctionnel supplémentaire et une spécificité de substrats différente des PKCs c'est pourquoi elles sont actuellement classées séparément (Olive and Newton 2010). D'autres kinases sont reliées à la famille des PKC et sont appelées les *PKC-Related-Kinases* (PRK1 et PRK2), elles sont insensibles au calcium et au DAG, mais leur activité augmente lorsque liées à la GTPase activée : RhoA (Olive and Newton 2010). Un type cellulaire peut contenir plusieurs espèces de PKCs dont la distribution et la quantité même peuvent varier selon l'état de prolifération de la cellule (Nishizuka, 1988).

6. 2. 4. Les Protéines Kinases C au sein du système nerveux central

Toutes les PKCs, sauf la PKC θ , sont exprimées dans le cerveau à différents degrés selon le stade de développement et ce autant dans les neurones que dans la glie (Olive and Newton 2010). La PKC γ est spécifique du cerveau et de la moelle épinière (Kikkawa et al., 1989). La PKC ϵ et la PKC δ sont prépondérantes dans le tissu cérébral et en plus faible quantité dans d'autres organes (Koide et al., 1992) (Ogita et al., 1992). De plus, les PKCs, bien que présentes dans beaucoup de régions du cerveau, ont une très bonne représentativité dans les ganglions de la base (Worley et al., 1986b). En général,

l'activation de la PKC dans les cellules nerveuses est associée au contrôle de la fonction des canaux ioniques, à la désensibilisation des récepteurs et à l'augmentation de la libération des neurotransmetteurs, ce rôle important de la PKC dans le contrôle de l'efficacité synaptique la place en première ligne dans les processus d'apprentissage et de mémorisation (Le Merrer and Nogues, 2000) (Battaini, 2001).

6. 2. 4. 1. Cascades de signalisation des PKCs au sein du système dopaminergique

La cascade de signalisation de la PKC est très présente dans le striatum, le noyau accumbens et la zone réticulaire de la substance noire (Worley et al., 1986a). Dans le striatum de rats, l'activation de la PKC *via* des antagonistes D2 ne serait pas calcium dépendante alors que *via* des agonistes D1 oui (Giambalvo and Wagner, 1994). De plus, un agoniste D2 inhibe l'activité de la PKC (Giambalvo, 2003). Dans le striatum, la co-activation des récepteurs mGluR1/5 et D1/D5 augmente la phosphorylation de ERK2 de manière PKC dépendante (Voulalas et al., 2005) (figure n°10). Dans le cortex préfrontal, les récepteurs dopaminergiques D1/D5 modulent la plasticité neuronale à court terme et à long terme en induisant, dans les neurones post-synaptiques, des influx calciques des canaux calciques calcium dépendants autres que le L, ce qui active la PLC, la CaMKII calcium dépendante, et la PKC pour véhiculer la modulation voltage dépendante des canaux ioniques. Cette modulation de la PKC *via* les récepteurs D1/D5 coexiste avec la modulation des courants de K⁺ et de Ca²⁺ *via* la PKA précédemment impliquée dans la régulation dynamique de l'excitabilité générale des neurones du cortex préfrontal (Chen et al., 2008). Il a également été décrit, dans la VTA, une insertion synaptique NMDAR PLC/PKC dépendante (Borgland et al., 2006) ce qui rejoint aussi la mécanistique du LTP/LTD NMDAR dépendant. Il existe également du LTP mGluRs dépendant qui est largement répandu dans le néocortex, l'hippocampe, le striatum et le noyau accumbens. Les formes de LTP mGluRs dépendant sont diverses, incluant l'activation des récepteurs mGluR1 ou mGluR5 et peuvent en partie être véhiculées par la transmission AMPAR ou NMDAR de même qu'impliquer (en pré- comme en post-synaptique) les récepteurs dopaminergiques et adénosine avec notamment l'intervention de la PKC (Anwyl, 2009).

Remarque : De puis quelques lignes, nous évoquons les phénomènes de LTP/LTD dans le striatum, puis dans l'accumbens. D'abor associé aux mécanismes d'apprentissages normaux puis altérés dans les LIDs avec une participation active des kinases ERKs et PKC. Le LTP possède plusieurs phases (Nguyen et al., 1994). Une phase précoce avec des modifications covalentes de protéines prés-existantes renforçant les connections déjà établies, une phase tardive qui nécessite des stimulations électriques répétées, activant l'AMPc, la PKA, les MAPK kinases ERKs puis CREB conduisant, via la synthèse de nouvelles protéines, à la genèse de nouvelles connections synaptiques (Kandel, 2001) (Kandel and Pittenger, 1999)). Beaucoup d'évidences scientifiques associent ces mécanismes de LTP/LTD aux phénomènes d'apprentissage et de mémorisation (Bliss and Gardner-Medwin, 1973) (Bliss and Lomo, 1973) (Atkins et al., 1998) (Orban et al., 1999) (Impey et al., 1999) (Hyman et al., 2006), phénomènes que nous allons retrouvés intimement liés aux mécanismes d'action de l'amphétamine (cf. annexe 1 pour une description plus détaillée des mécanismes de LTP/LTD associés à la mémoire et l'apprentissage dans les structures dopaminergiques des ganglions de la base).

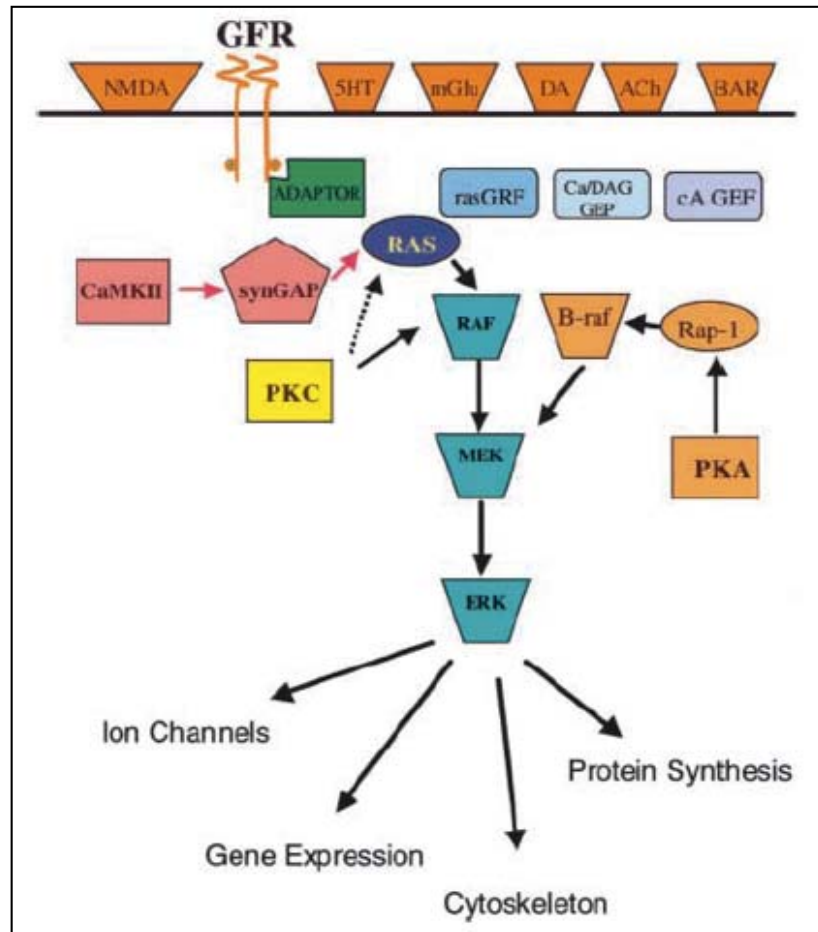


Figure n°10 : Signalisation des extracellular signal-regulated kinase (ERK) dans les neurones. GFR=growth factor receptor; 5HT=sérotonine receptor; mGlu=métabotropiques glutamate receptor; DA= dopamine receptor; ACh=acétylcholine receptor; BAR= β -adrénergique receptor; PKA=cAMP-dépendent protéine kinase; PKC= Ca^{++} /phospholipide-dépendent protéine kinase; CaMKII= Ca^{++} /calmoduline-dépendent protéine kinase II (Selcher et al., 2002).

6. 2. 4. 2. Les Protéines Kinases C dans la maladie de Parkinson

La PKC intervient dans la maladie de Parkinson au niveau de la régulation des récepteurs AMPA striataux sensibilisés par la L-DOPA ce qui créerait l'apparition de la réponse courte produite par une administration chronique de L-DOPA (Oh et al., 2003). En effet, la signalisation véhiculée par la PKC incluant la phosphorylation des récepteurs AMPA pourrait promouvoir l'apparition initiale mais pas nécessairement l'expression finale des changements dans la réponse motrice induite par un traitement de L-DOPA dans un modèle animal des complications motrices humaines (Oh et al., 2003). De plus,

une injection aigüe de L-DOPA restaure la diminution de l'expression de la PKC induite par une lésion à la 6-OHDA, sous une administration chronique de L-DOPA, la diminution de phosphorylation de la sous-unité NR1 des récepteurs NMDA (NDR : PKC dépendante) n'est que partiellement rehaussée ce qui correspond avec l'observation qu'en chronique, la L-DOPA ne restaure pas la diminution des taux de PKC (Napolitano et al., 2006).

6. 2. 4. 3. Action moléculaire de la Protéine Kinase C dans les mécanismes d'action de l'amphétamine

L'amphétamine active la PKC par l'activation calcium dépendante de la PLC, et l'activation de la phospholipase A2 (Giambalvo, 2004) qui pourtant est associée à une action inhibitrice sur la PKC (Giambalvo and Price, 2003). Cette activation de la PKC par l'amphétamine nécessite du calcium et de la dopamine intracellulaire et bien que la sérotonine sorte par les transporteurs SERT lors de l'entrée de l'amphétamine, elle est aussi capable d'activer, de façon biologique, la PKC (Giambalvo and Price, 2003) (Giambalvo, 2004). La PKC, lorsqu'activée, va du cytosol aux membranes. Or certaines molécules importantes pour la libération des neurotransmetteurs, voient leur phosphorylation PKC dépendante augmenter comme la neuromoduline dans le striatum de rats suite à un traitement chronique d'amphétamine suggérant par ailleurs, un rôle de la PKC dans la sensibilisation comportementale (Narita et al., 2004). C'est également le cas de la protéine Flotilin-1 (Flot1) aussi appelée Reggie-2 qui interagit avec les transporteurs internalisant les neurotransmetteurs, la PKC mais aussi DAT (Cremona et al. 2011).

7. L'amphétamine

7. 1. Découverte et définition de l'amphétamine

Tout comme la L-DOPA, l'amphétamine est une drogue psychoactive, à fort potentiel de dépendance créant aussi des altérations motrices inhérentes aux structures dopaminergiques des ganglions de la base. Synthétisée pour la première fois en 1887

(Edeleano, 1887), les effets sympathomimétiques et stimulants respiratoires de l'amphétamine furent décrits dès 1933 (Seiden et al., 1993). En 1935, les actions stimulantes de l'amphétamine ont commencées à être utilisées dans le traitement des narcolepsies, puis, dans le traitement de l'obésité, des désordres hyperactifs avec déficit d'attention et aussi pour la maladie de Parkinson de façon occasionnelle (Seiden et al., 1993). L'amphétamine, soit l' α -méthyl-phényléthylamine, et ses dérivés comme la méthamphétamine (méthyl- α -méthyl-phényléthylamine) sont classés parmi les psychostimulants majeurs. Ce sont, plus spécifiquement, des psychoanaleptiques qui accélèrent l'activité du système nerveux et stimulent l'humeur et des nooanaleptiques qui ont pour effet d'augmenter les performances cérébrales en ce qui concerne l'idéation.

7. 2. Mécanismes d'action de l'amphétamine

L'amphétamine provoque une augmentation massive et rapide de dopamine dans la fente synaptique. En effet, le stockage de la dopamine se fait soit dans des vésicules soit au sein du cytoplasme (Seiden et al., 1993). A faibles doses, en entrant passivement dans le neurone *via* des échangeurs d'ions, l'amphétamine déplace la dopamine vers la fente synaptique. À fortes doses, lorsque les échangeurs d'ions sont saturés, l'amphétamine entre par diffusion passive dans la terminaison synaptique puis dans les vésicules de stockage. L'amphétamine, en alcalinisant le PH de ces dernières déplace la dopamine vers le cytoplasme puis du cytoplasme vers la fente synaptique (Seiden et al., 1993) (Liang and Rutledge, 1982). Cependant, l'amphétamine, et ses dérivés, augmentent aussi la libération de noradrénaline, inhibe la recapture de la dopamine, de la noradrénaline, de la sérotonine et inhibe la MAO (l'affinité de l'amphétamine sur la MAO étant moins forte que celle de la dopamine, son effet n'est considéré qu'à fortes doses) (Seiden et al., 1993). En augmentant les concentrations extracellulaire de dopamine, l'amphétamine agit comme un agoniste dopaminergique indirecte qui accroît la stimulation de récepteurs dopaminergiques.

7. 3. Structures cérébrales cibles de l'amphétamine

En agissant directement sur le circuit du phénomène de récompense qui est le circuit mésolimbique, l'amphétamine, et ses dérivés, créent une sensation de plaisir d'où son usage répété, l'abus puis la dépendance où le besoin et la recherche de drogue peuvent se substituer aux besoins fondamentaux tels que boire ou manger.

7. 3. 1. Le mésencéphale

Dans le mésencéphale, la VTA serait liée à l'anticipation de la récompense par sa fonction de libération de dopamine. En effet, l'amphétamine stimule la libération de la dopamine des neurones de la VTA dans le noyau accumbens et le cortex préfrontal (Nestler, 2001a) (figure n°11). La coordination de la réponse entre le noyau accumbens, l'amygdale, l'hippocampe, le cortex préfrontal et le striatum dorsal se fait également grâce aux projections dopaminergiques diffuses de la VTA aux régions limbiques et au cortex préfrontal mais aussi par les projections striatales de la substance noire (Hyman et al., 2006) (Figure n°11).

7. 3. 2. Le cortex préfrontal

Le cortex préfrontal, surchargé en dopamine, provoquerait un sur-apprentissage des indices liés à la drogue (Kalivas et al., 2005), (Hyman et al., 2006).

7. 3. 3. Le striatum

Le striatum ventral établirait un processus motivationnel prioritaire de recherche de drogue et le striatum dorsal prendrait le relais assez rapidement quand la recherche de drogue deviendrait une habitude répondant aux indices environnementaux en consolidant des actions efficaces (NDR : motrices) orientées vers l'obtention de la récompense (Graybiel, 1998) (Everitt et al., 2001) (Hyman and Malenka, 2001) (Packard and Knowlton, 2002) (Barnes et al., 2005) (Everitt and Robbins, 2005) (Vanderschuren et al., 2005) (Hyman et al., 2006). Plus spécifiquement, ce serait au niveau du shell du noyau accumbens qui est connecté à d'autres aires régulant les émotions que la dopamine libérée influencerait le plus la réponse aux niveau des stimuli de récompense

(Pontieri et al., 1995) (Ito et al., 2004) (Hyman et al., 2006). Aussi, il est à noter que l'amygdale et le cortex préfrontal jouent des rôles critiques dans l'appréciation de la récompense et dans l'instauration d'une mémoire associée à la récompense (Everitt et al., 2003) (Kalivas et al., 2005) (Hyman et al., 2006) alors que le striatum ventral ferait office d'interface entre le système motivationnel (amygdale, hippocampe, cortex préfrontal) et le système moteur (striatum dorsal) (Mogenson et al., 1980).

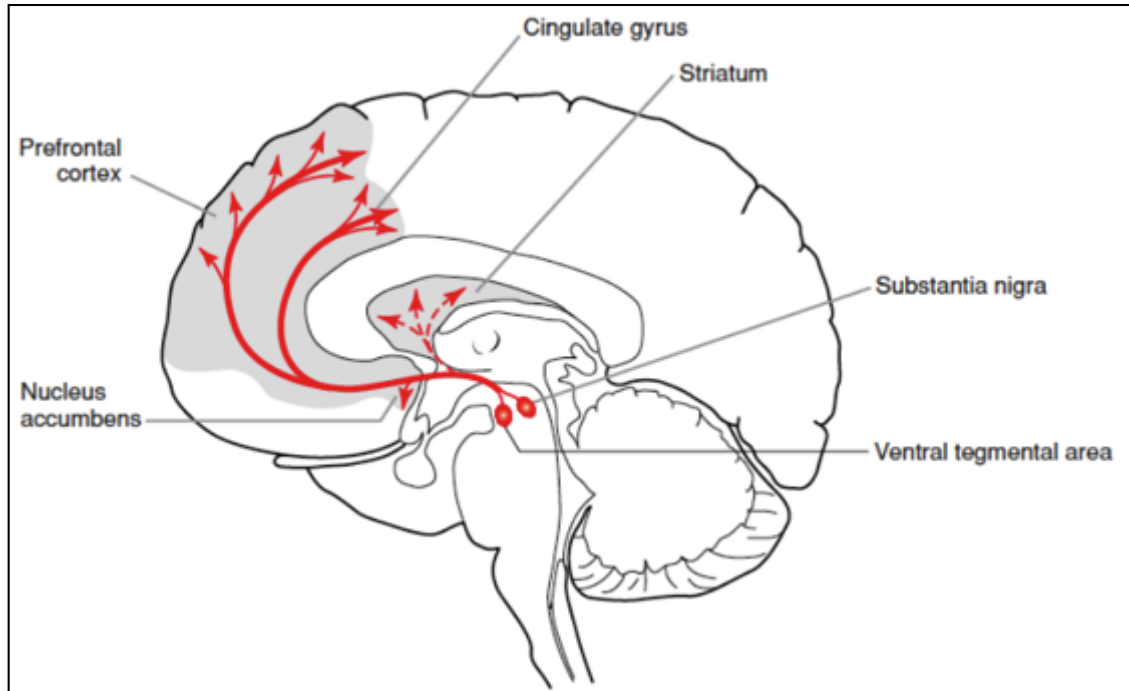


Figure n°11 : Projections dopaminergiques au prosencéphale. Voici illustré les projections de l'aire tegmentaire ventrale au noyau accumbens et au cortex préfrontal ainsi que les projections de la substance noire au striatum dorsal (le caudé, le putamen et les structures associées) (Hyman and Malenka, 2001).

7. 4. Modèles animaux et effets comportementaux liés à l'amphétamine

Scientifiquement parlant, il a été démontré que les effets observés chez l'humain suivent un parallèle étroit avec ceux observés chez les animaux. A faibles doses, l'amphétamine augmente l'activité locomotrice stéréotypée; à fortes doses, des stéréotypies espèces spécifiques apparaissent (Seiden et al., 1993) et de la sensibilisation comportementale se

développe à la fois chez le rat et chez l'humain. Les stéréotypies liées à l'amphétamine chez le rat sont traitables par des antipsychotiques (Randrup and Munkvad, 1965). Il a été rapporté que les psychoses dues à l'amphétamine et celles de la schizophrénie avaient de similarités comportementales et biochimiques (Snyder et al., 1974) (Ellinwood et al., 1973). Ces similarités entre les phénomènes liés à l'amphétamine et la schizophrénie font que des traitements chroniques d'amphétamine, en plus de leur indispensabilité pour l'étude des phénomènes de drogues d'abus, sont considérés comme des modèles animaux de schizophrénie reconnus et utiles (Ellinwood et al., 1973).

7. 4. 1. Sensibilisation comportementale

7. 4. 1. 1. Définition de la sensibilisation comportementale

En fonction du mode d'administration (par intermittence (Dougherty and Ellinwood, 1981)), certaines drogues, dont l'amphétamine (Dougherty and Ellinwood, 1981) peuvent produire de la sensibilisation (Kalivas and Stewart, 1991). Il s'agit d'un phénomène durable, observé pour plus d'une année chez des rats sensibilisés à l'amphétamine (Paulson et al., 1991). La sensibilisation contexte dépendante ou associative, traduit le fait qu'un rat mis dans une nouvelle cage pour des injections intermittentes d'amphétamine répondra plus fortement à la dose challenge (i.e. une dose d'amphétamine après plusieurs jours de sevrage) si il est mis dans cette « nouvelle » cage plutôt que dans sa propre cage ou dans un environnement différent (Badiani et al., 1995) (Hinson and Poulos, 1981). Il existe également une forme de sensibilisation appelée tolérance inverse (Wang and McGinty, 1995) qui est définie comme une augmentation de la courbe dose réponse qui pourrait être due soit à une augmentation du nombre de récepteurs soit à une augmentation de la force de couplage des récepteurs à leurs protéines effectrices (Berke and Hyman, 2000). Ces hypothèses sont malheureusement en contradiction avec d'autres dont certains pensent que la tolérance inverse résulterait d'une hypo-sensibilité des autorécepteurs dopaminergiques D2 localisés sur les corps cellulaires et/ou les dendrites des neurones dopaminergiques de la

VTA (White and Wang, 1984) hypo-sensibilité en fait prolongée par une hypo-sensibilité des récepteurs D1 dans les neurones striataux (Robinson and Becker, 1986).

7. 4. 1. 2. Neuro-anatomie de la sensibilisation comportementale

Plusieurs études s'accordent pour dire que l'initiation de la sensibilisation vient de l'action des psychostimulants sur le corps cellulaire des neurones de la VTA alors que l'expression comportementale de la sensibilisation impliquerait une augmentation près et post-synaptique de la transmission dopaminergique dans le noyau accumbens plus particulièrement par l'activation des récepteurs dopaminergiques D1 (Kalivas and Stewart, 1991) (Kalivas, 1995) (Cador et al., 1999). En effet, des injections directes d'amphétamine dans le striatum ne produisent pas de réponse conditionnée ni de sensibilisation contexte dépendante (Berke and Hyman, 2000).

7. 4. 2. Stéréotypies

Il existe également une sensibilisation de la réponse stéréotypique pendant les premières phases d'exposition à l'amphétamine (Ellinwood and Kilbey, 1975) (Berke and Hyman, 2000). De plus, si l'augmentation de l'activité locomotrice (sensibilisation) est associée, comme nous venons de le voir, à l'activation des projections dopaminergiques venant de l'aire tegmentaire ventrale au noyau accumbens, les stéréotypies, quant à elles, seraient plus associées à l'activation des projections dopaminergiques de la substance noire compacte au noyau caudé (Creese and Iversen, 1975) (Kelly et al., 1975). Cependant, nous ne pouvons pas non plus exclure un renforcement venant du cortex préfrontal puisque les stéréotypies nécessitent l'activation d'un système dopaminergique intacte pour se développer (Creese and Iversen, 1975) (Pijnenburg et al., 1976) (Kelley et al., 1988) (les antipsychotiques bloquent aussi les stéréotypies induites par l'amphétamine (Snyder, 1973)).

7. 4. 2. 1. Définition des stéréotypies

Dès 1984, il a été énoncé que les effets locomoteurs des faibles doses d'amphétamine sont déjà de nature stéréotypique (Rebec and Bashore, 1984) (Wise and Bozarth, 1987) (Seiden et al., 1993). En effet, les Drs George V. Rebec et Théodore R. Bashore

soutiennent que l'augmentation de l'activité locomotrice est déjà en soit un mouvement répétitif stéréotypique de l'activité locomotrice mais à laquelle s'ajoute la notion psychomotrice des stéréotypies (Wise and Bozarth, 1987). La notion psychomotrice fait référence au fait que les mouvements stéréotypiques ne sont pas uniquement de nature purement motrice comme nous le montrent les différents exemples de stéréotypies espèces dépendants tirés de la revue des Drs Roy A. Wise et Richard A. Bozarth (Wise and Bozarth, 1987). Il y est décrit que des rats sous amphétamine exprimant des stéréotypies intenses sont quand même capables de presser un levier plusieurs centaines de fois par heure (Wise et al., 1977), les stéréotypies ne semblent donc pas altérer cette autre réponse motrice intégrée par rapport à des stimuli environnementaux. De plus, sous apomorphine (l'apomorphine induit également des stéréotypies similaires à celles de l'amphétamine *via* un mécanisme commun (Ernst, 1967)), les stéréotypies qui chez les rats sont habituellement du léchage, de la mastication et des mouvements de tête latéraux associés à du « snifage » quand ils sont testés sur une surface horizontale, se transforment en rearing ou du « grimpage » dans une cage étroite donc nous avons là un facteur contextuel dont le point commun est le maintien d'un contact du museau soit avec le sol de la cage soit avec le mur de la cage (Szechtman et al., 1982).

Remarque : ces mouvements stéréotypiques, observés lors d'une hyperstimulation du système dopaminergique, sont fréquemment utilisés pour vérifier les résultats de lésions unilatérales du système dopaminergique qui sont un modèle animal courant de maladie de Parkinson. En effet, les animaux avec une lésion de l'hémisphère gauche, stimulés avec de l'apomorphine, tournent dans une cage ronde du côté du cerveau présentant la plus forte activité dopaminergique c'est à dire du côté gauche quand c'est le cerveau droit qui est intacte dans notre exemple (Glick et al., 1976). Là encore le contexte intervient puisque ces animaux sont en fait capables de marcher en ligne droite sur plusieurs mètres mais c'est que chacun tend à faire un détour du côté du cerveau actif lorsqu'un obstacle survient (l'hémisphère droit contrôle le côté gauche donc si c'est l'hémisphère droit qui est intacte les animaux tourneront du côté gauche) (Ungerstedt, 1971b). Il est à noter que la taille des cercles dépend plus de l'environnement que du degrés de lésion dopaminergique (Holmes and Wise, 1985) (Wise and Holmes, 1986).

7. 5. Pathologie liée à l'amphétamine : la toxicomanie

7. 5. 1. Définition de la toxicomanie

La toxicomanie est considérée comme la plus sérieuse des conséquences à long terme d'une prise de drogue comme l'amphétamine et constitue un risque persistant de rechutes. Il s'agit d'un état durable dans lequel l'utilisation de drogue devient compulsive et échappe au contrôle de l'utilisateur et ce même en présence de sérieuses conséquences pour le sujet (Hyman and Malenka, 2001). Les Drs Steven E. Hyman et Robert C. Malenka ont émis l'hypothèse que cette utilisation compulsive de drogue qui caractérise la toxicomanie puisse se traduire au niveau moléculaire en une usurpation des mécanismes de la mémorisation (Hyman and Malenka, 2001). Cette hypothèse, où nous retrouvons nos mécanismes de LTP/LTD (cf. annexe 1), tend à se préciser, en 2006, avec la collaboration du Dr Éric J. Nestler, je cite : « Clinical and laboratory observations have converged on the hypothesis that addiction represents the pathological usurpation of neural processes that normally serve reward-related learning. The major substrates of persistent compulsive drug use are hypothesized to be molecular and cellular mechanisms that underlie long-term associative memories in several forebrain circuits (involving the ventral and dorsal striatum and prefrontal cortex) that receive input from midbrain dopamine neurons. » (Hyman et al., 2006). Si peu de choses sont connues sur l'influence de la dopamine lors LTP/LTD dans le cortex préfrontal, il a été démontré que la dopamine modifiait la plasticité synaptique de plusieurs autres régions incluant l'amygdale, l'hippocampe et plusieurs drogues d'abus altèrent le LTP dans l'hippocampe (Hyman et al., 2006).

7. 5. 1. 2. Évidences scientifiques concernant l'hypothèse des Drs Hyman, Malenka et Nestler, sur la toxicomanie

D'un point de vue comportemental, il a été démontré qu'une injection de psychostimulants augmentait les capacités d'apprentissage du striatum. En effet, des injections d'amphétamine avant ou juste après l'entraînement augmentent les performances des rats au Water Maze Test le jour suivant (Packard et al., 1994). D'un

point de vue moléculaire, l'amphétamine (tout comme la dopamine) bloque l'induction du LTD *via* les autorécepteurs D2 (Wolf et al., 2004) aux synapses (Jones et al., 2000) de la VTA laissant toute la place au LTP. Dans le noyau accumbens, l'amphétamine bloque la genèse du LTP en aiguë mais pas en chronique (Li and Kauer, 2004). Or, d'un point de vue signalétique, lors de conditions normales, le récepteur D1 du striatum est couplé à la cascade de signalisation AMPc/PKA/CREB (Konradi et al., 1994) (Hyman, 1996) associée aux adaptations synaptiques et à la formation de la mémoire chez plusieurs espèces (Silva et al., 1998). La cascade PKA dépendante liée aux récepteurs D1 conduit à l'externalisation des récepteurs AMPA qui sont normalement insérés aux synapses durant le LTP et enlevés durant le LTD (Wolf et al., 2004). Ce trafic moléculaire pourrait expliquer la facilitation de l'apprentissage sous psychostimulants puisque ceux-ci libèrent de la dopamine et donc activent le D1 (Wolf et al., 2004). En outre, activée de façon désordonnée cette plasticité mal adaptée contribuerait au transfert de l'utilisation de drogues de ponctuel à compulsif (Wolf et al., 2004) puisque le LTP contribuerait à apprendre ce pourquoi il a été activé. De plus, les psychostimulants induisent la phosphorylation (donc l'activation) de CREB (une pierre angulaire des mécanismes transcriptionnels de LTP et LTD) *via* le stimulation du récepteur D1 (Das et al., 1997) mais aussi *via* un niveau intra cellulaire de calcium significatif ce qui mime de beaucoup l'activation des mécanismes moléculaires d'induction du LTP dans le striatum dorsal (Hyman and Malenka, 2001). Dans le noyau accumbens l'induction de CREB par les psychostimulants est véhiculée *via* l'activation des D1 (Konradi et al., 1994) (Cole et al., 1995). Dans la VTA, la phosphorylation de CREB augmente le firing du LTP (Hyman et al., 2006) ce qui corrèle avec une augmentation du ratio AMPA/NMDA (NDR : une preuve indirecte de LTP) suite à des injections d'amphétamine, ce qui n'est pas observé avec des drogues non addictives (Saal et al., 2003).

7. 6. Altérations moléculaires liées à la prise d'amphétamine

7. 6. 1. Altération de certains facteurs de transcription liés à la prise d'amphétamine

Les psychostimulants induisent les fos, entre autre la protéine Δ FosB dont la synthèse est un problème majeur que ce soit suite à des injections aiguës ou chronique puisque la demie vie de cette protéine est considérée comme extrêmement longue et que sa sur expression régule l'expression de la Cdk5 (Cycline dépendante kinase 5), une kinase impliquée dans le remodelage cellulaire neuronal (Bibb et al., 2001).

7. 6. 2. Gènes d'induction précoces liés à la prise d'amphétamine

L'induction des IEG sous amphétamine se fait principalement dans les D1 (Cole et al., 1992) (Douglass et al., 1995) (Berke et al., 1998) (Graybiel et al., 1990) (Moratalla et al., 1992) (Nguyen et al., 1992) et est transitoire (Wang et al., 1995) (Berke et al., 1998) sauf dans le cas de la protéine Δ FosB dont l'expression peut être augmentée pour plus de quatre semaines (Berke and Hyman, 2000). Les souris D1 knockout n'ont pas cette induction des fos *via* l'amphétamine (Moratalla et al., 1996) alors qu'un antagoniste D2 (l'étiopride) réduit l'induction de fos *via* l'amphétamine de 90% dans le striatum ventral et de 98% dans la substance noire réticulata montrant ainsi une interdépendance de ces récepteurs pour cet IEG (Ruskin and Marshall, 1994) (Graybiel et al., 1990). Ceci rejoint en partie d'autres observations de synergie des récepteurs D1 et D2, *via* des agonistes spécifiques, dans le striatum notamment pour l'induction de Nur77 (St-Hilaire et al., 2003). Si les récepteurs D1 et D2 du striatum sont nécessaires à l'induction des fos par l'amphétamine ce ne sont pas les seuls en cause. Le récepteur adrénergique A_{2A} exprimé sur les neurones D2 joue lui aussi sur l'induction de c-fos *via* l'amphétamine puisqu'un antagonisme fonctionnel entre les récepteur A_{2A} et D2 a déjà été rapporté (Ferre et al., 1991) (Ferre et al., 1994) et qu'un agoniste A_{2A} inhibe l'induction de c-fos dans le caudé putamen et l'accumbens (Turgeon et al., 1996). De plus, zif/268 (Konradi et al., 1996), Egr1-3 et Nac-1 sont aussi induits après une administration aiguë de cocaïne (Nestler, 2001a) ou encore Nur77 suite à une ou des injections d'amphétamine

(données personnelles non publiées). Sous amphétamine chronique, il est observé une diminution de l'induction des IEG (Persico et al., 1993) (Cole et al., 1995) (Konradi et al., 1996) avec en plus la notion d'un transfert de l'induction de c-fos des D1 aux D2. En effet, suite à une administration aigue d'amphétamine 78% des neurones D1 expriment l'ARNm fos/fra contre 33% des neurones D2 pour ensuite passer de 56% dans les D1 contre 52% dans les D2 en chronique (Jaber et al., 1995). Ce pendant, il est à noter qu'il y a là également une notion d'apprentissage qui intervient sur la population neuronale où les IEG sont induits puisque lorsque l'amphétamine est donnée dans la cage usuelle de l'animal les IEG sont induits dans les neurones striataux de la voie D1 (Berretta et al., 1992) (Cenci et al., 1992) (Johansson et al., 1994) (Ruskin and Marshall, 1994) (Ferguson and Robinson, 2004) alors que dans un nouvel environnement ils le sont dans les neurones de la voie D2 (Badiani et al., 1999) (Jaber et al., 1995) (Uslaner et al., 2001) (Uslaner et al., 2003) (Ferguson and Robinson, 2004).

7. 6. 3. Neuropeptides liés à la prise d'amphétamine

En aigue, mais aussi en chronique, l'amphétamine conduit à une augmentation retardée mais de plus longue durée du neuropeptide dynorphine (neurones de la voie D1) (Wang and McGinty, 1995) (Li et al., 1988) (Trujillo et al., 1990) (Wang and McGinty, 1995). L'augmentation de dynorphine en chronique corrèle de façon positive avec l'augmentation de l'intensité de la réponse comportementale. De plus, si la dynorphine peut participer à la mise en place de la sensibilisation elle n'est pas impliquée dans ce phénomène. Une induction moins forte d'enképhaline (neurones de la voie D2) est également observée suite à un traitement aigue, chronique et un challenge à l'amphétamine (Wang and McGinty, 1995) mais toutes les études ne concordent pas en ce qui concerne l'augmentation d'enképhaline suite à une dose challenge d'amphétamine.

7. 6. 4. Signalisation intracellulaire liée à la prise d'amphétamine

7. 6. 4. 1. Voies des ERK/MAPK kinases liées à la prise d'amphétamine

Certaines études ont démontré que les kinases ERK1/2 étaient fortement induites 15 minutes après une injection d'amphétamine aigue (2,5 mg/kg ip) (Shi and McGinty,

2006). De plus, un inhibiteur de MEK (le SL327), sous amphétamine, toujours en aigue, diminue l'activité locomotrice horizontale et verticale (Shi and McGinty, 2006) ce qui correspond aux résultats que nous avons obtenus avec des agonistes D1/D2 précédés de 100 mg/kg de SL327 30 minutes avant (Bourhis et al., 2008). Même s'il s'agit d'administration aigue d'amphétamine, les auteurs de cet article ont également réussi à déterminer que le SL327 abolissait l'induction de préprodynorphine et de préproenképhaline (Shi and McGinty, 2006). Ce qui est intéressant dans cette étude est qu'ils ont reproduits les mêmes résultats non seulement comportementaux mais aussi biochimiques avec le U0126. Le U0126 est un inhibiteur de MEK administré en intrastriatal (Shi and McGinty, 2006) ce qui permet de supputer que la diminution d'activité locomotrice est effectivement due à un effet intrastriatal de l'inhibition de MEK avec le SL327 et non un effet périphérique. De plus cela démontre de façon assez claire que la cascade de signalisation des ERK est impliquée dans les effets comportementaux et biochimiques dues à l'amphétamine (Shi and McGinty, 2006). D'autres études ont permis de démontrer que cette activation de ERK suite aux psychostimulants nécessitait l'activation des récepteurs D1 et NMDA et passait par DARPP-32 (il n'y a pas d'activation de ERK chez les souris DARPP-32 knockout) (Calabresi et al., 2008). Cependant, la cascade des MAP kinases ERK semble intervenir dans l'induction des IEG *via* l'amphétamine dans les D2 dans un nouvel environnement. De plus, dans les effets à long terme des psychostimulants, l'isoforme ERK2 semble plus impliqué que l'isoforme ERK1 car il est l'isoforme le plus stimulé au sein du striatum (Valjent et al., 2005) (Valjent et al., 2006b). Quoiqu'il en soi, que ce soit dans la population neuronale D1 ou D2 les MAPKs ERK sont impliquées dans les effets liés à l'amphétamine.

7. 6. 4. 2. Voie AMPc/PKA liée à la prise d'amphétamine

Ces observations sur les ERK rejoignent les résultats scientifiques les plus anciens qui associent l'induction des IEG sous amphétamine à l'activation des D1 *via* la cascade AMPc/PKA (Graybiel et al., 1990) (Cole et al., 1994) (Konradi et al., 1994) (Ferguson and Robinson, 2004). En effet, c'est en 2006 que le Dr Jean-Martin Beaulieu récapitule

la signalisation des D1 et D2 dans le striatum (figure n°12) où il rebaptise la cascade AMPc/PKA par PKA/DARPP-32 qui agit non seulement sur ses propres cibles mais aussi sur DARPP-32 (Greengard et al., 1999) qui en retour, *via* PP1 peut agir sur les ERKs (figure n°14) (Beaulieu et al., 2006). La phosphorylation de DARPP-32 sur la Thr 34 a été associée avec l'activation de la locomotion et de la réponse biochimique à de multiples drogues psychotropes incluant les psychostimulants (Beaulieu et al., 2005) (Fienberg et al., 1998) (Fukui et al., 2003). Selon lui, il existe également, en plus des ERK, et de la PKA, la voie Akt/glycogène synthase kinase 3 GSK3 qui est régulée négativement par la classe de récepteurs D2 *via* un complexe de signalisation impliquant PP2A et la β -arrestine 2 qui intervient dans la régulation de l'activité locomotrice *via* la dopamine (Beaulieu et al., 2004) (Beaulieu et al., 2005) (Beaulieu et al., 2006).

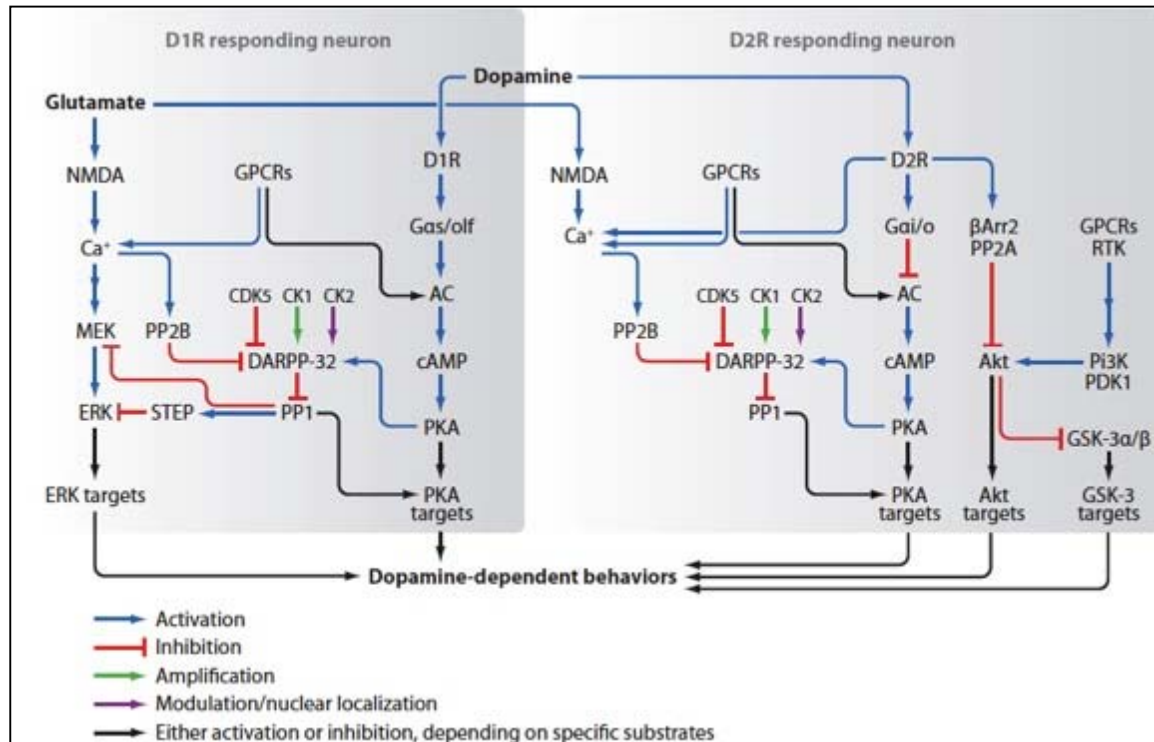


Figure n°12 : Complexité de la réponse de signalisation *in vivo*; réseau des cascades de signalisations régulées par les récepteurs dopaminergiques D1 (D1R) et les récepteurs dopaminergiques D2 (D2R) au sein des neurones du striatum de souris. Les récepteurs dopaminergiques D2 ont des réponses dépendantes des protéines G et de la β Arr2. Les actions d'autres neurotransmetteurs, facteurs de croissance, et neurotrophines ont aussi été

inclues pour illustrer le rôle de plusieurs de ces intermédiaires comme intégrateur de signalisation (Beaulieu et al., 2006).

7. 7. Problématique du laboratoire liée à l'amphétamine

L'amphétamine est une drogue d'abus sur laquelle nous souhaitons tester les effets d'une délétion du gène *nur77* par le biais de souris knockout et les effets d'agonistes antagonistes RXR sur la sensibilisation et les effets locomoteurs induits par cette drogue. Un point sur lequel j'aimerais attirer l'attention du lecteur concernant l'amphétamine est qu'il s'agit d'une drogue à fort potentiel toxicomanogène où nous retrouvons un point commun avec les LIDs qui est l'implication des MAP Kinases ERK dans un phénomène là aussi d'usurpation des mécanismes d'apprentissage du LTP/LTD mais dans un tout autre contexte puisque pour l'amphétamine il s'agit d'un renforcement abusif du système normal de récompense alors que pour les LIDs il s'agit de l'activation d'un LTP non physiologiquement normal à cause des altérations moléculaires induite par une dénervation dopaminergique préalable. Ceci me conduit à dire que tester l'influence des kinases ERK et PKC sur l'induction des membres de la famille des NR4A pourrait s'avérer utile dans l'élucidation des mécanismes moléculaires induisant la transcription des *nurs* non seulement dans les LIDs mais aussi dans les phénomènes de drogues d'abus et, avec l'utilisation d'antagonistes D2, dans les effets des antipsychotiques.

8. Travaux et résultats antérieurs au sein du laboratoire

8. 1. Les antipsychotiques et les NR4As

8. 1. 1. Les antipsychotiques

Les antipsychotiques ou neuroleptiques constituent la pharmacopée actuelle pour lutter contre la schizophrénie qui comprend trois types de drogues : les antipsychotiques typiques, les antipsychotiques atypiques et les agonistes dopaminergiques partiels. Le fait que les antipsychotiques provoquent des tremblements et une rigidité ressemblant à la maladie de Parkinson a permis de suggérer en 1967 qu'ils interrompaient la neurotransmission dopaminergique. Plus précisément, en ayant une action antagoniste

sur les récepteurs dopaminergiques D2 des voies nigrostriées et mésocorticolimbiques (Seeman and Van Tol, 1994). D'un point de vue clinique, 30% des patients ne répondent pas aux antipsychotiques typiques et 30-40% ne répondent que partiellement (Reynolds, 1997). De plus, des effets secondaires moteurs appelés symptômes extrapyramidaux apparaissent chez plus de 75% des patients ainsi qu'une réduction de tolérance (Reynolds, 1997). Ces symptômes extrapyramidaux, apparaissant parfois lors des effets aigus des antipsychotiques, deviennent plus tard des dyskinésies tardives caractérisées par des mouvements involontaires de la face, de la bouche, de la langue, et occasionnellement des autres parties du corps (Kane, 1995). Ces dyskinésies tardives persistent après le traitement (Andreassen et al., 1999) et ne sont pas à négliger puisque la schizophrénie nécessite un traitement à vie et que la prévalence des dyskinésies tardives atteint 50% chez les sujets âgés institutionnalisés (Owens et al., 1982).

L'absence de ces dyskinésies tardives a permis de qualifier d'atypiques la nouvelle classe d'antipsychotiques mis sur le marché en 1970 (Gerlach, 1991). Si tous les antipsychotiques ont en commun une action antagoniste sur les récepteurs dopaminergiques D2, les antipsychotiques atypiques, particulièrement la clozapine, ont de multiples sites d'action comme les récepteurs dopaminergiques D1, D3, D4, les récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{1A}, 5-HT_{2C}, 5-HT₆, 5-HT₇, muscariniques, cholinergiques et histaminiques (Miyamoto et al., 2005). De plus, ils sont capables d'inhiber spécifiquement les neurones de la VTA (noyau A10 projections mésolimbiques et mésocorticales) alors que les typiques agissent dans tout le cerveau (White and Wang, 1983). Les antipsychotiques atypiques ne sont malheureusement pas exempts d'effets secondaires. Ils sont susceptibles d'induire un gain de poids (Casey and Zorn, 2001), une hyperglycémie (Lindenmayer et al., 2001) voir même du diabète (Sernyak et al., 2002) et une hyperlipidémie (Melkersson et al., 2000) (Meyer, 2001). 1% des patients sous clozapine développent une agranulocytose (Baldessarini, 1990), un déficit immunitaire pouvant être léthal (Robertson et al., 1994). En outre, les atypiques auraient une efficacité comparable aux antipsychotiques typiques (méta analyse CATIE) (Lieberman et al., 2005). Premier de sa génération, l'aripiprazole est un agoniste partiel D2, D3, il a peu d'affinité pour le récepteur alpha₁-adrenergique, l'histamine (H₁), le 5-

HT₆, et le 5-HT₇ et aucune affinité pour le D1, les récepteurs histaminergiques, cholinergiques, muscariniques (Burris et al., 2002) (Reynolds, 2004); il a beaucoup plus d'affinité pour le D2 que le 5-HT_{2A} (Miyamoto et al., 2005). En empêchant l'activation du récepteur D2 à son plein potentiel, l'aripiprazole recrée l'action antagoniste des antipsychotiques mais ce mécanisme permet d'éviter les dyskinésies (Kane et al., 2002).

8. 1. 2. Injections d'antipsychotiques en dose unique

Au sein du laboratoire, des injections aiguës d'antipsychotiques typiques (halopéridol) et atypiques (clozapine) chez des souris sauvages provoquent une induction de l'ARNm de Nur77 au sein du cortex cingulaire, du cortex préfrontal, dans le shell du noyau accumbens et dans la partie dorsale du striatum (partie motrice) uniquement pour l'halopéridol (Beaudry et al., 2000) ce qui prédisposerait peut être déjà aux effets secondaires extrapyramidaux des antipsychotiques typiques. De plus, toujours en aiguë, il a été démontré que les récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{1A} et 5-HT_{2A} participaient à l'induction striatale de Nur77 et de Nor-1 en modulant leur schéma d'expression (Maheux et al. 2012). En outre, après avoir observé que l'induction de l'ARNm de Nur77 était normale au sein du striatum de souris D2_L knockout (les récepteurs D2_L sont spécifiquement post-synaptiques dans le striatum) et que l'induction des Nur77 *via* l'étiopride (antagoniste D2) était abolie chez des souris dont le cortex avait été détruit à l'acide iboténique; nous avons démontré que la modulation de l'expression génique de Nur77 *via* des antagonistes D2 dans le striatum impliquait les récepteurs corticaux pré-synaptiques D2_S et l'activation subséquente des récepteurs post-synaptiques glutamatergiques et adénosinergiques striataux. Ces résultats suggèrent un nouveau mécanisme d'action des antagonistes D2 avec un rôle possible du glutamate dans les effets des antipsychotiques typiques (données acceptées pour publication Maheux et al.).

8. 1. 3. Injections chroniques d'antipsychotiques

En chronique, les antipsychotiques typiques (halopéridol) continuent à induire de forts niveaux d'ARNm dans le striatum dorsolatéral, alors que sous clozapine, l'expression de Nur77 diminue parfois même en dessous du seuil basal dans le prosencéphale (Beaudry

et al., 2000). Ces résultats corrèlent toujours avec une implication potentielle de Nur77 dans les dyskinésies tardives induites par les antipsychotiques typiques. De plus, la population neuronale affectée par ces changements est confirmée (tous les antipsychotiques ciblent les neurones de la voie indirecte et antagonisent les récepteurs dopaminergiques D2) lorsqu'une double hybridation *in situ* montre que Nur77 est induit dans les neurones enképhaline positifs (Beaudry et al., 2000) où d'ailleurs l'enképhaline elle même est augmentée sous halopéridol chronique (Ethier et al., 2004a).

En revanche, des expériences parallèles nous ont permis de démontrer qu'RXR γ 1, dont l'expression est physiologiquement forte dans le striatum dorsolatéral, n'était que modestement affecté par des injections d'antipsychotiques typiques ou atypiques en aigue comme en chronique (Langlois et al., 2001) (ceci est également le cas dans des modèle animaux de maladie de Parkinson puisque RXR γ 1 reste également très stable chez des singes 1- traités au MPTP puis 2- sous L-DOPA (Mahmoudi et al., 2009)).

Remarque : en tant que modèle animal, les VCMs sont des mouvements oro-faciaux anormaux qui partagent des similarités avec les dyskinésies tardives induites par les antipsychotiques typiques en chronique chez l'humain (Turrone et al., 2002). Les catalepsies chez le rongeur constituent quant à eux un analogue des syndromes parkinsoniens aigus induits par les antipsychotiques typiques en aigue chez l'humain (Hoffman and Donovan, 1995).

8. 2. Dyskinésies induites par un traitement de L-DOPA ou des antipsychotiques typiques

En ciblant le striatum, les antipsychotiques tout comme la L-DOPA induisent des mouvements involontaires anormaux. Ces mouvements sont appelés dyskinésies tardives pour les antipsychotiques soit VCMs et dyskinésies induites à la L-DOPA ou LIDs pour la L-DOPA. En toute logique leurs causes sont différentes puisque les antipsychotiques sont des antagonistes des récepteurs D2 et que la L-DOPA est un agoniste D1/D2. Or, ce point à été mis en exergue par un article récemment paru en collaboration au sein du laboratoire où il est fait état qu'à l'inverse de ce qui se produit lors d'une administration

continue de L-DOPA qui diminue et retarde les LIDs, une administration continue d'halopéridol induit de plus forts VCMs comparé à des doses journalières répétées (Blanchet et al., 2012) et exacerbe l'effet de récompense et l'induction des gènes striataux associés aux psychostimulants suggérant qu'une administration journalière et non continue d'halopéridol puisse être bénéfique pour les patients schizophrène à haut risque de toxicomanie (Bedard et al., 2011).

Or, si ces découvertes laissent intactes :

- 1- l'idée d'une participation potentielle de Nur77 à explorer au sein des mécanismes de LTP/LTD pouvant être déclenchés lors des LIDs. En effet, si l'effet pulsatile d'une administration journalière de L-DOPA en recréant une activation répétitive des récepteurs dopaminergiques inhérente au déclenchement des mécanismes d'apprentissage (« *practice makes perfect even in snail* » Dr Eric R. Kandel (Kandel, 2001)) induit des LIDs alors qu'une administration continue les retarde, est-ce que l'induction de Nur77 observée lors d'une dénervation (St-Hilaire et al., 2006) puis dans les LIDs chez le singe (Samadi et al., 2006b) participe à ces phénomènes de LTP/LTD?
- 2- l'idée d'une participation potentielle de Nur77 à explorer au sein des mécanismes de LTP/LTD pouvant être déclenchés lors des phénomènes liés à l'amphétamine au sein des neurones de la voie D1. En effet, i) Nur77 est induit dans les D1 suite à des injections d'amphétamine et ii) la toxicomanie est fortement associée aux phénomènes d'apprentissages inhérents aux mécanismes moléculaires de LTP/LTD déclenchés.
- 3- il n'en va pas de même pour un rôle possible de Nur77 dans les mécanismes moléculaires liés aux VCMs. En effet, les mécanismes d'apprentissage ne semblent pas s'appliquer aux VCMs. Il semblerait que lorsque l'on évite ce phénomène pulsatile de répétition; au lieu de diminuer l'apprentissage des VCMs qui permettrait d'observer concrètement une diminution des VCMs on observe le phénomène inverse; une exacerbation des VCMs (Blanchet et al., 2012). C'est pourquoi, l'induction de Nur77 observées sous halopéridol au sein des neurones de la voie D2

semble restreint, à un rôle d'adaptation purement motrice comme mentionné par le Dr St-Hilaire (St-Hilaire et al., 2006).

8. 2. 1. Nur77 dans les aspects moléculaires des dyskinésies tardives ou induites à la L-DOPA

En ce qui à trait aux effets de l'halopéridol (dans les D2), il a été observé chez des souris Nur77 knockout que la délétion du gène de *nur77* induisait des VCMs spontanés et exacerbait les VCMs induits par l'halopéridol, deux phénomènes que l'on retrouve à l'identique chez des souris sauvages sous antagoniste RXR (VCMs spontanés et exacerbation de VCMs induits par l'halopéridol) alors qu'un agoniste RXR comme le DHA réduit les dyskinésies tardives induites par l'halopéridol (Ethier et al., 2004b). De plus, à la fois les effets pro-dyskinétiques des antagonistes RXR et les effets anti-dyskinétiques du DHA, agoniste RXR, sur les dyskinésies tardives induites à l'halopéridol nécessitent la présence de Nur77 puisque ces drogues sont inactives chez des souris *nur77* knockout où d'ailleurs, l'halopéridol ne provoque plus d'augmentation des niveaux d'ARNm d'enképhaline (Ethier et al., 2004a). En outre, chez ces souris *nur77* knockout, le raclopride, un antagoniste D2/D3 spécifique, n'induit pas de catalepsies qui sont des manifestations motrices assimilables aux effets aigus des antipsychotiques (Ethier et al., 2004a). En revanche, la réponse cataleptique aux agonistes D1 (SCH 23390) y est conservée (Ethier et al., 2004a). Ces résultats indiquent un rôle potentiel de Nur77 tôt dans les effets des antipsychotiques (Ethier et al., 2004a), rôle qui aurait pour effet de diminuer les altérations motrices (exacerbation des VCMs chez les souris *nur77* knockout) probablement *via* des neuropeptides comme l'enképhaline sous antipsychotiques typiques chronique.

8. 2. 2. Nur77 et l'anatomie fonctionnelle des voies de sorties striatales directes et indirectes liées aux dyskinésies tardives ou induites à la L-DOPA

Au niveau de l'antagonisme des récepteurs D2 en aigue ou en chronique l'effet comportemental observé entre les catalepsies et les VCMs est opposé mais la

composante moléculaire pourrait être la même. En effet, lors des catalepsies, la souris n'est plus capable de se déplacer sur un plan incliné. Or, si le rôle physiologique de Nur77 dans les D2 (neurones de la voie indirecte qui diminue naturellement le mouvement) est de diminuer le mouvement, alors il est normal de ne plus voir de catalepsies chez les souris *nur77* knockout. De plus, en chronique, on observe une exacerbation des dyskinésies tardives provoquées par l'halopéridol chez les souris *nur77* knockout qui en fait ne possèdent plus ce moyen de diminuer le mouvement (ce qui corrèle aussi avec les LIDs où les souris Nur77^{-/-} ont d'emblé un seuil rotatoire plus élevé; action de Nur77 sur l'effet moteur des LIDs dans les D2 mais pas dans les D1). Donc, dans les neurones de la voie indirecte, Nur77, déclenché par un antagonisme des récepteurs dopaminergiques D2 (les D2 sont couplé négativement à l'AC), aurait pour rôle de diminuer le mouvement peut être en augmentant les niveaux d'enképhaline mais en tout cas, probablement, en association avec RXR γ 1 en chronique (plus aucun effet des agonistes ou antagonistes RXR chez les souris Nur77^{-/-} pour les VCMs).

Ce rôle atténuateur de mouvements de Nur77 ne se retrouve pas dans les neurones de la voie directe (voie striatonigrale facilitatrice de mouvements) puisque les souris Nur77 knockout ont toujours des catalepsies induites par des agonistes D1. Peut être que le rôle de Nur77 dans les D1 serait de faciliter le mouvement en accord avec la fonction physiologique de la voie directe? Or, si son induction *via* la L-DOPA pourrait effectivement favoriser l'apparition des LIDs (Nur77 est induit sous L-DOPA dans les D1) sa sur-expression suite à une administration de DHA (Mahmoudi et al., 2009) et l'effet anti-dyskinétique sur les LIDs du DHA (le DHA est un agoniste RXR) (Samadi et al., 2006b) ne colle pas avec cette hypothèse puisque nous devrions observer une exacerbation des LIDs (le DHA qui induit aussi Nur77 diminue les LIDs) à moins que :

- 1- le complexe RXR/Nur77 n'existe pas dans les D1 ainsi l'action anti-dyskinétique du DHA *via* RXR ne passerait pas par Nur77 dans les neurones striato-nigraux (cf. section résultats discussion sur l'amphétamine de la présente thèse),
- 2- Nur77 agisse sur la composante d'apprentissage des LIDs puisque son ARNm dans les D1 est sous le contrôle de ERK et de la PKC (section résultats discussion

sur les kinases de la présente thèse) que les souris Nur77^{-/-} n'ont plus de CPP à la cocaïne (communication personnelle Drs Daniel Lévesque et Claude Rouillard) mais dans ces conditions l'induction de Nur77, accrue sous DHA (Mahmoudi et al., 2009), observée chez le singe devrait aussi augmenter les LIDs.

3- le DHA aille potentialiser le rôle du complexe RXR/Nur77 qui diminue le mouvement dans les D2 mais chez le singe, où le DHA diminue les LIDs, Nur77 ne semble pas exprimé dans les D2 (Mahmoudi et al., 2009); un problème de transposition de données d'un modèle animal à l'autre se pose ici, en effet, ne serait-ce que chez la souris il a été démontré des différences sur les AIMs et les LIDs selon le site d'injection de la 6-OHDA à l'intérieur de la même souche, C57BL/6 (Francardo et al., 2011).

Or le problème est que les modifications moléculaires liées aux LIDs qui regroupent à la fois des composantes motrices, d'apprentissage et de sensibilisation se font sur un striatum déjà en pleine adaptation compensatrice d'une dénervation dopaminergique initiale ce qui rend les choses très complexes. C'est pourquoi, des expériences avec un protocole de sensibilisation à l'amphétamine sur un striatum dit « normal » avec des agonistes et antagonistes RXR comme le DHA et le HX531 respectivement mené chez des souris sauvages et Nur77^{-/-} permettrait d'apporter des éléments de réponse dans des conditions plus physiologiques concernant rôle de Nur77 en tant que molécule facilitatrice de mouvement dans les neurones de la voie directe (tester l'hypothèse d'une implication de Nur77 dans les mécanismes d'apprentissages liés à l'amphétamine nécessiterait d'autres types de tests) et sur l'existence potentielle d'un complexe Nur77/RXR dans les D1.

8. 3. La L-DOPA et les NR4As

Dans les modèles animaux de maladie de Parkinson, nous avons pu observer que la dénervation induisait Nur77 et la neurotensine dans les neurones de la voie indirecte du striatum dénervé (St-Hilaire et al., 2003) (St-Hilaire et al., 2005). Ceci ressemble à l'action des antipsychotiques puisqu'une dénervation équivaut à une absence d'agonistes

comme la dopamine. Lorsqu'un traitement de L-DOPA est introduit, une seconde induction de neurotensine est observée, mais cette fois-ci du côté latéral du striatum dénervé dans les neurones de la voie directe. Or, l'administration d'un antagoniste D1 de façon concomitante à la L-DOPA bloque à la fois la sensibilisation comportementale et l'induction de neurotensine dans les neurones de la voie directe confirmant ainsi son implication dans les altérations comportementales et moléculaires de la DOPA thérapie (St-Hilaire et al., 2005). D'autres expériences avec des agonistes D1/D2 induisent une importante augmentation striatale de Nur77 dans les neurones de la voie directe seulement du côté intacte (St-Hilaire et al., 2003).

Or, 1- ceci corrèle tout à fait avec la nécessité d'utiliser des agonistes dopaminergiques en première intention, puis une thérapie de remplacement après un certain seuil de dénervation, si l'on considère que dans nos modèles animaux, le striatum intacte reçoit moins l'impacte d'une dénervation que le striatum lésé mais que des agonistes dopaminergiques y restaurent ou induisent quand même une certaine activité neuronale (induction d'IEG).

2- De plus, ceci montre aussi que la L-DOPA en restaurant un effet agoniste sur les récepteurs D2 ne permet peut être plus l'activation de la cascade de signalisation (l'activation du D2 le couple négativement à l'AC) qui induit Nur77 dont les effets moléculaires, seraient de diminuer les mouvements anormaux dans les D2 (St-Hilaire et al., 2006)?

Cependant, le rôle exacte de Nur77 dans les adaptations moléculaires et comportementales observées dans les modèles animaux de maladie de Parkinson reste à définir. C'est pourquoi, une étude dans un modèle animal de maladie de Parkinson, à laquelle j'ai participé, a été menée chez des souris Nur77 knockout (St-Hilaire et al., 2006).

Remarque: le modèle 6-OHDA avec des injections dans la substance noire de rats de la neurotoxine catécholamine spécifique 6-hydroxydopamine décrit pour la première fois par Ungerstedt (Ungerstedt, 1971a) (Ungerstedt, 1971b) est le modèle animal de

maladie de Parkinson le plus utilisé dans les expérimentation citées ci-dessus avant de passer aux souris pour des raisons génétiques.

8. 4. Impact de la délétion du gène de *nur77* dans un modèle murin de maladie de Parkinson

Cette étude, dont vous pourrez trouver l'article dans le chapitre n°2 : résultats du rôle de Nur77 dans la maladie de Parkinson, et dont je suis le deuxième auteur, figure dans la thèse de doctorat du Dr Michel St-Hilaire qui en est l'investigateur principal. Ma participation a consistée en la réalisation des différentes expériences d'hybridation *in situ*, de leur quantification ainsi qu'une ébauche des analyses statistiques. Selon nous, le résultat principal de cette étude est que la réponse rotatoire à la L-DOPA des souris Nur77^{-/-} parkinsoniennes est exacerbée comparée à celle des souris sauvages mais se développe et sensibilise de la même façon chez les deux souches de souris (figure n°13). Donc, chez les souris Nur77^{-/-} la réponse motrice à la L-DOPA est la même, la sensibilisation se développe pareillement, mais elle est d'emblée plus élevée (St-Hilaire et al., 2006).

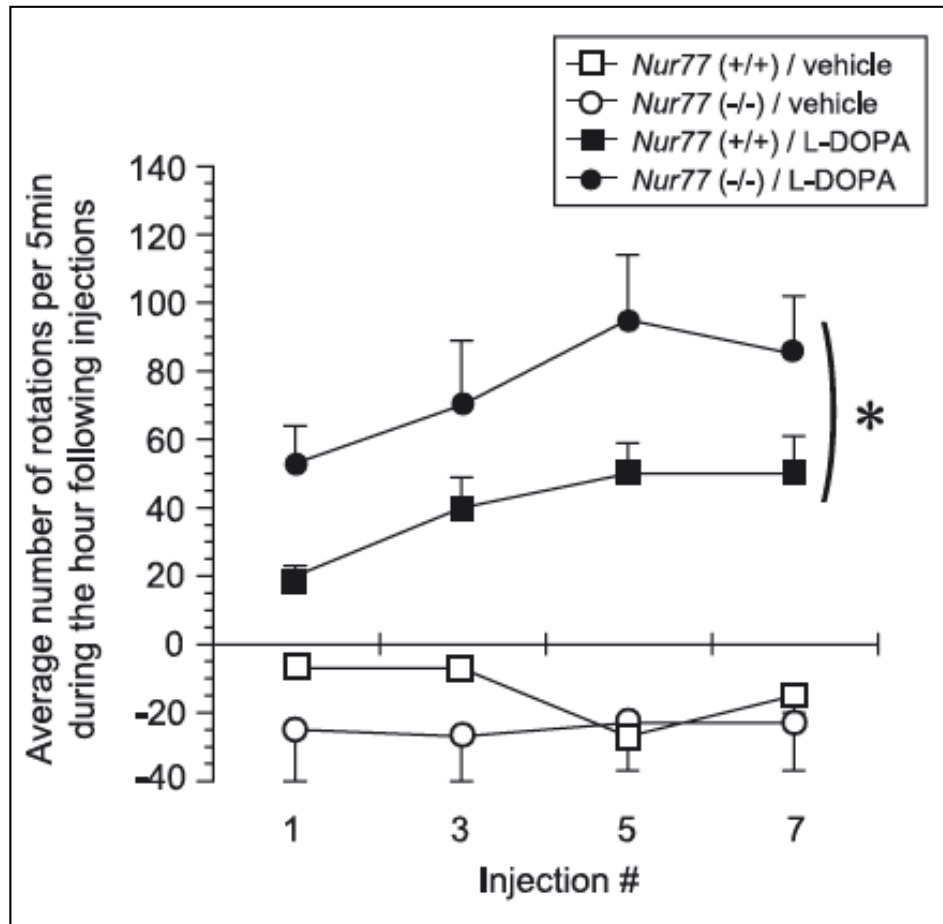


Figure n°13 : Effet de la délétion du gène *nur77* sur le comportement rotatoire de souris hémi parkinsoniennes suite à des injections de véhicule ou de L-DOPA. Le comportement rotatoire a été compté de façon manuelle sur des périodes de temps de 5 minutes (10-15 minutes et 40-45 minutes) suite à la 1^{ière}, 3^{ième}, 5^{ième} et 7^{ième} administration de L-DOPA. Le graphique ci-dessus montre la moyenne du nombre de rotations controlatérales par 5 minutes dans les groupes recevant la L-DOPA ou le véhicule. Les rotations ipsilatérales ont été soustraites du nombre des rotations controlatérales. Les résultats montrés représentent les moyennes \pm les SEM de 6 à 9 souris. * $p < 0,05$ entre les souris Nur77+/+ et Nur77-/- selon une ANOVA pour mesures répétées (St-Hilaire et al., 2006).

Ces résultats nous ont permis, chez le rongeur :

- 1- de conforter le rôle moteur de Nur77 dans les neurones de la voie indirecte du striatum dorsal, que ce soit suite à une administration d'antipsychotiques ou un traitement de L-DOPA et son impacte potentiel en tant que facteur de transcription sur l'induction de l'ARNm de l'enképhaline et de la neurotensine peu importe le type de désordre dopaminergique.

2- de formuler deux nouvelles hypothèses impliquant Nur77 dans les phénomènes de sensibilisation et locomoteurs liés aux drogues d'abus et dans les phénomènes d'apprentissages impliquant les kinases ERK et PKC dans la ou les cascades de signalisation des récepteurs dopaminergiques D1/D2.

9. Hypothèses et objectifs du projet de recherche

9. 1. Première hypothèse de recherche : Nur77 et RXR jouent-ils un rôle dans les phénomènes de sensibilisation et moteurs liés à la consommation d'amphétamine?

Étant donné que ces changements moléculaires ont lieu dans le striatum dorsal qui est une région du striatum fortement associée aux fonctions motrices (Smith et al., 2004) est-ce que l'absence de Nur77 chez des souris knockout altérerait aussi l'activité locomotrice (striatum dorsal) et le seuil de sensibilisation (accumbens, striatum ventral) d'une drogue d'abus telle que l'amphétamine qui cible principalement les neurones D1 des structures dopaminergiques des ganglions de la base? De plus, quel serait l'impacte d'agonistes ou antagonistes des rétinoides dans les effets locomoteurs associés à l'amphétamine puisque nous avons vu que l'hétérodimère Nur77/RXR avait un rôle actif dans les effets secondaires moteurs des antipsychotiques et de la L-DOPA (chez le singe)? Enfin, l'amphétamine induit-elle aussi la transcription de l'ARNm de Nur77 et si oui dans quelle population neuronale? Dans les D1 comme la L-DOPA bien que l'effet de l'amphétamine soit indirecte par rapport à celui de la L-DOPA?

9. 1. 1. Objectifs de l'étude visant à tester l'hypothèse n°1

Objectif double de l'étude :

1- Soumettre des souris sauvages et Nur77 knockout à un protocole de sensibilisation à l'amphétamine afin de pouvoir déterminer une implication potentielle de Nur77 dans la sensibilisation aux drogues d'abus.

2- Tester différents agonistes ou antagonistes des rétinoides au sein de notre paradigme expérimental sur des souris sauvages et Nur77 -/- afin de pouvoir déterminer un impacte potentiel des rétinoides sur l'activité locomotrice induite par l'amphétamine comme c'est le cas pour les effets secondaires moteurs induits par les antipsychotiques (Ethier et al., 2004b) et la L-DOPA (Samadi et al., 2006b).

9. 2. Deuxième hypothèse de recherche : les kinases ERKs et PKCs jouent-elles un rôle dans l'induction de l'ARNm des Nurs via les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 *in vivo* au sein du striatum, du Nac, de la SN et de la VTA?

En effet, considérant que les kinases ERK et PKC sont les principales kinases incriminées dans les LIDs et la toxicomanie pour leur rôle dans les phénomènes d'apprentissage, est-ce que, les membres de la famille des NR4A dont nous commençons l'étude dans les phénomènes de drogues d'abus et dont nous avons bien établi l'implication dans les LIDs et les VCMs, sont sous le contrôle des ERK et de la PKC ? En outre, au vue des évidences scientifiques accumulées dans les LIDs et la toxicomanie, Nur77 aurait-il un rôle purement moteur et/ou d'apprentissage ce qui expliquerait peut être pourquoi, selon le contexte moléculaire neuronale, une même induction de Nur77 provoque des effets différents?

9. 2. 1. Objectifs de l'étude visant à tester l'hypothèse n°2

Objectifs triples de l'étude:

1- Activer spécifiquement, *in vivo*, les cascades de signalisations des récepteurs D1 et D2 par une combinaison d'agonistes D1 et D2 (un effet synergique sur les récepteurs D1 et D2 a été trouvé nécessaire à l'induction de Nur77 dans le striatum dans la voie D1 (St-Hilaire et al., 2003)) ou l'injection d'un antagoniste D2 spécifique.

- 2- Déterminer l'impacte d'une inhibition pharmacologique *in vivo* spécifique des kinases ERK ou PKC sur l'induction de l'ARNm des membres de la famille des Nurr (Nur77, Nurr-1 et Nor-1) dans le striatum, le noyau accumbens, la VTA et la substance noire par hybridation *in situ*.
- 3- Observer s'il existe des effets moteurs associés (catalepsies pour l'antagoniste D2 et l'activité locomotrice pour les agonistes D1/D2) à une perte de fonction de ces kinases.

Vous trouverez, dans la section résultats, au chapitre 2 le manuscrit de l'article du Dr Michel St-Hilaire qui fut la base de notre réflexion, aux chapitres 3 et 4 respectivement, les manuscrits des deux articles rapportant les résultats de la mise en application des objectifs et hypothèses de travail énoncés ci-dessus. Il s'agit de deux articles dont je suis le premier auteur en raison de ma participation active à l'élaboration, la mise en application et la récolte de tous les résultats qui feront l'objet d'un récapitulatif en première partie des chapitres discussion, conclusions de chacun des articles respectivement (Chapitre 6). Au chapitre 5 se trouvent des résultats non publiés sur l'implication de Nur77 en tant que facteur de transcription sur le promoteur de l'enképhaline en technique de CHIP.

En annexe se trouvent :

- 1- une section détaillée expliquant les mécanismes de LTP/LTD (annexe 1)
- 2- le « *research highlight* » paru dans *Nature Clinical Practice Neurology* à propos d'un article dont je suis le troisième auteur et qui représente une collaboration avec le laboratoire du Dr Cicchetti sur la maladie de Parkinson (Tremblay et al., 2006) (annexe 2).

Chapitre 2 : résultats du rôle de Nur77 dans la maladie de Parkinson

Article en collaboration avec le Dr St-Hilaire. Le Dr St-Hilaire est responsable de la conceptualisation, de l'élaboration et de la réalisation du protocole expérimental (stéréotaxie, lésion 6-OHDA, testes à l'apomorphine, traitements, injections de L-DOPA, sacrifices des souris, coupes des cerveaux. J'ai réalisé les expériences d'hybridation *in situ*, la collecte des résultats autoradiographiques et une partie des analyses statistiques. Les Drs Rouillard et Lévesques étant les directeurs des laboratoires.

IMPAIRED BEHAVIOR AND MOLECULAR ADAPTATIONS TO DOPAMINE DENERVATION AND REPEATED L-DOPA TREATMENT IN NUR77 KNOCKOUT MICE

Michel St-Hilaire^a, Emmanuelle Bourhis^a, Daniel Lévesque^{a,b} AND Claude Rouillard^{a,b}

^a Département de Médecine, Université Laval, Sainte-Foy, Québec, Canada

^b Centre de recherche en Neurosciences, CHUL, Sainte-Foy, Québec, Canada

Abbreviated title :

Number of pages: 32
Number of figures: 7
Number of tables: 0
Number of words in the whole manuscript: 7219
Number of words in the *Abstract*: 247
Number of words in the *Introduction*: 539

Correspondence to: Claude Rouillard, Ph.D.
Centre de recherche en Neurosciences
CHUL, RC-9800
2705 Boul. Laurier
Sainte-Foy (Québec)
Canada G1V 4G2
Phone: (418) 654-2152
FAX: (418) 654-2753

Acknowledgments: This study was supported by grants from the Parkinson Society of Canada and Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to C.R. and D.L.. M. St-H. holds a studentship and D.L. a scholarship from the *Fonds de la Recherche en Santé du Québec* (FRSQ).

Key words: Parkinson's disease, transgenic mice, L-DOPA, transcription factor, nuclear receptor, direct pathway, indirect pathway, dopamine receptor, enkephalin, dynorphin, neurotensin, D₃ receptor, *Nur77*, behavioural sensitization, rotational behaviour.

Abbreviations : 6-OHDA, 6-hydroxydopamine; cRNA, complementary RNA; DA, dopamine; DYN, dynorphin; ENK, enkephalin; NT, neurotensin; PD, Parkinson's disease; SNpc, substantia nigra pars compacta; StLR, lateral rim of the striatum; StMR, medial rim of the striatum; VTA, ventral tegmental area.

Abstract

We have previously shown that dopamine (DA) denervation and repeated L-DOPA treatment modulate the pattern of Nur77 mRNA expression in the striatum. However, the exact role of this nuclear receptor in L-DOPA-induced molecular and behavioural adaptations observed in animal models of Parkinson's disease is still unknown. In the present study, we investigated the effects of Nur77 gene deletion on the development of behavioural sensitization and on changes in the regulation of neuropeptides and DA D₃ receptor expression following DA denervation and repeated L-DOPA treatment in Nur77^{+/+} and Nur77^{-/-} hemiparkinsonian mice. One week postsurgery, hemiparkinsonian mice were treated with L-DOPA (10 mg/kg) plus benserazide (3 mg/kg) once a day for 7 days. Despite similar extents of nigrostriatal denervation, L-DOPA-induced rotational response was exacerbated in Nur77^{-/-} mice compared to Nur77^{+/+} ones. However, the rate of increase of the rotational behaviour after repeated L-DOPA injections was similar in the two mouse strains. Lesioning the nigrostriatal pathway increased enkephalin (ENK) and neurotensin (NT) mRNA levels in both mouse strains. However, the up-regulation of these neuropeptides was significantly reduced in Nur77^{-/-} mice. There was no difference in the modulation of D₃ receptor density and dynorphin (DYN) mRNA expression between the two mouse strains. The present results suggest that Nur77 is involved in setting the threshold level for L-DOPA-induced rotational behaviour, rather than controlling the development of behavioural sensitization. This specific behavioural change is associated with a selective regulation of neuropeptide expression specifically in the indirect striatal output pathway.

Introduction

Motor symptoms in Parkinson's disease (PD) result from the loss of dopamine (DA) neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc). Current treatments of this disease are aimed at alleviating the symptoms and rely mainly on DA replacement therapy using its precursor L-DOPA or DA agonists. Unfortunately, long-term L-DOPA treatment leads to the apparition of involuntary movements termed dyskinesias (Chase et al., 1993). In unilaterally 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-denervated rats, an animal model of PD (Ungerstedt & Arbuthnott, 1970), such unwanted side-effects are expressed as L-DOPA-induced contralateral turning behaviour, a response that worsens throughout repeated L-DOPA administration (Rouillard et al., 1987; Bordet et al., 1997). This phenomenon, known as behavioural sensitization, is associated with changes in gene expression in the brain. In fact, both the denervation process and the subsequent repeated L-DOPA treatment lead to distinct molecular adaptations. Lesion of the nigrostriatal pathway with the neurotoxin 6-OHDA induces enkephalin (ENK; Westin et al., 2001) as well as neurotensin (NT) up-regulation in neurons of the so-called indirect striatal output pathway (Castel et al., 1994; St-Hilaire et al., 2003, 2005) whereas repeated L-DOPA treatment in 6-OHDA-denervated animals induces dynorphin (DYN; Gerfen, 2000) as well as D₃ receptor overexpression in neurons of the direct striatal output pathway (Bordet et al., 1997; Bordet et al., 2000). It is thought that imbalance between the normal functioning of these two striatal output pathways could be responsible for the expression of involuntary behaviour such as dyskinesias (Gerfen, 2000).

FosB (Doucet et al., 1996; Andersson et al., 1999) and Nur77 (St-Hilaire et al., 2003; St-Hilaire et al., 2005) are among genes modulated by DA denervation and repeated L-DOPA treatment. Nur77 (also known as NGFI-B) is closely related to members of the steroid–thyroid hormone receptor family (Hazel et al., 1988; Milbrandt, 1988). Nur77 is constitutively expressed in target structures of dopaminergic

systems (Zetterström et al., 1996) and, as a transcription factor, could be a potential candidate for regulation of striatal molecular adaptations. The exact role of Nur77 in dopaminergic systems is still largely unknown. We have previously shown that basal striatal expression of Nur77 mRNA is evenly distributed between ENK- and DYN-containing neurons (St-Hilaire et al., 2003). Of particular interest, we have demonstrated that either the administration of a D₂ receptor antagonist or destruction of the nigrostriatal dopaminergic pathway produces a strong up-regulation of Nur77 in the striatum, mainly in ENK-containing cells (Beaudry et al., 2000; St-Hilaire et al., 2003). Moreover, repeated L-DOPA treatment in 6-OHDA-denervated rats further exacerbates the imbalance in the pattern of distribution of Nur77 by repressing its expression from DYN-positive cells, confining the presence of this nuclear receptor exclusively to ENK-containing cells (St-Hilaire et al., 2003). Using Nur77^{-/-} mice, we have recently shown that deletion of this gene greatly reduces haloperidol-induced catalepsy as well as up-regulation of ENK and NT induction (Éthier et al., 2004a). Interestingly, haloperidol-induced vacuous chewing movements, an animal model of neuroleptic-induced human tardive dyskinesia, are exacerbated in Nur77^{-/-} mice (Éthier et al., 2004b).

The aim of the present study was to investigate the effects of Nur77 gene deletion on the development and expression of L-DOPA-induced behavioural sensitization and on the modulation of striatal neuropeptides in a mouse model of PD (Lundblad et al., 2004).

Materials and methods

Animals

Nur77^{-/-} mice were initially developed by Dr J. Milbrandt's group at the University of Washington (St Louis, Missouri, USA; Lee et al., 1995). These mice are healthy and reproduce normally (Crawford et al. 1995; Lee et al., 1995). They were produced in a mixed background and have been backcrossed into the C57BL/6 strain for at least 10 generations to reduce background heterogeneity (J. Milbrandt, personal communication). Nur77^{-/-} and Nur77^{+/+} (C57BL/6) mice (Charles River, Canada; weighing 25–30 g) were housed three or four per cage in a temperature-controlled environment (22°C) and maintained under a 12-h light–dark cycle with ad libitum access to food and water. Mice handling was performed in accordance with the Canadian Guide for the Care and Use of Laboratory animals and all procedures were approved by the Institutional Animal Care Committee of Laval University. All efforts were made to minimize the number of animals used.

6-Hydroxydopamine lesions

Desipramine hydrochloride (25 mg/kg, s.c.) was administered as a pretreatment 10 min prior surgery in order to protect noradrenergic neurons from 6-OHDA toxicity. Surgery was performed under isoflurane anaesthesia (isoflurane 2%; O₂ 0.8 L/min; Zeneca Pharma, Canada) with mice placed in a stereotaxic frame. 6-OHDA was injected into the right striatum (from bregma: 0.5 mm anterior, 1.8 mm lateral; from dura mater: 2.9 mm ventral; Franklin & Paxinos, 2002). The neurotoxin 6-OHDA (2.5 µg/µL) was dissolved in saline (0.9% NaCl) containing ascorbic acid (0.1%) and injected at a rate of 1 µL/min for 4 min for a total of 10 µg of 6-OHDA per mouse. Following intrastriatal injection, the cannula was left in place for an additional 6 min to allow diffusion away from the cannula tip and to prevent backflow during retraction.

L-DOPA treatment

Seven days postsurgery, hemi-parkinsonian mice were randomly assigned to a group based on their genotype. Half of the $Nur77^{-/-}$ mice ($n = 6$) were repeatedly treated with L-DOPA and benserazide (10 mg / kg and 3 mg / kg, respectively, i.p.), once a day for 7 days. The other half of the $Nur77^{-/-}$ mice ($n = 6$) received vehicle injections (NaCl 0.9%, i.p.) instead of L-DOPA. We employed the same paradigm with $Nur77^{+/+}$ hemi-parkinsonian mice, i.e. six mice were repeatedly treated with L-DOPA and benserazide and nine were treated with the vehicle for 7 days. All mice were anesthetized with CO₂ and killed by decapitation 3 h following the last injection on the 7th day. Brains were then removed from the skull, rapidly immersed in cold isopentane and stored at -80°C until use.

Measurement of rotational behaviour

Rotational behaviour was measured on the 1st, 3rd, 5th and 7th days of the treatment. With the mouse placed in a rectangular plexiglass cage, the number of rotations in response to L-DOPA injections was manually counted during three different periods of 5 min. Quantifications were performed 20 min prior to the injection (-20 to -15 min period), then 10 min (10–15 min period) and 40 min (40–45 min period) after the administration of L-DOPA. Rotational behaviour was also assessed following administration of the vehicle. We used the average number of rotations from the periods 10–15 and 40–45 min to assess the development of behavioural sensitization throughout the 7-day L-DOPA treatment. Total ipsilateral rotations were always subtracted from total contralateral turns for each 5-min period before calculating group means.

In situ hybridization

Cryostat-cut brain sections (12 μm) were mounted on Snowcoat-X- tra™ slides (Surgipath, Winnipeg, MA, Canada). Probe synthesis and in situ hybridization procedures were performed according to our previous reports (Beaudry et al.,

2000; St-Hilaire et al., 2003; Éthier et al., 2004a). Specific [³⁵S]UTP-labelled complementary RNA (cRNA) probes were used to assess mRNA levels in brain sections. The cRNA probe for Nurr1 stems from a 403-bp EcoRI-BamHI fragment of the full length mouse Nurr1 cDNA, subcloned into pBluescript SK+ and linearized with Xba I (Lapointe et al., 2004; Cossette et al., 2004). Single-strand riboprobes, complementary to Nurr1 mRNA, were synthesized and labelled using Promega riboprobe kit (Promega, Madison, WI, USA), [³⁵S]UTP (Perkin Elmer Inc., Canada) and the RNA polymerase T7. The ENK probe (935 bp, from nucleotide -104 to 830) was generated from the linearized rat cDNA contained in pSP64 (antisense) and pSP65 (sense) plasmids (Yoshikawa et al., 1984). The ENK cDNA template was linearized with SacI restriction enzyme, and the antisense probe was synthesized with [³⁵S]UTP and SP6 RNA polymerase. For DYN mRNA precursor, a cloned fragment (356 bp, from nucleotide 390–747) was introduced into pGEM-4Z plasmid. The complementary single-strand RNA probe was synthesized with [³⁵S]UTP and T7 RNA polymerase. For NT mRNA precursor, a cloned fragment (357 bp, from nucleotide 421–778) was introduced into the same plasmid and the same polymerase was used to synthesize the complementary single-strand [³⁵S]UTP-labelled RNA probe. The hybridization technique was performed as previously described (Beaudry et al., 2000; St-Hilaire et al., 2003).

Binding assay

Striatal DA D₃ receptor density was evaluated with binding assay using [¹²⁵I] 7-hydroxy-PIPAT (specific activity: 2200 Ci / mmol; Dupont NEN, Guelph, ON, Canada; Lévesque et al., 1992; Burris et al., 1994). Briefly, slides were dried and then preincubated three times for 5 min each at room temperature in 50 mm 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulphonic acid buffer (HEPES; pH 7.5) containing 1 mm (ethylenedinitrilo) tetraacetic acid (EDTA) and 0.1% bovine serum albumin

(BSA). The sections were air-dried and then re-incubated in the same buffer containing 0.2 nM [¹²⁵I]7-hydroxy-PIPAT for 90 min at 22 °C. One micromolar dopamine was added to the above incubation buffer with some adjacent sections to estimate nonspecific binding. The slides were then rinsed three times in ice-cold HEPES buffer containing 100 mM NaCl. After a brief dipping into ice-cold distilled water, the slides were dried and apposed to BiomaxMR films (Kodak, New Haven, CT) for 3 days.

Sampling areas and quantification analysis

Nurr1 mRNA levels were measured in both the SNpc and the ventral tegmental area (VTA). ENK, DYN, NT mRNA labelling, as well as D3 receptor binding sites, were measured in the medial rim (StMR) and the lateral rim (StLR) of the striatum (Fig. 1). The choice of these sampling areas was prompted by the particular pattern of gene expression induced by L-DOPA in the denervated rat striatum (St-Hilaire et al., 2003) and is in respect to the anatomical distribution of cortico-striatal projections (McGeorge & Faull, 1989; Berendse et al., 1992; Willuhn et al., 2003). Levels of radioautographic labelling on films were quantified by computerized densitometry. Digitized brain images were obtained by a CCD camera model XC-77 (Sony) equipped with a 60 mm f/2.8D (Nikon) magnification lens. Images were analysed using the ImageJ software (Wayne Rasband, NIH). Optical densities of autoradiograms were transformed to $\mu\text{Ci/g}$ or nCi/g of tissue by the use of [¹⁴C] radioactivity standards (ARC146 A-¹⁴C standards; American Radiolabelled Chemicals Inc., St-Louis). The average level of labelling for each area was calculated from three adjacent brain sections of the same animals. Background intensities were subtracted from every measurement.

Statistical analysis

All data are expressed as group mean \pm SEM and statistical analysis were performed with 'StatView' (SAS Institute) program. For rotational activity, means

were compared using an analysis of variance (anova) for repeated measurements. In this case the effect of the factor treatment was analysed according to the repeated aspect of its administration (from day 1 to day 7) to assess the development of behavioural sensitization; the other factor was the presence or the absence of the Nur77 gene, allowing us to establish a possible interaction between the treatment and the genotype. For autoradiograms, statistical analysis was performed using a three-way (2 · 2 · 2) anova [Mouse genotype (Nur77^{+/+} vs. Nur77^{-/-}) hemisphere side (intact vs. lesioned) · treatment (vehicle vs. L-DOPA)]. When a significant interaction between two factors or more was reported, a Fisher's LSD test was performed as post hoc analysis.

Results

L-DOPA-induced rotational behaviour was exacerbated in Nur77^{-/-} mice

The validity of the unilateral 6-OHDA lesioned mouse, with the neurotoxin injected directly in the striatum, as an animal model of Parkinson's disease has been previously demonstrated. Unilateral 6-OHDA-lesioned mice express behavioural and cellular features of parkinsonism and L-DOPA-induced dyskinesias similar to those observed in rats (Lundblad et al., 2004). One week after unilateral intrastriatal 6-OHDA administration, all mice displayed spontaneous ipsilateral rotational activity without any difference between Nur77^{+/+} and Nur77^{-/-} mice (data not shown). Repeated administration of either vehicle (NaCl 0.9%) or L-DOPA (10 mg/kg) once a day for 7 days began at this time. In L-DOPA-treated animals, the number of contralateral turns (average rotations in two 5-min periods post L-DOPA injection) progressively increased from day 1 to day 7 in both mouse types (Fig. 2). Although the development of behavioural sensitization was not affected by Nur77 knockout, deletion of this gene significantly increased the number of L-DOPA-induced contra-lateral rotations compared to Nur77^{+ / +} animals. Statistical analysis (anova for repeated measures) revealed an effect of the factor treatment, demonstrating the presence of behavioural sensitization ($F_{1,10} = 5.558$, $P < 0.005$) coupled to an effect of the factor mouse type ($F_{3,30} = 5.348$, $P < 0.05$) without any interaction between these two factors ($F_{3,30} = 0.227$, $P = 0.8767$), indicating that the two patterns of behavioural sensitization are in fact parallel but with an upward shift for Nur77^{- / -} mice. Vehicle-treated mice displayed an ipsilateral turning behaviour without any difference between strains of mice (Fig. 2).

Similar extent of denervation in Nur77^{+ / +} and Nur77^{- / -} mice

To make sure that differences observed between Nur77^{+ / +} and Nur77^{- / -} mice were not due to heterogeneity in the extent of DA denervation between mouse types, we performed in situ hybridization for Nurr1 mRNA at the level of the

SNpc. Radiolabelling of Nurr1 mRNA, a nuclear receptor essential for the development and survival of midbrain dopaminergic neurons (Saucedo-Cardenas et al., 1998), has the advantage over tyrosine hydroxylase immunohistochemistry of allowing a more accurate quantification of the denervation (Lapointe et al., 2004; Tremblay et al., 2005) while labelling the same cells (Backman et al., 1999). Fourteen days following administration of 6-OHDA, Nurr1 mRNA levels in the SNpc indicated that DA denervation was complete and equivalent in Nur77^{+/+} and Nur77^{-/-} mice (anova: hemisphere side, F_{1,46} = 92.414, P < 0.0001; mouse genotype, F_{1,46} = 0.234, P = 0.6312; interaction, F_{1,46} = 0.031, P = 0.8611; Fig. 3). Interestingly, on the intact side, repeated L-DOPA administration increased Nurr1 mRNA levels (anova: treatment, F_{1,46} = 11,522, P < 0.005; interaction treatment · hemisphere side, F_{1,46} = 3.995, P = 0.0516; Fig. 3). Post hoc analysis confirmed this observation (P < 0.01 and P < 0.05 for Nur77^{+/+} and Nur77^{-/-} mice, respectively; Fig. 3). The extent of denervation in the VTA was smaller than in the SNpc. Moreover, the three-way anova revealed an interaction between the factors hemisphere side and mouse type (F_{1,46} = 4.34, P < 0.05). Post hoc analysis showed that repeated L-DOPA treatment increased Nurr1 mRNA levels on the intact side of both mouse types (P < 0.01 and P < 0.05 for Nur77^{+/+} and Nur77^{-/-} mice, respectively), but also on the lesioned side of Nur77^{-/-} animals (P < 0.01; Fig. 3).

Complete loss of L-DOPA-induced ENK regulation in Nur77^{-/-} hemiparkinsonian mice

ENK up-regulation following DA denervation is one of the most constant striatal adaptative mechanism reported in the literature (Westin et al., 2001; St-Hilaire et al., 2003; St-Hilaire et al., 2005). In Nur77^{+/+} animals, ENK mRNA levels were substantially up-regulated in the striatum after dopaminergic denervation. This ENK up-regulation occurred both at the StMR and StLR striatal levels (Fig. 4). Interestingly, deletion of Nur77 gene significantly reduced ENK mRNA up-

regulation in the StMR ($P < 0.01$ when compared to Nur77^{+/+}). Nonetheless, lesion-induced ENK mRNA up-regulation still reached statistical significance in Nur77^{-/-} animals (StMR, $P < 0.05$; StLR, $P < 0.05$). In Nur77^{+/+} mice, a 7-day L-DOPA treatment brought ENK mRNA levels back to prelesion values (StMR, $P < 0.0001$; StLR, $P < 0.01$) whereas it had no effect in Nur77^{-/-} mice (Fig. 4).

Lesion-induced NT mRNA up-regulation was greatly reduced in Nur77^{-/-} mice

Following DA denervation or administration of a D2 receptor antagonist, striatal NT mRNA is up-regulated in neurons coexpressing Nur77 and ENK mRNAs (Beaudry et al., 2000; St-Hilaire et al., 2003; St-Hilaire et al., 2005). Recently, we have also shown that haloperidol-induced striatal NT mRNA up-regulation is severely attenuated in Nur77^{-/-} mice (Éthier et al., 2004a). In the present investigation, striatal NT mRNA was up-regulated following denervation but with smaller changes in Nur77^{-/-} animals than in Nur77^{+/+} (anova: interaction mouse type · hemisphere side, $F_{1,46} = 3.897$, $P = 0.0544$; post hoc comparison: $P < 0.0001$ and $P < 0.01$ when comparing Nur77^{-/-} to Nur77^{+/+} Fig. 5). In mice receiving repeated L-DOPA administration, NT mRNA levels in the lesioned striatum were also down-regulated, bringing them back towards prelesion values. This was only the case for Nur77^{+/+} mice as we observed a substantial reduction in L-DOPA-induced NT regulation in the denervated striatum of Nur77^{-/-} mice, in both StMR and StLR.

Nur77 gene deletion had no effect on L-DOPA-induced striatal DYN up-regulation

In hemiparkinsonian rats, repeated L-DOPA administration leads to an up-regulation of DYN mRNA in the denervated striatum, a phenomenon closely associated with the development of behavioural sensitization (Cenci et al., 1998; Andersson et al., 1999; St-Hilaire et al., 2005). In the mouse model used here, DYN mRNA levels were strongly up-regulated in the striatum 3 h following the last injection of L-DOPA (anova interaction, treatment · hemisphere side: StMR. $F_{1,46} = 6.573$, P

< 0.05 ; StLR, $F_{1,46} = 33.324$, $P < 0.0001$; Fig. 6). This effect was more prominent in the StLR (post hoc comparison: Nur77^{+/+}, $P < 0.0001$; Nur77^{-/-}, $P < 0.0001$ when compared to the lesioned side of vehicle-treated animals), a region of the striatum closely linked to motor function (Smith et al., 2004). There was no difference between Nur77^{+/+} and Nur77^{-/-} animals. Accordingly, the three-way anova did not report any effect of the factor mouse type nor any interaction with the other factors.

Nur77 gene deletion had no effect on denervation-induced striatal D3 up-regulation

As previously reported in rats (Lévesque et al., 1995; Bordet et al., 1997), DA denervation in mice led to a significant decrease in striatal D3 receptor binding levels. Interestingly, there was no difference between Nur77^{+/+} and Nur77^{-/-} animals when comparing levels of D3 receptor binding in the denervated striatum (Fig. 7). However, D3 receptor binding levels from the intact striatum were significantly lower in Nur77^{-/-} mice than in Nur77^{+/+} (StMR, $P < 0.005$; StLR, $P < 0.0001$). Repeated L-DOPA treatment had no effect on D3 receptor binding levels, either in the intact or in the lesioned striatum (anova: treatment, $F_{1,30} = 3.759$, $P = 0.0620$).

Discussion

Findings from our study give new insights in the neurobiology of L-DOPA-induced involuntary movements. We first demonstrated an increase in the behavioural response to L-DOPA in *Nur77*^{-/-} hemiparkinsonian mice compared to *Nur77*^{+/+} animals. We have also shown that *Nur77* gene deletion does not impair the development of L-DOPA-induced behavioural sensitization, suggesting that this transcription factor is rather involved in setting the threshold level for L-DOPA-induced involuntary movements. Interestingly, deletion of the *Nur77* gene alters lesion-induced molecular adaptations specifically in the indirect striatal output pathway (ENK and NT mRNAs), whereas markers of the direct pathway (DYN mRNA and D3 receptors) are not affected by *Nur77* knockout. We hypothesize that *Nur77* could fulfil the role of a regulating factor for the normal expression of molecular adaptations in the indirect striatal output pathway following DA denervation. Its absence would then exacerbate an imbalance between striatal output pathways, leading to worsening of L-DOPA-induced uncontrolled motor behaviour without influencing the development of behavioural sensitization which has been closely associated with changes in gene expression in the direct striatal output pathway (Cenci et al., 1998; Andersson et al., 1999; St-Hilaire et al., 2003, 2005).

Alterations in ENK and NT regulation in *Nur77*^{-/-} are associated with an increased sensitivity to L-DOPA-induced rotational behaviour.

Changes in neuropeptide expression are thought to represent an attempt of the system to compensate for striatal DA depletion (Bezard et al., 2003). According to this model, ENK up-regulation is a mechanisms taking place to compensate for the loss of tonic dopamine input in the striatum (Bezard et al., 2003). Here, we show that *Nur77* deletion significantly reduced ENK and NT up-regulations following DA denervation. It is noteworthy that re-introducing DA in the striatum through L-DOPA administration brought ENK and NT mRNA levels back towards prelesion values in *Nur77*^{+/+} but not in *Nur77*^{-/-} mice. This suggests that DA-mediated

ENK and NT regulation is strongly altered following the deletion of the Nur77 gene. The effects of L-DOPA reported here in 6-OHDA-treated mice are at odds with the effects of the same treatment in 6-OHDA-treated rats (St-Hilaire et al., 2003), where ENK levels were also up-regulated by denervation but unchanged by repeated L-DOPA treatment. Three different factors might explain this fact: (i) species differences (mouse vs. rat); (ii) intrastriatal administration of 6-OHDA in the mouse vs administration in the median forebrain bundle lesion in the rat; and (iii) L-DOPA doses (10 mg/kg in the mouse and 50 mg/kg in the rat). We think the latter is most likely to account for this apparent discrepancy. The choice of the dose of L-DOPA was based on data in the literature (Lundblad et al., 2004) and on unpublished observations from our laboratory showing that doses > 10 mg/kg in 6-OHDA-lesioned mice led to a rotational response so large at the initiation of L-DOPA treatment that it did not allow subsequent sensitization of that response.

Although no differences were observed between Nur77^{+/+} and Nur77^{-/-} mice in regard to the number of lesion-induced ipsilateral rotations, the increased contralateral rotational response seen after the first administration of L-DOPA in Nur77^{-/-} mice argues in favour of an increased sensitivity to DA denervation in these mice. This increased effect in Nur77^{-/-} mice was maintained throughout the repeated treatment with L-DOPA. This effect is not due to a difference in the extent of DA denervation as we demonstrated in both mouse types a complete disappearance of Nurr1 mRNA expression in the SNpc. Interestingly, there was a significant increase of Nurr1 mRNA levels in the SNpc and VTA on the intact side following repeated L-DOPA administration in both Nur77^{+/+} and Nur77^{-/-} mice. This clearly demonstrates that, although Nurr1 mRNA levels are normally quite high in these structures, DA drugs are able to further increase its expression. However, the exact mechanism is difficult to pinpoint as we have previously shown that antipsychotics, which are DA antagonists, also increase Nurr1 mRNA in the SNpc-VTA complex. It is noteworthy that L-DOPA also increases Nur77 mRNA expression on the intact side of 6-OHDA-lesioned rats (St-Hilaire et al., 2003).

Additional research is needed to explore by which mechanisms L-DOPA can alter *Nurr1* and *Nur77* expression on the intact side and what are the consequences of these increases.

Our results on neuropeptide mRNA expression suggest an almost complete loss of DA-dependant regulation of ENK and NT expression in the indirect output pathway in *Nur77*^{-/-} mice. The lack of an appropriate response to DA replacement therapy in this neuronal population could contribute to the worsening of undesirable motor fluctuations of the treatment. In support of this hypothesis, we have previously demonstrated that hemiparkinsonian *ENK*^{-/-} mice display the same pattern of hypersensitivity to L-DOPA administration as observed in *Nur77*^{-/-} mice (Rouillard, 2004). There is much evidence in the literature for a positive correlation between levels of striatal ENK expression and the intensity of L-DOPA-induced dyskinesias in humans and monkeys (Calon et al., 2000, 2002). However, we hypothesize that the increased level of ENK is rather a compensatory mechanism and a more or less successful attempt of the system to dampen the effects of DA input removal. This is supported by the fact that ENK levels are up-regulated by the denervation but unaffected by subsequent pharmacological treatments (Westin et al., 2001). Viewing ENK up-regulation as a consequence rather than a cause of L-DOPA-induced dyskinesias is also in accordance with recent observations in MPTP monkeys revealing that an opioid antagonist worsens the dyskinetic response to dopaminergic stimulation rather than preventing it (Samadi et al., 2003, 2004, 2005a,b), whereas an opioid agonist decreases the dyskinetic response to DA agonists (Samadi et al., 2004). Therefore, a reduced up-regulation of ENK in *Nur77*^{-/-} mice, i.e. a reduced compensatory mechanism, might explain their increased rotational behaviour.

Although regulation of NT mRNA expression closely parallel that of ENK, its exact implication in L-DOPA-induced rotational behaviour is not clear. We have previously shown in rats that repeated L-DOPA administration significantly up-

regulated its expression in the denervated striatum, but selectively in DYN-containing cells rather than in ENK neurons (St-Hilaire et al., 2003; St-Hilaire et al., 2005). However, we show here that it is down-regulated by the same treatment. A plausible explanation for this apparent discrepancy may rely again on the dose of L-DOPA used in the present study. The dose used in mice in the present study is five to ten times lower than the dose used in rats in similar experiments (Bordet et al., 1997; St-Hilaire et al., 2003, 2005). The 10 mg/kg dose of L-DOPA in mice would have been successful in decreasing NT levels in the indirect pathway but not sufficient to produce the huge D1-dependent NT up-regulation in the direct pathway previously reported (St-Hilaire et al., 2005).

Development of L-DOPA-induced behavioural sensitization and DYN overexpression are not altered by Nur77 deletion

We demonstrate that Nur77 gene deletion exacerbates L-DOPA- induced turning behaviour without affecting either the development of behavioural sensitization or the overexpression of DYN. This is consistent with the idea that, in a DA-denervated striatum, a supersensitive form of D1-mediated neuronal plasticity could be responsible for the progressive exacerbation of involuntary movements caused by chronic DA replacement therapy (Gerfen, 2000), a process relying on a switch in receptor-mediated signal transduction (Gerfen et al., 2002). Accordingly, we have recently shown that, in unilaterally denervated rats, repeated L-DOPA treatment induces neuropeptide up-regulation in the direct striatal output pathway through a D1-dependant mechanism (St-Hilaire et al., 2005). Interestingly, these changes in neuropeptide expression are associated with a selective down-regulation of Nur77 mRNA expression in this same neuronal population (St-Hilaire et al., 2003). Therefore, it is not surprising that Nur77 knockout is without consequence on L-DOPA- induced DYN up-regulation and on the development of behavioural sensitization.

D3 receptor overexpression in striatal cells is another consequence of repeated L-DOPA treatment following denervation that has been proposed as a mechanism of

behavioural sensitization (Bordet et al., 1997). Once again these changes occur mainly in D1-containing medium spiny neurons (Surmeier et al., 1996; Bordet et al., 2000). However, in the hemiparkinsonian mouse model used here, the small increase in L-DOPA-induced D3 receptor expression in the denervated striatum did not reach statistical significance. This suggests that striatal ectopic D3 receptor expression may not be an essential condition for the development of behavioural sensitization in this model. D3 receptor binding levels following repeated L-DOPA administration were still significantly lower on the lesioned side than on the intact side. This observation was true for Nur77^{+/+} and Nur77^{-/-} animals as no differences between mouse types were reported in the denervated striatum, either pre- or post-treatment. It then appears that, following DA denervation, Nur77 is not implicated in the regulation of D3 receptor expression, further confirming its specificity to D2- rather than D1-mediated signal transduction in this experimental paradigm.

Nur77 as a postsynaptic regulator of the DA signal

Numerous findings from our laboratory suggest that Nur77 is closely and specifically coupled to D2 receptor signalling pathways in the striatum although it is expressed in both output pathways in basal conditions. First, we have shown that this DA receptor subtype is up-regulated in the striatum of Nur77^{-/-} mice (Éthier et al., 2004a). We suggest that this represents a compensatory mechanism to make up for alterations in D2 receptor signalling. Second, we have also shown that ENK and NT up-regulation induced by the acute administration of haloperidol, a D2 receptor antagonist, is greatly attenuated by Nur77 gene deletion (Éthier et al., 2004a). As previously reported, ENK, NT and Nur77 mRNA are all coexpressed in the same neurons following the administration of a D2 antagonist (Beaudry et al., 2000). Third, we demonstrate here a complete loss of ENK and NT regulation through DA stimulation in the denervated striatum of Nur77^{-/-} mice. Given the high level of coexpression of these neuropeptides

together (St-Hilaire et al., 2005) and with D2 receptors (Le Moine & Bloch, 1995; Surmeier et al., 1996), as well as the D2-dependant regulation of ENK expression in the denervated striatum (Henry et al., 1999; Tel et al., 2002), it could be rightly assert that some part of D2 receptor function is lost following the deletion of the Nur77 gene. The molecular basis of Nur77 dependent regulation of ENK and NT is unknown at this moment. No response element is clearly identified as a potent DNA binding site for Nur77 as homodimer on ENK or NT promoters. However, a retinoic acid receptor element (RARE) located downstream of the transcription start site has been identified on the ENK promoter (Chan et al., 1997). This RARE is a direct repeat (DR-1) element and Nur77 can bind the half-site of the DR (Wilson et al., 1991) or to DR-5 repeats when heterodimerized with the retinoic X receptor (RXR; Perlmann & Jansson, 1995). Interestingly, RXR is a potent heterodimerizing partner of Nur77 and we have shown that their coexpression in striatal cells is strongly increased following haloperidol administration (Éthier et al., 2004a).

In conclusion, we have demonstrated that Nur77, a transcription factor belonging to the nuclear receptor superfamily, plays a fundamental role in the regulation of behavioural and molecular adaptations taking place in the striatum as a result of DA denervation and subsequent L-DOPA replacement therapy. Interestingly, knocking out the Nur77 gene appears to specifically impair adaptive changes in the indirect striatal output pathway, leaving unaltered modifications in gene expression in the direct output pathway. These molecular changes are not associated with the development of behavioural sensitization following repeated L-DOPA but rather with the establishment of a threshold set-point for the expression of L-DOPA-induced locomotor behaviours. These results reassess the importance of the indirect pathway in L-DOPA-induced motor fluctuations and bring to light the possibility of improving PD treatments by targeting the function of Nur77.

References

- Andersson, M., Hilbertson, A. & Cenci, M.A. (1999) Striatal fosB expression is causally linked with 1-DOPA-induced abnormal involuntary movements and the associated upregulation of striatal prodynorphin mRNA in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.*, 6, 461–474.
- Backman, C., Perlmann, T., Wallen, A., Hoffer, B.J. & Morales, M. (1999) A selective group of dopaminergic neurons express Nurr1 in the adult mouse brain. *Brain Res.*, 851, 125–132.
- Beaudry, G., Langlois, M.-C., Weppe, I., Rouillard, C. & Lévesque, D. (2000) Contrasting patterns and cellular specificity of transcriptional regulation of the nuclear receptor Nerve Growth Factor-inducible B by haloperidol and clozapine in the rat forebrain. *J. Neurochem.*, 75, 1694–1702.
- Berendse, H.W., Galis-de Graaf, Y. & Groenewegen, H.J. (1992) Topographical organisation and relationship with ventral striatal compartments of prefrontal corticostriatal projections in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 316, 314–347.
- Bezard, E., Gross, C.E. & Brotchie, J.M. (2003) Presymptomatic compensation in Parkinson's disease is not dopamine-mediated. *Trends Neurosci.*, 26, 215–221.
- 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. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 94, 3363–3367.
- Bordet, R., Ridray, S., Schwartz, J.C. & Sokoloff, P. (2000) Involvement of the direct striatonigral pathway in levodopa-induced sensitization in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Eur. J. Neurosci.*, 12, 2117–2123.
- Burris, K.D., Filtz, T.M., Chumpradit, S., Kung, M.P., Foulon, C., Hensler, J.G., Kung, H.F. & Molinoff, P.B. (1994) Characterization of [¹²⁵I]-trans-7-hydroxy-2-[N-propyl-N-(3*β*-iodo-2*β*-propenyl)amino]tetralin binding to dopamine D3 receptors in rat olfactory tubercle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 268, 935–942.
- Calon, F., Birdi, S., Rajput, A.H., Hornykiewicz, O., Bédard, P.J. & Di Paolo, T. (2002) Increase of preproenkephalin mRNA levels in the putamen of Parkinson

- disease patient with levodopa-induced dyskinesia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 61, 186–196.
- Calon, F., Grondin, R., Morissette, M., Goulet, M., Blanchet, P.J., Di Paolo, T. & Bédard, P.J. (2000) Molecular basis of levodopa-induced dyskinesias. *Ann. Neurol.*, 47, S70–S78.
- Castel, M.-N., Morino, P., Nylander, I., Terenius, L. & Hö kfelt, T. (1994) Differential dopaminergic regulation of the neurotensin striatonigral and striatopallidal pathways in the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 262, 1–10.
- Cenci, M.A., Lee, C.S. & Bjorklund, A. (1998) L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA. *Eur. J. Neurosci.*, 10, 2694–2706.
- Chan, R.M., Stewart, M.J. & Crabb, D.W. (1997) A direct repeat (DR-1) element in the first exon modulates transcription of the preproenkephalin A gene. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 45, 50–58.
- Chase, T.N., Mouradian, M.M. & Engber, T.M. (1993) Motor response complications and the function of striatal efferent systems. *Neurology*, 43, S23–S27.
- Cossette, M., Parent, A. & Lévesque, D. (2004) Tyrosine hydroxylase-positive neurons intrinsic to the human striatum express the transcription factor Nurr1. *Eur. J. Neurosci.*, 20, 2089–2095.
- Crawford, P.A., Sadovsky, Y., Woodson, K., Lee, S.L. & Milbrandt, J. (1995) Adrenocortical function and regulation of the steroid 21-hydroxylase gene in NGFI-B-deficient mice. *Mol. Cell Biol.*, 15, 4331–4316.
- Doucet, J.P., Nakabeppu, Y., Bedard, P.J., Hope, B.T., Nestler, E.J., Jasmin, B.J., Chen, J.S., Iadarola, M.J., St Jean, M., Wigle, N., Blanchet, P., Grondin, R. & Robertson, G.S. (1996) Chronic alterations in dopaminergic neurotransmission produce a persistent elevation of deltaFosB-like protein(s) in both the rodent and primate striatum. *Eur. J. Neurosci.*, 8, 365–381.
- Éthier, I., Beaudry, G., St-Hilaire, M., Milbrandt, J., Rouillard, C. & Lévesque, D. (2004a) The transcription factor NGFI-B (Nur77) and retinoids play a critical role

in acute neuroleptic-induced extrapyramidal effect and neuropeptide gene expression. *Neuropsychopharmacology*, 29, 335–346.

Éthier, I., Kagechika, H., Shudo, K., Rouillard, C. & Lévesque, D. (2004b) Docosahexaenoic acid reduces haloperidol-induced dyskinesias in mice: Involvement of Nur77 and retinoid receptors. *Biol. Psych.*, 56, 522–526.

Franklin, K.B.J. & Paxinos, G. (2002) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego.

Gerfen, C.R. (2000) Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways. *Trends Neurosci.*, 23, S64–S70.

Gerfen, C.R., Miyachi, S., Paletzki, R. & Brown, P. (2002) D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum results from a switch in the regulation of ERK1/2/MAP kinase. *J. Neurosci.*, 22, 5042–5054.

Hazel, T.G., Nathans, D. & Lau, L.F. (1988) A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 85, 8444–8448.

Henry, B., Crossman, A. & Brotchie, J. (1999) Effect of repeated L-DOPA, bromocriptine, or lisuride administration on preproenkephalin-A and preproenkephalin-B mRNA levels in the striatum of the 6-hydroxydopamine-lesioned rat. *Exp. Neurol.*, 155, 204–220.

Lapointe, N., St-Hilaire, M., Martinoli, M.-G., Blanchet, J., Gould, P., Rouillard, C. & Cicchetti, F. (2004) Rotenone induced non-specific central nervous system and systemic toxicity. *FASEB J.*, 18, 717–719.

Le Moine, C. & Bloch, B. (1995) D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: Sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J. Comp. Neurol.*, 355, 418–426.

Lee, S.L., Wesselschmidt, R.L., Linette, G.P., Kanagawa, O., Russell, J.H. & Milbrandt, J. (1995) Unimpaired thymic and peripheral T cell death in mice lacking the nuclear receptor NGFI-B (Nur77). *Science*, 269, 532–535.

- Lévesque, D., Diaz, J., Pilon, C., Martres, M.P., Giros, B., Souil, E., Schott, D., Morgat, J.L., Schwartz, J.C. & Sokoloff, P. (1992) Identification, characterization, and localization of the dopamine D3 receptor in rat brain using 7-[3H] hydroxy-N,N-di-n-propyl-2-aminotetralin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 89, 8155–8159.
- Lévesque, D., Martres, M.-P., Diaz, J., Griffon, N., Lammers, C.H., Sokoloff, P. & Schwartz, J.-C. (1995) A paradoxical regulation of the dopamine D3 receptor expression suggests the involvement of an anterograde factor from dopamine neurons. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 92, 1719–1723.
- Lundblad, M., Picconi, B., Lindgren, H. & Cenci, M.A. (2004) A model of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned mice: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiol. Dis.*, 16, 110–123.
- McGeorge, A.J. & Faull, R.L.M.K. (1989) The organisation of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience*, 29, 503–537.
- Milbrandt, J. (1988) Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. *Neuron*, 1, 183–188.
- Perlmann, T. & Jansson, L. (1995) A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev.*, 9, 769–782.
- Rouillard, C., Bédard, P.J., Falardeau, P. & Di Paolo, T. (1987) Behavioral and biochemical evidence for different effect of repeated administration of L-Dopa and bromocriptine on denervated versus non-denervated striatal dopamine receptors. *Neuropharmacology*, 26, 1601–1606.
- Rouillard, C., St-Hilaire, M., Hodler, C., Paquet, B., Gilbert, F., Drolet, G. & Lévesque, D. (2004) Enkephalin KO mice have an increased sensitivity to denervation and repeated L-DOPA but do not show behavioural sensitization after repeated treatment with amphetamine. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 30, 562.2.
- Samadi, P., Grégoire, L. & Bédard, P.J. (2003) Opioid antagonists increase the dyskinetic response to dopaminergic agents in parkinsonian monkeys: interaction between dopamine and opioid systems. *Neuropharmacology*, 45, 954–963.

- Samadi, P., Grégoire, L. & Bédard, P.J. (2004) The opioid agonist morphine decreases the dyskinetic response to dopaminergic agents in parkinsonian monkeys. *Neurobiol. Dis.*, 16, 246–253.
- Samadi, P., Grégoire, L., Hadj Tahar, A., Di Paolo, T., Rouillard, C. & Bédard, P.J. (2005a) Naltrexone in the short-term decreases antiparkinsonian response to 1-Dopa and in the long-term increases dyskinesias in drug-naive parkinsonian monkeys. *Neuropharmacology*, 49, 165–173.
- Samadi, P., Grégoire, L., Rouillard, C. & Bédard, P.J. (2005b) Dyskinesias occur in response to saline and naltrexone alone after priming with combination of dopaminergic agents and naltrexone in the MPTP parkinsonian monkeys. *Neurobiol. Dis.*, 19, 266–272.
- Saucedo-Cardenas, O., Quintana-Hau, J.D., Le, W.D., Smidt, M.P., Cox, J.J., De Mayo, F., Burbach, J.P. & Conneely, O.M. (1998) Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 95, 4013–4018.
- Smith, Y., Raju, D.V., Pare, J.F. & Sidibe, M. (2004) The thalamostriatal system: a highly specific network of the basal ganglia circuitry. *Trends Neurosci.*, 27, 520–527.
- St-Hilaire, M., Landry, É., Lévesque, D. & Rouillard, C. (2003) Denervation and repeated L-DOPA induce a coordinate expression of the transcription factor NGFI-B in striatal projection pathways in hemi-parkinsonian rats. *Neurobiol. Dis.*, 14, 98–109.
- St-Hilaire, M., Landry, É., Lévesque, D. & Rouillard, C. (2005) Denervation and repeated 1-DOPA induce complex regulatory changes in neurochemical phenotypes of striatal neurons: Implication of a dopamine D1-dependent mechanism. *Neurobiol. Dis.*, 20, 450–460.
- Surmeier, D.J., Song, W.J. & Yan, Z. (1996) Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *J. Neurosci.*, 16, 6579–6591. Tel, B.C., Zeng, B.-Y., Cannizzaro, C., Pearce, R.K.B., Rose, S. & Jenner, P. (2002)

Alteration in striatal neuropeptide mRNA produced by repeated administration of L-DOPA, ropinirole or bromocriptine correlate with dyskinesia induction in MPTP-treated common marmosets. *Neuroscience*, 115, 1047–1058.

Tremblay, M.-É., Saint-Pierre, M., Bourhis, E., Lévesque, D., Rouillard, C. & Cicchetti, F. (2005) Neuroprotective effects of cystamine in aged parkinsonian mice. *Neurobiol. Aging*, 27, 862–870.

Ungerstedt, U. & Arbuthnott, G.W. (1970) Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.*, 24, 485–493.

Westin, J.E., Andersson, M., Lundblad, M. & Cenci, M.A. (2001) Persistent changes in striatal gene expression induced by long term L-DOPA treatment in a rat model of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.*, 14, 1171–1176.

Wilson, T.E., Fahrner, T.J., Johnston, M. & Milbrandt, J. (1991) Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science*, 252, 1296–1300.

Willuhn, I., Sun, W. & Steiner, H. (2003) Topography of cocaine-induced gene regulation in the rat striatum: relationship to cortical inputs and role of behavioural context. *Eur. J. Neurosci.*, 17, 1053–1066.

Yoshikawa, K., Williams, C. & Sabol, S.L. (1984) Rat brain preproenkephalin mRNA. cDNA cloning, primary structure, and distribution in the central nervous system. *J. Biol. Chem.*, 259, 14301–14308.

Zetterström, R.H., Williams, R., Perlmann, T. & Olson, L. (1996) Cellular expression of the immediate early transcription factors Nurr1 and NGFI-B suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system. *Mol. Brain Res.*, 41, 111–120.

Figures

Figure 1.

Schematic representation of mouse forebrain areas selected for quantitative analysis of striatal gene expression. Specific brain areas sampled are shown as hatched boxes. StMR, medial rim of the striatum; StLR, lateral rim of the striatum.

Figure 2.

Effect of the deletion of Nur77 gene on vehicle- and L-DOPA-induced contralateral turning behaviour in hemi-parkinsonian mice. Rotational behaviour was manually counted over two 5-min periods (10–15 min and 40–45 min) following the 1st, 3rd, 5th and 7th L-DOPA administration. The graph shows the average number of contralateral rotations per 5 min in the groups receiving L-DOPA or vehicle. Ipsilateral rotations were subtracted from contralateral rotations. Results shown represent means \pm SEM from $n = 6-9$ animals. * $P < 0.05$ between Nur77^{+/+} and Nur77^{-/-} mice according to an anova for repeated measurements.

Figure 3.

Effects of 6-OHDA-induced dopamine depletion on Nurr1 mRNA levels in the midbrain in Nur77^{+/+} and Nur77^{-/-} mice. (A) Representative autoradiograms showing Nurr1 mRNA levels in the SNpc and VTA of both hemiparkinsonian mouse types. (B) Histograms depicting Nurr1 mRNA quantification in both the SNpc and VTA. Results shown represent means \pm SEM from $n = 6-9$ animals. Statistical comparisons between groups were performed using a three-way anova, followed by a Fisher's LSD test when required. *** $P < 0.0001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ when compared to the corresponding side from the same mouse type receiving the same treatment; ^{ad} $P < 0.01$, ^a $P < 0.01$ when compared to the same side of vehicle-treated animals from the same mouse type; ^u $P < 0.01$ when compared to the lesioned side of Nur77^{+/+} mice treated with L-DOPA.

Figure 4.

Complete loss of L-DOPA-induced ENK regulation in Nur77^{-/-} hemiparkinsonian mice. (A) Representative autoradiograms showing striatal ENK mRNA levels in

Nur77^{+/+} and Nur77^{-/-} mice. (B) Histograms depicting ENK mRNA levels quantified in the medial rim (StMR) and lateral rim (StLR) of the striatum. Results shown represent means \pm SEM from n = 6–9 animals. Statistical comparisons between groups were performed using a three-way anova, followed by a Fisher's LSD test when required. ***P < 0.0001, *P < 0.05 when compared to the intact side from the same mouse type receiving the same treatment; ****P < 0.0001, **P < 0.01 when compared to the lesioned side from the same mouse type receiving the vehicle; ††P < 0.01 when compared to the lesioned side of Nur77^{+/+} mice treated with the vehicle.

Figure 5.

Up-regulation of striatal NT by 6-OHDA denervation was greatly reduced in Nur77^{-/-} mice. (A) Representative autoradiograms showing striatal NT mRNA levels in both Nur77^{+/+} and Nur77^{-/-} mice after unilateral dopamine depletion with or without dopamine replacement therapy. (B) Histograms depicting NT mRNA quantification in the StMR and the StLR. Results shown represent means \pm SEM from n = 6–9 animals. Statistical comparisons between groups were performed using a three-way anova, followed by a Fisher's LSD test when required. ***P < 0.0001, *P < 0.05 when compared to the intact side from the same mouse type receiving the same treatment; ****P < 0.0001, †P < 0.05 when compared to the lesioned side from the same mouse type receiving the vehicle; †††P < 0.0001, ††P < 0.01 when compared to the lesioned side of Nur77^{+/+} mice treated with the vehicle.

Figure 6.

Nur77 gene deletion had no effect on L-DOPA-induced striatal DYN up-regulation. (A) Representative autoradiograms showing striatal DYN mRNA levels in both Nur77^{+/+} and Nur77^{-/-} mice. (B) Histograms depicting DYN mRNA levels quantified in the medial rim (StMR) and lateral rim (StLR) of the striatum. Results shown represent means \pm SEM from n = 6–9 animals. Statistical comparisons between groups were performed using a three-way anova, followed by a Fisher's

LSD test when required. ***P < 0.0001, *P < 0.05 when compared to the intact side from the same mouse type receiving the same treatment.

Figure 7.

Knocking out the Nur77 gene had no effect on denervation-induced striatal D₃ receptor increased density on the lesioned side. (A) Representative autoradiograms showing D₃ receptors in the striatum using the [¹²⁵I] 7-hydroxy-PIPAT ligand. (B) Histograms showing striatal D₃ receptor binding levels. Measurements were made in the StMR and the StLR. Results shown represent means ± SEM from n = 6–9 animals. Statistical comparisons between groups were performed using a three-way anova, followed by a Fisher's LSD test when required. ***P < 0.0001, **P < 0.01 when compared to the intact side from the same mouse type receiving the same treatment; ****P < 0.0001, **P < 0.01, †P < 0.05 when compared to the intact side from Nur77^{+ / +} animals receiving the same treatment.



Figure 1

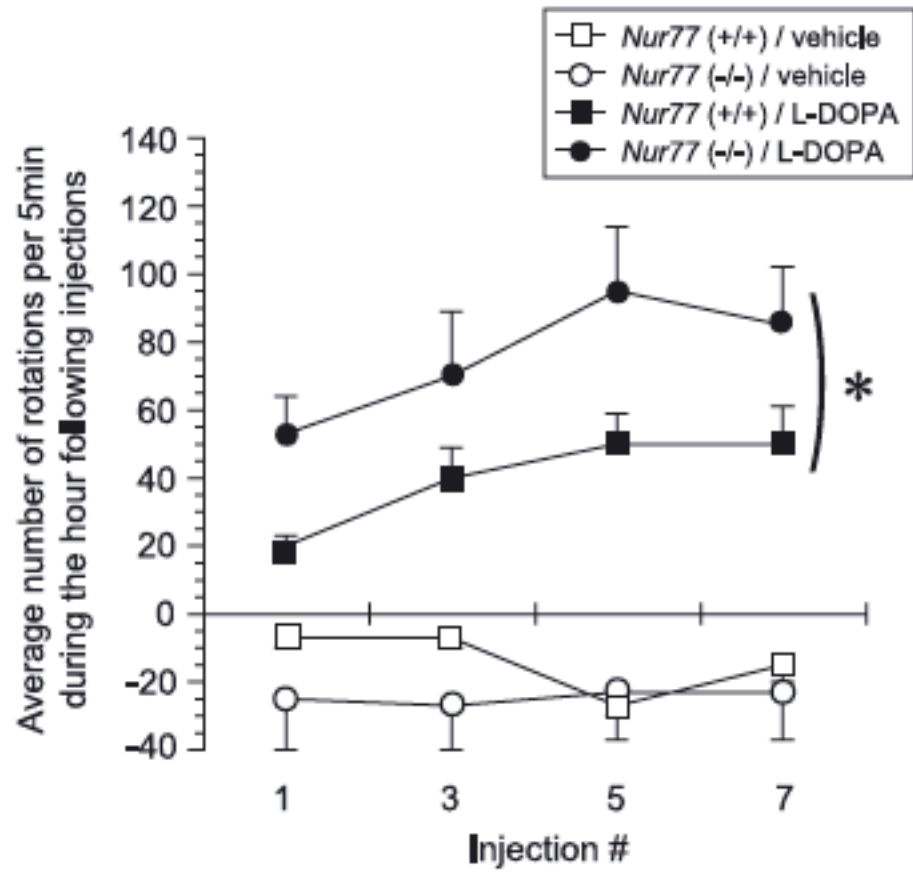


Figure 2

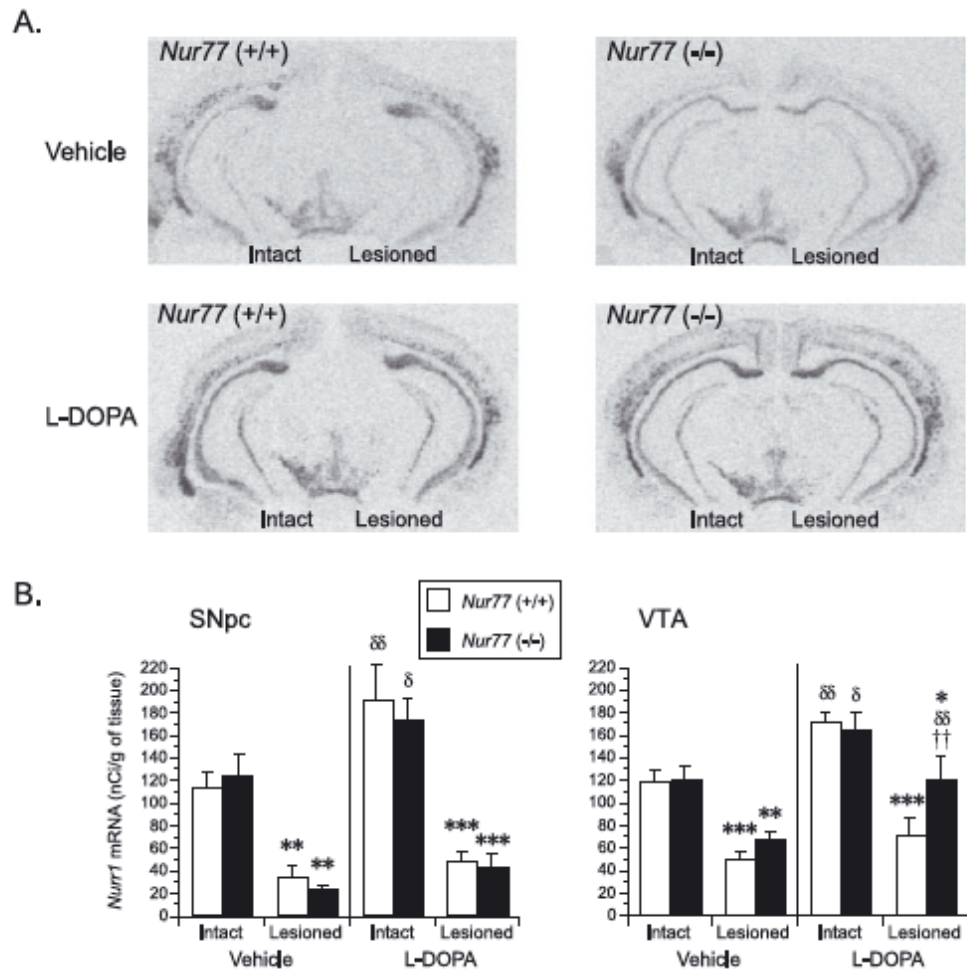


Figure 3

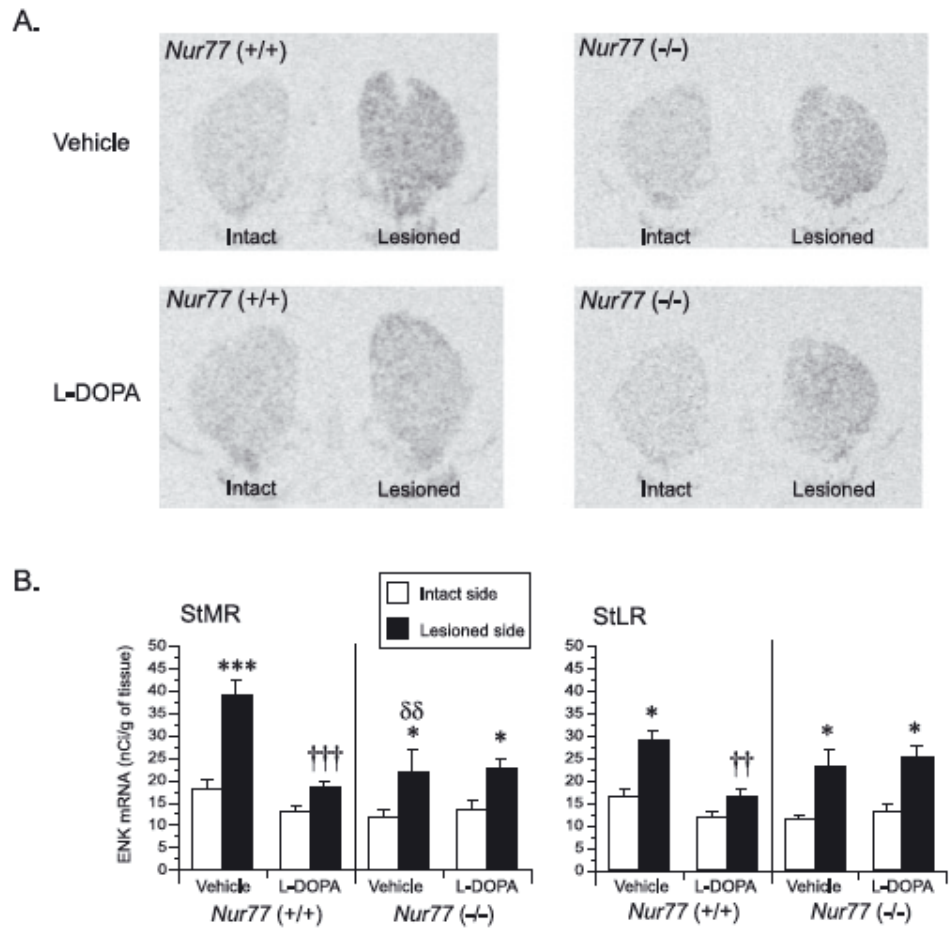


Figure 4

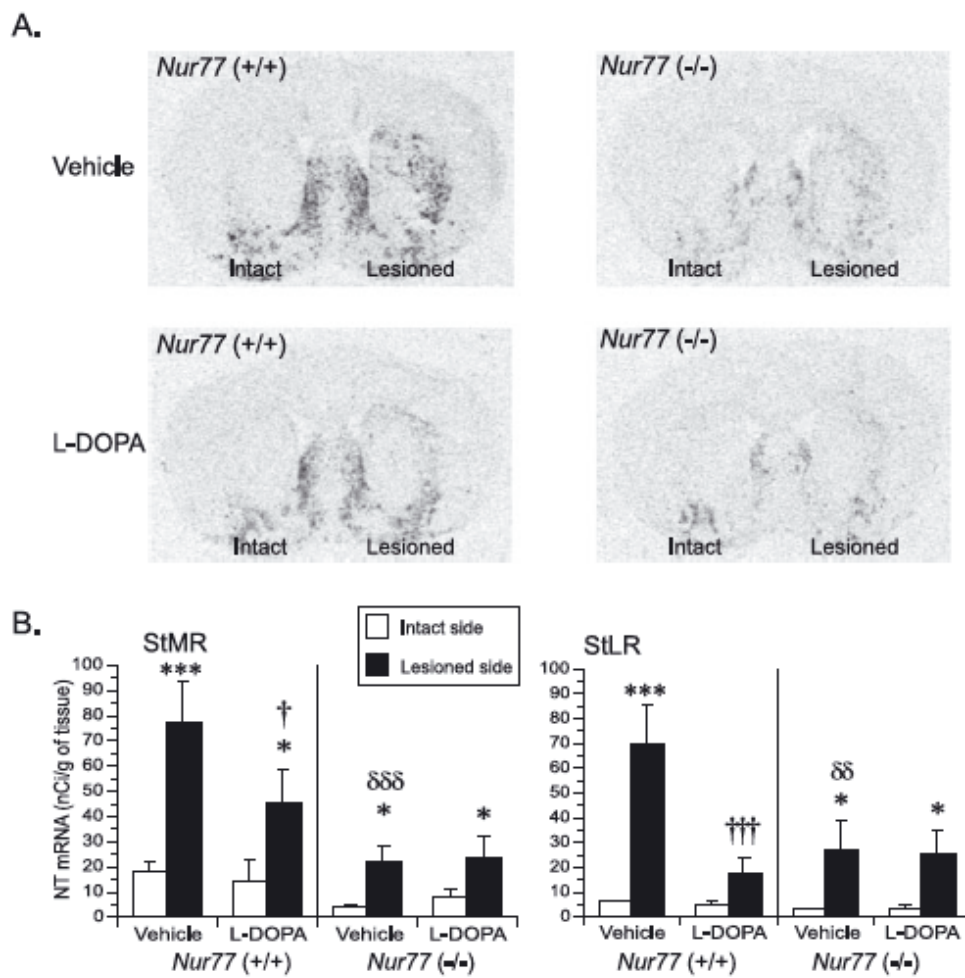


Figure 5

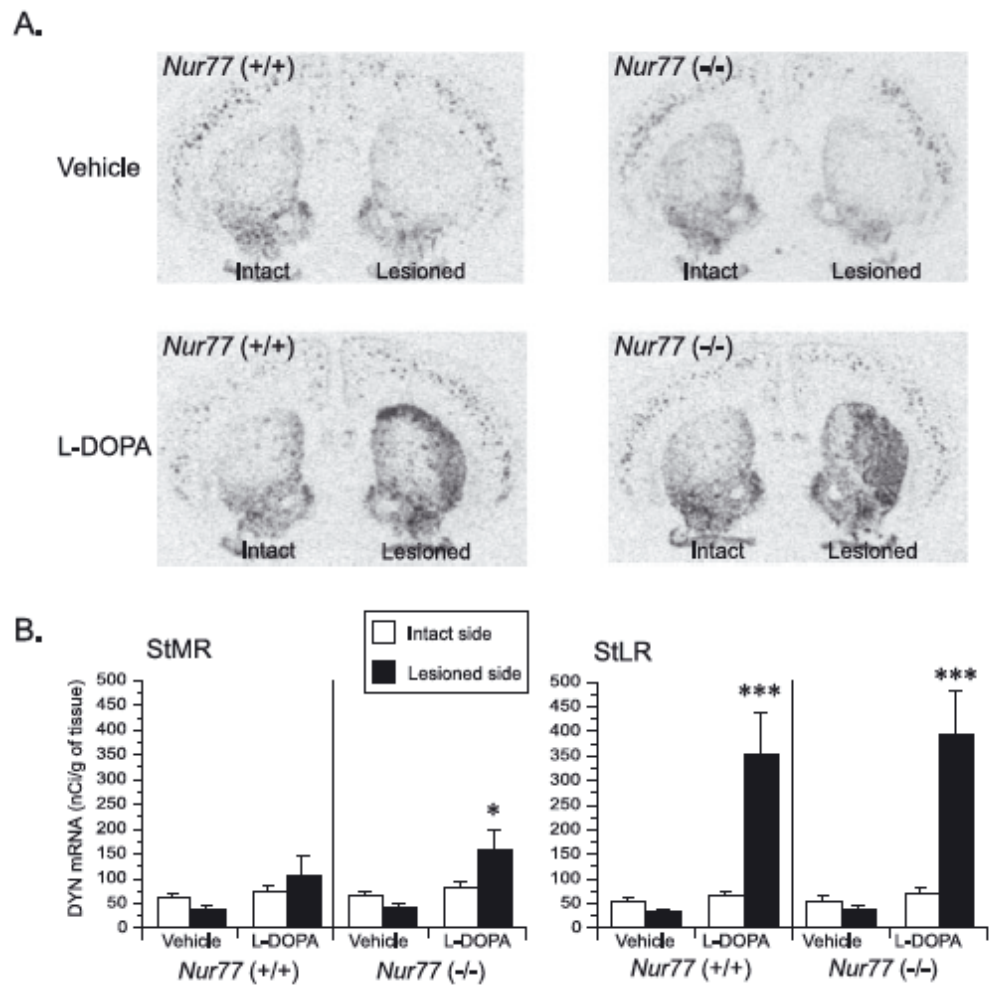


Figure 6

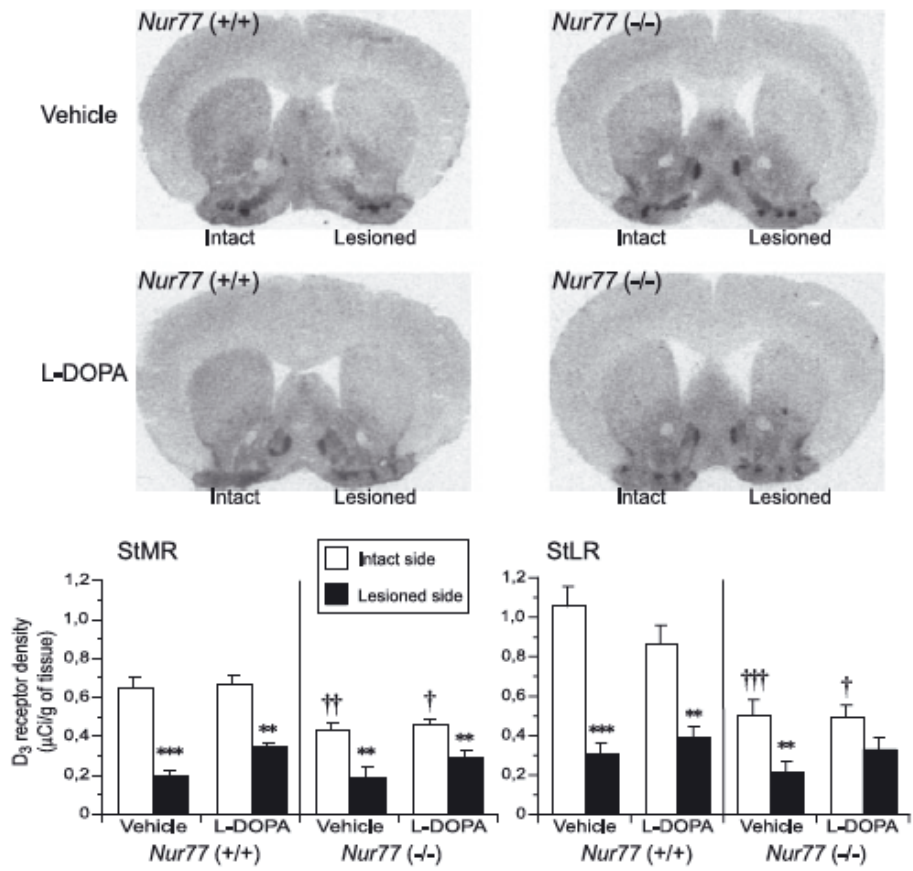


Figure 7

Chapitre 3: résultats du rôle de Nur77 et d'RXR dans les effets de l'amphétamine

J'ai réalisé la majorité des expériences de sensibilisation comportementales dont les premières avec l'aide et l'enseignement de l'assistante de recherche Brigitte Paquet, le sacrifice des souris, l'extraction des cerveaux, la coupe des cerveaux, les analyses et la compilation des résultats comportementaux, la réalisation de toutes les hybridations *in situ* sur ces protocoles (résultats non publiés)... Le Dr Jérôme Maheux m'a aidé à couper quelques cerveaux sur quelques protocoles. Le Dr Pierre-Paul Rompré a réalisé toutes les analyses statistiques, les Drs Kagechika et Shudo ont gracieusement offerts les agonistes antagonistes de synthèse chimique RXR et RAR, le Dr Lévesque a fait l'expérience de binding.

THE TRANSCRIPTION FACTORS *NUR77* AND RETINOID X RECEPTORS PARTICIPATE IN AMPHETAMINE-INDUCED LOCOMOTOR ACTIVITIES

Emmanuelle BOURHIS¹, Jérôme MAHEUX¹, Brigitte PAQUET², Hiroyuki KAGECHIKA³,
Koichi SHUDO⁴, Pierre-Paul ROMPRÉ⁵, Claude ROUILLARD² and Daniel LÉVESQUE^{1*}

¹ Faculty of Pharmacy, University of Montreal, Montreal, Qc, Canada H3C 3J7, ² Neuroscience Unit, CRCHUL, Quebec, Qc, G1V 4G2, Canada, ³ School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan, ⁴ Research Foundation Itsuu Laboratory, Tokyo, Japan, ⁵ Fernand Seguin Research Center, Faculty of Medicine, Dept. of Psychiatry, University of Montreal.

- Corresponding author: Dr Daniel Lévesque
Faculty of Pharmacy
University of Montreal
Pavillon Jean-Coutu
C.P. 6128, succursale centre-ville
Montreal, Qc
H3C 3J7
Tel. (514) 343-6339
Fax. (514) 343-7073

Key words: NGFI-B, NR4A1, RXR, dopamine receptors, amphetamine, ambulatory activity, stereotypy, psychostimulant, retinoids, nuclear receptors, sensitization

Abbreviation: AM80, 4-[(5,6,7,8-Tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthyl)carbamoyl]benzoic acid; AMPH, amphetamine; DMSO, dimethylsulfoxide; HX531, 4-(5*H*-2,3-(2,5-Dimethyl-2,5-hexano)-5-methyl-8-nitrodibenzo-*[b,e]*[1,4]diazepin-11-yl)-benzoic acid; LE135, 4-[5*H*-2,3-(2,5-dimethyl-2,5-hexano)-5-methyldibenzo-*[b,e]*[1,4]diazepin-11-yl]-benzoic acid; NGFI-B, Nerve-Growth Factor Inducible gene B; RAR, retinoic acid receptor; RXR, retinoid X receptor.

Words in Abstract:	256	Number of page text:	35
Words in Introduction:	755	Number of figures:	8
Words in Discussion:	1629	Number of references:	41
Number of Tables:	1		

Abstract

The major substrate underlying amphetamine (AMPH)-induced locomotor activity is associated with dopamine forebrain circuits. Brain regions associated with AMPH-induced locomotor activity express high levels of retinoid receptors. However, the role of these transcription factors in dopamine-mediated effects remains poorly understood. Two nuclear receptor families, the retinoic acid receptors (RAR) and the retinoid X receptors (RXR), transduce retinoic acid signal. RARs are specifically involved in retinoid signaling, whereas RXRs also participate in other signaling pathways as partners for other nuclear receptors such as *Nur77*, an orphan member of the nuclear receptor family expresses in dopamine system. To explore the role of retinoid receptors and *Nur77* in AMPH-induced locomotor activity, we administered selective retinoid receptor drugs in combination with AMPH in adult wild type and *Nur77* deficient mice. At a low dose, AMPH similarly increased ambulatory activity in wild type and *Nur77* deficient mice, while it did not alter non-ambulatory activity. At a high dose, AMPH did not alter ambulatory activity anymore, while non-ambulatory activity strongly increased in wild type mice. *Nur77*-deficient mice still displayed a higher ambulatory activity with no change in non-ambulatory activity. HX531, a synthetic RXR antagonist, blocks AMPH-induced ambulatory activity, whereas RAR drugs tested remained without effect. Interestingly, the effect of HX531 was abolished in *Nur77* deficient mice, suggesting that this orphan nuclear receptor is essential for the action of the RXR drug. This study shows that RXR and *Nur77* participate in AMPH-induced locomotor activity and prompts for further investigations on the role of *Nur77* and RXR in addiction and reward-related behaviors.

1. Introduction

Dopamine neurotransmission is deeply involved in the effect of drug of abuse. Psychostimulants such as cocaine and amphetamine (AMPH) strongly enhance dopamine release in mesolimbic dopamine signaling pathway and produce a powerful locomotor stimulation (Hyman et al. 2006). The rodent behavioral response to a low dose AMPH treatment is characterized by elevated ambulatory or horizontal locomotor activity, while the behavioral response to higher AMPH doses includes focused stereotyped-like movements, which compete with locomotion and therefore inhibit ambulatory activity (Amalric and Koob 1993). In addition, repeated administration of psychostimulants is well known to produce behavioural sensitization, which is characterized by an increased locomotor response when animals have been pre-exposed to the drug. Although dopamine receptors are recognized to participate in AMPH-induced locomotor activity, intracellular events triggered by AMPH remained poorly understood. A large body of evidence indicates that the Fos family (*c-fos*, Fos-related antigens and Δ FosB) is involved in acute and chronic effect of psychostimulants (Nestler 2004). In recent years, we and others have evidenced a role for transcription factors of the nuclear receptor family in dopamine-mediated effects. But, their contributions to AMPH-induced locomotor activity are still elusive.

The retinoic acid signal is transduced by two nuclear receptor families, the retinoic acid receptors (RAR) and retinoid X receptors (RXR), both existing in 3 different isoforms (α , β and γ) (Chambon 1996; Mangelsdorf et al. 1995). Retinoid receptor function as RAR-RXR heterodimers and play important roles during embryonic development and postnatal life. RAR are specifically involved in retinoid signaling, whereas RXR also participate in many other signaling pathways by serving as heterodimerization partners for the vitamin D receptor, the thyroid hormone receptors and other members of the nuclear receptor family of transcription factor such as orphan nuclear receptors *Nurr1* and *Nur77* (also known as Nerve-Growth Factor Inducible gene B, NGFI-B) (Mangelsdorf and Evans 1995; Perlmann and

Jansson 1995). The high level of expression of retinoid receptors in the brain, together with the retinoic acid responsiveness of various neurotransmitter pathways, suggest that retinoid signaling might be involved in the regulation of specific neural functions. High levels of RAR β and RXR γ isoforms are found in the striatum suggesting a close neuroanatomical relationship with retinoid signaling and central dopamine system (Krezel et al. 1999; Lévesque and Rouillard 2007; Zetterström et al. 1999). In addition, data collected using knockout mice indicated that selective retinoid receptors are involved in locomotor activities associated with dopamine neurotransmission. Indeed, double null mutant mice RAR β -RXR β , RAR β -RXR γ and RXR β -RXR γ , exhibited a significant reduction in ambulatory activity, as measured in the open field test, and a reduction of motor coordination in the rotarod test (Krezel et al. 1998). These locomotor changes were accompanied by a significant reduction of dopamine D₁ and D₂ receptor expression in the striatum (Krezel et al. 1998). In addition, selective knockout of the RXR γ isoform reduced the cataleptic response induced by the classical antipsychotic chlorpromazine (Saga et al. 1999). Moreover, we recently showed that RXR drugs are able to modulate haloperidol-induced locomotor responses (Ethier et al. 2004a; b). Trying to decipher the mechanisms involved in haloperidol-induced behavioural effects, we demonstrated that both the cataleptic response (acute parkinsonism) and vacuous chewing movements (oro-facial dyskinesias) induced by this classical antipsychotic (dopamine D₂ receptor antagonist) are altered by RXR drugs, such as 9-*cis* retinoic acid, docosahexaenoic acid (a polyunsaturated fatty acid that may act as an endogenous RXR agonist in the central nervous system) (Mata de Urquiza et al. 2000; Wallen-Mackenzie et al. 2003) and HX531 (a synthetic RXR antagonist) (Ethier et al. 2004a; b). Interestingly, RXR drugs remain without effect on haloperidol-induced vacuous chewing movements in *Nur77* deficient (-/-) mice, indicating that *Nur77* is needed for expression of the effect of the RXR drug in this experimental paradigm (Ethier et al. 2004b).

Since close relationship exists between the accumbal and striatal dopamine system and specific retinoid receptors, a participation of retinoid receptors in the effect of

psychostimulants can be hypothesized. Indeed, double RAR-RXR mutant mice displayed profound alterations in cocaine-induced locomotor activity (Krezel et al. 1998). However, these alterations might result from defects induced during brain development or from compensatory or indirect effects (e.g. through modulation of dopamine receptor expression). Therefore, the main objective of this study was to explore the role of retinoid receptors in AMPH-induced locomotor activity in the adult mouse brain using a pharmacological approach. To achieve this goal, we administered selective RAR and RXR drugs in combination with AMPH in adult wild type and *Nur77* knockout mice. This study shows that RXR and *Nur77* participate in AMPH-induced locomotor activity.

2. Material and methods

2.1 Animals and treatments

All procedures, including means to minimize discomfort, were reviewed and approved by the Laval University and University of Montreal Animal Care Committees. Wild type (*Nur77*(+/+)) male (C57BL/6, weighing 20-25 g) mice were purchased from Charles River, Canada. *Nur77* knockout (*Nur77*(-/-)) mice were developed and graciously provided by Dr Jeff Milbrandt at the Washington University, St-Louis, MO, USA (Lee et al. 1995). These mice are healthy and reproduce normally. They were produced in a mixed background and have been backcrossed into the C57BL/6 strain for at least 10 generations to reduce genetic background heterogeneity (Jeff Milbrandt, personal communication). We maintain a *Nur77*(-/-) mouse colony at the animal care facility of our research centre. Young adult *Nur77*(-/-) male mice weighing 20-25 g were used for present experiments.

2.2 Comparison of spontaneous locomotor activity in *Nur77*(+/+) and (-/-) mice.

In this experiment, we compared 3 components of spontaneous locomotor activity during the exploratory phase of mice, which included horizontal locomotor activity or ambulatory activity, vertical activity (rearing) and non-ambulatory activities that correspond to repetitive movements that can be assimilated to stereotyped-like behaviors (Miyamoto et al. 2004; Niculescu et al. 2005) in wild type (*Nur77*(+/+)) and *Nur77*(-/-) mice. After habituation, groups of *Nur77*(+/+) and *Nur77*(-/-) mice (N=20 per group) were placed in test chambers and their activity was recorded for a 1-hour period.

2.3 Comparison of the effect of two doses of amphetamine in *Nur77*(+/+) and (-/-) mice.

Before the beginning of the experiments, animals were habituated to the activity chambers for 3 consecutive days (1-hour per session). The day after, groups (N=8 per group) of adult *Nur77*(+/+) and *Nur77*(-/-) mice were treated for five consecutive days with 2.5 or 5 mg/kg of d-amphetamine sulfate (AMPH) (i.p.) dissolved in sterile 0.9% NaCl (saline). For all groups, animals were taken from

their home cage, injected and immediately put in the locomotor activity chamber. After each test session (1 h), animals were brought back to their home cage. We evaluated the effect of the two AMPH doses on ambulatory activity (horizontal activity) and non-ambulatory activity after the first (day 1) and fifth AMPH injection (day 5) in order to compare sensitized locomotor activity induced by AMPH in the two genetic backgrounds.

2.4 Comparison of the effect of retinoid receptor drugs in amphetamine-induced locomotor activity.

Animals used in these experiments were also habituated to activity chambers for 3 consecutive days. Groups of adult *Nur77*(+/+) mice (N=10 per group) were treated for five consecutive days (sensitization phase) with vehicles (saline, dimethylsulfoxide (DMSO)), a selective retinoid receptor drug alone, AMPH (2.5 mg/kg, i.p.) alone and AMPH plus a retinoid receptor drug followed by a washout period of five days and a subsequent AMPH challenge (same dosage) at day 11 (expression phase). Retinoid receptor drugs used are HX531 (4-(5*H*-2,3-(2,5-Dimethyl-2,5-hexano)-5-methyl-8-nitrodibenzo-*[b,e]*[1,4]diazepin-11-yl)-benzoic acid) (20 mg/kg, i.p., dissolved in 2% DMSO and sterile water), a selective RXR antagonist (Ebisawa et al. 1999), AM80 (tamibarotene, 5 mg/kg, i.p. in 2% DMSO), a RAR agonist (Kagechika et al. 1984) and LE135 (4-[5*H*-2,3-(2,5-dimethyl-2,5-hexano)-5-methyldibenzo-*[b,e]*[1,4]diazepin-11-yl]-benzoic acid) (5 mg/kg, i.p. in 2% DMSO), a selective RAR β antagonist (Kagechika and Shudo 2005; Li et al. 1999). Retinoid drugs or their vehicles were injected 10 min before AMPH or its vehicle. HX531, AM80 and LE135 were administered during the sensitization phase (from day 1 to day 5). Retinoid receptor drug treatments were stopped at day 5. They were not administered during the washout period and AMPH challenge at the expression phase (at day 11). During the sensitization and expression phases, all mice received two injections every day (a retinoid receptor drug or its vehicle and AMPH or its vehicle). For all groups, animals were taken from their home cage, injected and immediately put back in the locomotor activity chamber. After the test

session (1 h) animals were returned to their home cage. For the RXR antagonist, HX531, a similar experiment was performed in *Nur77(-/-)* mice.

Synthetic retinoid drugs (AM80, LE135 and HX531) were synthesized and provided by Drs Kagechika and Shudo from the University of Tokyo, Japan. The doses of RAR and RXR drugs have been chosen according to previous reports (Ethier et al. 2004a; b; Shudo et al. 2004; Yamauchi et al. 2001). A similar dose and treatment regimen of AM80 as used herein displayed a significant inhibitory effect on scopolamine-induced memory deficits in rats (Shudo et al. 2004). In addition, we observed a small but significant increase in striatal D₂-like receptor binding site density in AM80-treated mice for 5 days (unpublished observation). This is consistent with previous reports showing that D₂ receptor expression can be induced by retinoic acid (Valdenaire et al. 1998). Central nervous system activity of LE135 has never been investigated previously, but it is structurally very close to HX531 and has a similar affinity for the RAR β receptor isoform as AM80 (Kagechika and Shudo 2005). Moreover, LE135 has an indices of hydrophobicity of 7.88 (Log P value) and 8 groups of hydrogen bound acceptors or donors. Thus, this hydrophobic compound should easily penetrate into the brain and be active at the dose chosen in the present experiment. Morita and colleagues recently demonstrated that compounds of the HX series have similar affinities for RXR and could selectively bind and modulate the activity of the *Nur77*-RXR γ complex using an *in vitro* gene reporter assay, indicating that HX compounds are indeed active on this particular transcriptional complex (Morita et al. 2005).

2.5 Binding of the RXR antagonist to dopamine D₂ receptor sites.

Striatal tissues were freshly dissected out from 3 mouse brains and immediately proceed for binding assay. They were homogenized using a polytron (at moderate velocity) and resuspended in a Tris-HCl buffer (10 mM) containing 2 mM MgCl₂, pH 7.4, then recentrifuged at 50 000 g for 15 min. Incubation buffer contained 50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 4 mM MgCl₂ and 1 mM EDTA (pH 7.4). Competition of the dopamine D₂ receptor radiolabeled antagonist [³H]raclopride (Amersham Biosciences Inc., GE, Baie d'Urfé, Qc, Canada) binding was

performed as previously described (Ethier et al. 2004a). Briefly, increasing concentrations of the dopamine D₂ agonist quinpirole or HX531, a RXR antagonist (1x10⁻¹¹ to 1x10⁻⁵ M) were incubated with 3 nM of [³H]raclopride (specific activity: 76 Ci/mmol). The reaction was started by addition of tissue homogenates in a final volume of 1 ml. Specific binding was obtained by subtraction of non-specific binding using 1 μM eticlopride, a specific D₂ antagonist. Incubations lasted for 1 h at room temperature and were stopped by rapid filtration through GF/C filters (Whatman) with ice-cold Tris/NaCl buffer. Ten ml of scintillation cocktail was added to the filters and radioactivity was counted at 30% efficiency. Each concentration points were performed in duplicates. Computer assisted non-linear regression curve analysis were performed using Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) to obtain half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀). Inhibitory constant (K_i) determination was performed according to the Cheng-Prusoff correction ($K_i = IC_{50} / (1 + [L] / K_d)$), where L and K_d are the concentration and the dissociation constant of the radiolabeled ligand used, respectively.

2.6 Behavioral analyses

Ambulatory activity measured as photobeam interruptions was assessed using a Flex-Field apparatus (San Diego Instruments, San Diego, CA). The apparatus includes 2 sets of photobeams placed at 1.5 and 5.5 cm above the chamber floor, respectively. A distance of 2.5 cm separates each photobeam horizontally. Locomotor activity was assessed after each AMPH injection (day 1 to day 5 and at day 11) for a period of 1 hour, immediately following drug administrations. Horizontal locomotor activity or ambulatory activity scores represent the total number of interrupted beams computes every 5 min. Mean ambulatory activity scores obtained during the sensitization (day 1 to 5) and expression (day 11) phases represent the total number of interrupted beams averaged for the entire hour. Non-ambulatory activity scores were estimated with the number of sequences that the same adjacent beams are repeatedly interrupted every 5 min and then average for the 1-hour test session. Non-ambulatory activity is defined as focused behaviors without horizontal locomotor activity. Repeated breaking of the same beam

indicates a stationary animal engaged in repetitive behaviors as opposed to ambulatory activity. As previously reported, this score is indicative of stereotyped-like behaviors (Miyamoto et al. 2004; Niculescu et al. 2005). Vertical activity scores or rearing represent the number of time the animal stood upon its hind legs with forelegs in the air or against the wall and were computed from the interruption of the second row of photobeams.

2.7 Statistical analyses

All data were expressed as group means \pm SEM. Homogeneity of variances was first determined with Bartlett's Chi-Square test and square root or log data transformation was performed to increase homogeneity when necessary. Student's t-test for independent samples was used to compare spontaneous locomotor activity between mouse genotypes. A 3-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the effect of AMPH and its vehicle in each mouse genotype on the first and the fifth day of treatment; whenever appropriate a lower order ANOVA (e.g. 2 way) was performed to determine source of significance. Separate 2-way ANOVAs were used to determine the significance of the effect of the RXR and RAR ligands on AMPH-induced locomotion in each mouse genotypes. In all tests, comparisons among means when justified were performed with a Duncan's multiple range test and the level of significance was set at 0.05. All analyses were performed with Statistica 6.0 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

3. Results

3.1. Comparison of spontaneous locomotor activities in *Nur77(+/+)* and *(-/-)* mice.

In the present study, we evaluated 3 components of spontaneous locomotor activity during the exploratory phase of mice, which included horizontal locomotor activity or ambulatory activity, vertical activity (rearing) and non-ambulatory activity that correspond to repetitive movements that can be assimilated to stereotyped-like behaviors (Miyamoto et al. 2004; Niculescu et al. 2005). *Nur77(-/-)* mice displayed a higher spontaneous ambulatory activity compared to *Nur77(+/+)* mice (Fig. 1A), an observation consistent with our previous report (Gilbert et al. 2006). However, spontaneous rearing and non-ambulatory activity scores were similar in *Nur77(+/+)* and *(-/-)* mice (Figs. 1B and C).

3.2. Comparison of the effect of two doses of amphetamine in *Nur77(+/+)* and *(-/-)* mice.

We evaluated the effect of two AMPH doses on ambulatory (horizontal) and non-ambulatory activities after the first (day 1) and fifth AMPH injection (day 5) in order to determine whether the two mouse genotypes responded differently to acute and repeated injections of AMPH. At a dose of 2.5 mg/kg both genotypes showed a progressive increase in AMPH-induced locomotion (Fig. 2A). A 3-way ANOVA yielded a significant treatment by day interaction ($F_{1,68} = 7.56$, $p = 0.007$) but no effect of genotype ($F_{1,68} = 2.6$, $p = 0.11$) and no other interaction with genotype (genotype by day, $F_{1,68} = 0.06$, $p = 0.81$; genotype by treatment, $F_{1,68} = 0.89$, $p = 0.35$; genotype by day by treatment ($F_{1,68} = 0.002$, $p = 0.93$)), hence confirming that responses to AMPH, and to the vehicle, on day 1 and day 5 did not differ among mouse genotypes. A 2 way ANOVA confirmed that in *Nur77(+/+)* AMPH increased ambulatory activity on each testing day and that sensitization developed to this stimulant effect as it was stronger on day 5 than on day 1 (treatment by day interaction $F_{1,36} = 4.54$, $p < 0.05$). In *Nur77(-/-)* mice, AMPH also increased ambulatory activity compare to vehicle, an effect that also sensitized with repeated injections as it was statistically different than vehicle on day 5 but not on day 1

(treatment by day interaction $F_{1,32} = 5.55$, $p < 0.05$). At this dose, AMPH did not alter non-ambulatory activity neither in *Nur77(+/+)* nor in *Nur77(-/-)* mice (Fig. 2B). The 3-way ANOVA yielded no day ($F_{1,68} = 1.58$, $p = 0.21$), no treatment effect ($F_{1,68} = 1.52$, $p = 0.22$) and no other interaction ($p > 0.05$ for all of them).

The high dose of AMPH (5 mg/kg) initially (first 10-15 minutes) induced a strong horizontal locomotor activity at day 1 and day 5 in both *Nur77(+/+)* and *(-/-)* mice (not shown). However, ambulatory activity rapidly declined in *Nur77(+/+)* mice, whereas it remained elevated in *Nur77(-/-)* mice such that these latter mice displayed much stronger mean ambulatory activity (Fig. 2C). A 3-way ANOVA yielded a significant genotype by treatment interaction ($F_{1,61} = 48.5$, $p < 0.001$), but no day by genotype by treatment interaction ($F_{1,61} = 0.23$, $p = 0.63$), suggesting that AMPH-induced ambulatory activity was not different between day 1 and day 5, but differs across mouse genotypes. The 2 way ANOVA performed on data collected on each day yielded a significant genotype by treatment interaction (day 1, $F_{1,30} = 4.12$, $p = 0.05$; day 2, $F_{1,31} = 8.21$, $p < 0.005$), and post-hoc test showed that AMPH increased ambulatory activity in *Nur77(-/-)* mice, but not in *Nur77(+/+)* at day 1 and at day 5. The pattern of effect of the high dose of AMPH on ambulatory activity appears to be accounted for by its effect on non-ambulatory activity. Indeed, *Nur77(-/-)* mice injected with AMPH showed a slight reduction in non-ambulatory activity on day 1 and on day 5 compare to those injected with vehicle, while in *Nur77(+/+)* AMPH produced a progressive increase in non-ambulatory activity (Fig. 2D). A 3-way ANOVA yielded a significant day by treatment ($F_{1,61} = 4.5$, $p < 0.04$) and genotype by treatment ($F_{1,61} = 23.4$, $p < 0.001$) interaction ($F_{1,61} = 48.5$, $p < 0.001$), but no day by genotype by treatment interaction ($F_{1,61} = 0.26$, $p = 0.61$), suggesting that AMPH-induced non-ambulatory activity was different across mice on day 1 and day 5, and that it differs from day 1 to day 5. The 2 way ANOVA performed on data collected on each day yielded a significant genotype by treatment interaction (Day 1, $F_{1,30} = 10.0$, $p < 0.002$; Day 5, $F_{1,31} = 1.35$, $p < 0.001$), and post-hoc test showed that AMPH increased non-ambulatory activity in *Nur77(+/+)*, but not in *Nur77(-/-)* mice at both days. A 2 way ANOVA performed on data from

Nur77(+/+) mice yielded a significant effect of day ($F_{1,32} = 4.42$, $p < 0.05$) and of treatment ($F_{1,32} = 18.7$, $p < 0.001$), confirming that the effect of AMPH was significantly higher on day 5 than on day 1. The 2 way ANOVA performed on data from *Nur77*(-/-) yielded no effect of day ($F_{1,29} = 1.9$ $p = 0.18$), but a significant effect of treatment ($F_{1,29} = 5.9$, $p < 0.03$) that can be attributed to the decrease in non-ambulatory activity observed after AMPH on day 1.

Vertical activity (rearing) was strongly reduced following AMPH administration (Table 1). RAR drugs LE135 and AM80 did not alter basal rearing behavior or the effect of AMPH on vertical activity in wild type mice. However, the RXR antagonist HX531 reduced spontaneous vertical activity in both *Nur77*(+/+) and (-/-) mice (Table 1).

3.3. Comparison of the effect of retinoid receptor drugs in AMPH-induced ambulatory activity.

To explore the role of retinoid receptors in AMPH-induced ambulatory activity, we combined AMPH with retinoid receptor drugs. We administered AMPH alone or in combination with retinoid receptor drugs for 5 consecutive days (sensitization phase). This was followed by a 5-day drug free washout period. Then, at day 11, a challenge with AMPH was performed (expression phase). Retinoid drugs were administered during the sensitization phase (day 1 to day 5), but not during the washout period or during the expression phase (day 11), in order to avoid putative interference of the effect of retinoid drugs on locomotion. Vehicle- and retinoid receptor drug-treated animals (for five days) were also challenged with AMPH at day 11, as controls.

Figure 3A illustrates the time-course effect of vehicle, HX531 alone, AMPH and AMPH plus HX531 after the 1st and 5th injection in *Nur77*(+/+) mice along the 1-hour test session. Levels of ambulatory activity induced by AMPH at day 5 are clearly higher than levels observed after the first injection (day 1). For the first 10 min after drug injections, levels of ambulatory activity induced by AMPH + HX531 after five consecutive days of treatment are similar to the AMPH alone groups (Fig. 3A lower panel). However, in the group receiving HX531, AMPH-induced

ambulatory activity start to decline immediately after these initial measures in *Nur77(+/+)* mice (Fig. 3A, lower panel). As observed in Fig. 2B, this dose of AMPH did not induce significant increase in non-ambulatory activity scores (not shown). Note that a five-day sub-chronic administration of vehicles or HX531 alone did not significantly alter basal ambulatory activity (Fig. 3). Figure 3B shows the day-to-day progression of the locomotor sensitization across the five days of treatment in *Nur77(+/+)* treated with AMPH alone or in combination with HX531. Interestingly, addition of the synthetic RXR antagonist significantly reduced AMPH-induced ambulatory activity (Fig. 3B). A 2 way ANOVA for repeated measures on day yielded a significant treatment by day interaction ($F_{12,132} = 3.3$, $p < 0.001$). Post hoc test shows that activity on day 3, 4 and 5 was higher than that on day 1 after AMPH alone, a sensitization effect much weaker in the mice treated with AMPH + HX531; at each of these days (3-5), the activity of this latter group was significantly lower than that of the group treated with AMPH alone; also the activity of the AMPH + HX531 group is not different between days.

We previously showed that the effect of HX531 on neuroleptic-induced vacuous movements is dependent on *Nur77* (Ethier et al. 2004b). To explore the role of *Nur77* in the effect of the RXR antagonist, we performed a similar repeated AMPH (with or without HX531) treatment paradigm with *Nur77(-/-)* mice (Fig. 4). As for wild type mice, levels of ambulatory activity induced by AMPH at day 5 are clearly higher than levels observed after the first injection (day 1) in *Nur77(-/-)* mice. However, time courses after the first and fifth injections of AMPH or AMPH + HX531 are undistinguishable in *Nur77(-/-)* mice (Fig. 4A). *Nur77(-/-)* mice displayed a strong ambulatory activity following repeated AMPH alone and HX531 was unable to reduce this effect (Fig. 4B). A 2 way ANOVA for repeated measures on day yielded a significant treatment by day interaction ($F_{12,132} = 6.4$, $p < 0.001$) and post hoc test shows that activity on day 3 was significantly higher than on day 1 after AMPH alone and after AMPH + HX531. On each testing days, these groups displayed higher level of activity than those treated with vehicle; HX531 administered alone did not alter activity (Fig. 4B).

Then, we compared the effect of the RXR antagonist at the expression phase of AMPH-induced ambulatory activity in *Nur77*(+/+) and (-/-) mice. To evaluate this aspect, we performed an AMPH challenge test at day 11 (after 6 days of drug washout). *Nur77*(+/+) mice pre-treated with AMPH responded more to the AMPH challenge than those pre-treated with the vehicle (Fig. 5A), indicating a sensitized ambulatory activity. However, ambulatory activity induced by the AMPH challenge in animal previously treated with AMPH + HX531 did not reach significance (Fig. 5A). A one way ANOVA yielded a significant treatment effect ($F_{3,39} = 3.21$, $p < 0.05$) and post-hoc test confirmed the difference between vehicles (V-V) and AMPH + Vehicle (A-V). A similar challenge test performed in *Nur77*(-/-) mice showed that sensitization to AMPH was evident for groups pre-treated with AMPH alone and AMPH + HX531, an effect confirmed by the ANOVA (treatment: $F_{3,39} = 2.74$, $p < 0.01$, Fig. 5B).

To explore the role of RAR, we administered a synthetic RAR antagonist LE135 in a similar AMPH sensitization paradigm to the wild type mice (Fig. 6A,B). When administered alone, AMPH induced a level of ambulatory activity very similar to that presented in Fig. 3, and LE135 did not alter this effect (Figs. 6A and B). LE135 also remained inactive on non-ambulatory activity (data not shown). A 2 way ANOVA for repeated measures performed on data presented in Fig 6B, yielded a significant treatment by day interaction ($F_{12,120} = 5.24$, $p < 0.001$) and post hoc test shows that activity on day 2, 3 and 5 was significantly higher than on day 1 after AMPH alone and after AMPH + LE135. On each testing day, these groups displayed higher level of activity than those treated with vehicle; LE135 administered alone did not alter ambulatory activity.

Since it is possible that a RAR antagonist remain inactive if constitutive activity of the receptor is low, we tested the effect of a potent and selective RAR agonist, AM80, on AMPH-induced activity using a similar paradigm (Figs. 6C and D). As for the RAR antagonist, AM80 did not significantly alter AMPH-induced ambulatory activity. A 2 way ANOVA for repeated measures performed on data presented in Fig. 6D, yielded a significant treatment by day interaction ($F_{12,128} =$

3.84, $p < 0.001$) and post hoc test shows that activity on day 2 to 5 was significantly higher than on day 1 after AMPH alone and after AMPH + AM80. On each testing day, these groups displayed higher level of activity than those treated with vehicle; AM80 administered alone did not alter ambulatory activity.

In addition, AM80 and LE135 did not alter the expression of sensitization of the ambulatory activity induced by AMPH (Fig. 7). Both AMPH alone and AMPH plus AM80 or LE135 gave similar ambulatory activity scores, while AMPH and AMPH combined with a RAR drug significantly increased ambulatory activity compared to their respective vehicle groups (V-LE vs A-LE: $F_{3,39} = 2.59$, $p < 0.05$; V-AM vs A-AM: $F_{3,39} = 2.93$, $p < 0.05$, Fig. 7).

3.4. Binding of the RXR antagonist to dopamine D₂ receptor sites

In addition to our previous observation on the effect of HX531 in antipsychotic drug effects (Ethier et al. 2004b), present results suggests that HX531 can mimic the effects of a dopamine D₂ receptor antagonist. In order to discard the possibility that this RXR antagonist might interact with the D₂ receptor binding site, we investigated the displacement of [³H]raclopride specific binding by HX531 (Fig. 8). As a control, we performed a similar experiment with quinpirole, a classic dopamine D₂ receptor agonist. As previously reported in the literature, quinpirole displaced [³H]raclopride binding with a high affinity ($IC_{50} = 129$ nM for a K_i of 36 nM). HX531 was unable to displace the binding of the radiolabeled D₂ receptor specific antagonist (Fig. 8), indicating that HX531 does not interact with the dopamine D₂ receptor binding site.

4. Discussion

The present study demonstrates that the transcription factors of the nuclear receptor family *Nur77* and RXR participate in AMPH-induced locomotor activity. Although a low dose of AMPH similarly increased ambulatory activity in wild type and *Nur77* deficient mice, *Nur77* deficient mice were less prone to develop stereotyped-like non-ambulatory activity following a high dose of AMPH. The selective synthetic RXR antagonist HX531 blocks AMPH-induced ambulatory activity in wild type mice, whereas the selective RAR drugs tested remained without effect on AMPH-induced locomotor activity. Interestingly, the effect of the RXR antagonist disappeared in mice that have a deletion of the *Nur77* gene.

Psychostimulants, such as AMPH and cocaine, strongly induce *Nur77* expression in striatal cells (Bhardwaj et al. 2003; Gonzalez-Nicolini and McGinty 2002; St-Hilaire et al. 2003; Werme et al. 2000). We previously observed that *Nur77* gene knockout and RXR antagonist treatment were associated with exacerbated D₂ antagonist responses in mice (Beaudry et al. 2000; Ethier et al. 2004a; b). On the other hand, we show here that a RXR antagonist treatment reduced AMPH-induced ambulatory activity. Therefore, our results suggest that the effects of the RXR antagonist selectively mimic the effect of a dopamine D₂ antagonist; i.e. it induced or exacerbated abnormal movements (vacuous chewing movements) associated with chronic dopamine D₂ receptor blockade (Ethier et al. 2004b) and reduced AMPH-induced ambulatory activity (present data). To discard the possibility that HX531 might interact with D₂ receptors, we tested if HX531 can displace [³H]raclopride binding to D₂/D₃ receptors. HX531, at a concentration up to 10 μM, was unable to displace [³H]raclopride binding, indicating that HX531 does not significantly interact with dopamine D₂-like receptor subtypes. This supports the involvement of a RXR signaling in the effect of HX531.

The rodent behavioral response to low dose AMPH treatment is characterized by elevated ambulatory or horizontal locomotor activity, while the behavioral response to higher AMPH doses includes focused stereotyped-like movements, which

compete with locomotion and therefore inhibit ambulatory activity (Amalric and Koob 1993). In the present experiments, no increase in non-ambulatory activity scores was generated with the lower dose of AMPH, whereas the high dose of AMPH significantly increase non-ambulatory activity concomitantly with a reduction of ambulatory activity, suggesting an increase in focused stereotyped-like movements in wild type mice, as previously described (Miyamoto et al. 2004; Niculescu et al. 2005). Interestingly, *Nur77* deficient mice did not engage non-ambulatory activity following the high dose of AMPH. Ambulatory activity measured following a low dose of AMPH and stereotyped-like behaviors measured following high AMPH doses appear to be mediated by distinct brain circuitries (Amalric and Koob 1993; Dickson et al. 1994). A possible explanation to the dissociation between the two AMPH effects is that in *Nur77* deficient mice the dose-response curve is shifted to the right due to decrease sensitivity of striatal substrates to dopamine. A previous study showed that *Nur77* deficient mice are much more responsive to a low dose of quinpirole-induced suppression of locomotion, hence suggesting that dopamine autoreceptors are more sensitive (Gilbert et al. 2006). Since these receptors act as a negative feedback to dopamine neurons, reducing or limiting cell firing, release and synthesis, an increase in their sensitivity would contribute to reduce or limit AMPH-induced dopamine release. When given systemically, AMPH increases dopamine release in the ventral striatum and in the prefrontal cortex, and it seems that these actions exert opposite effects on ambulatory activity. AMPH injection into the prefrontal cortex reduced ambulation induced by AMPH injections into the ventral striatum (Vezina et al. 1991). Interestingly, it was found that in *Nur77* deficient mice the activity of catechol-O-methyltransferase, the enzyme that metabolizes dopamine in the prefrontal cortex but not the striatum, is significantly reduced (Gilbert et al. 2006). That would suggest that the post-synaptic effect of dopamine in the prefrontal cortex is potentiated in *Nur77* deficient mice hence contributing to reduce its effect in the striatum. This would be consistent with a rightward shift of the dose-response curve, but it would be inconsistent with the higher spontaneous ambulatory activity

expressed by *Nur77* deficient mice (present results and (Gilbert et al. 2006)). An alternative hypothesis is that *Nur77* is necessary for expression of stereotypy, but not ambulation, and that in the absence of the former, ambulation can be fully expressed. Generation of stereotyped-like behaviors is associated with synergistic activation of both dopamine D₁ and D₂ receptor types with high dose of psychostimulants (Fetsko et al. 2003). Since *Nur77* deficient mice showed selective alterations of dopamine D₂ receptor-mediated effects (Ethier et al. 2004a; Gilbert et al. 2006), they might not be able to express behaviors associated with a concurrent D₁/D₂ receptor activation.

Our data indicate that the RXR antagonist strongly reduced AMPH-induced locomotor activity. However, the delayed effect of HX531 (that appeared after 10 min) in the time course of the AMPH-induced ambulatory activity suggests that the anticipatory component, which is classically associated with repeated psychostimulant administration, might not be altered by the RXR antagonist (see Fig. 3A lower panel). One might suggest that this delayed decline in AMPH-induced ambulatory activity induced by HX531 resulted from induction of stereotyped-like behaviors by the RXR drug that gradually masks horizontal locomotor activation following AMPH injection. This is unlikely because we show that non-ambulatory activity scores remained constant throughout these experiments. In addition, our data suggest that HX531 might also reduce the expression of AMPH-induced locomotor sensitization in wild type mice, but not in *Nur77* deficient mice. However, because of the strong effect of HX531 on AMPH-induced ambulatory activity during the sensitization phase, we cannot exclude the possibility that a residual effect from this stage might persist through the expression phase. Additional experiments with longer drug washout period will be necessary to clarify this point. The higher basal ambulatory activity observed in the *Nur77*(-/-) compared to *Nur77*(+/+) mice might have introduced a bias in the effect of AMPH on ambulatory activity. But, this unlikely alters our interpretation of the data because we always compared AMPH-induced locomotor effects with respective vehicle-treated groups. Indeed, AMPH-induced locomotor activity is always slightly

stronger in *Nur77* deficient mice. This had for consequence that the net effect of AMPH in both mouse strains remained similar. Our previous observation showing that *Nur77* deficient mice displayed consistent stronger horizontal locomotor responses (circling) to repeated L-DOPA treatment following unilateral dopamine system denervation in a model of Parkinson's disease in mice without altering the course of the locomotor sensitization to repeated L-DOPA administrations is also consistent with this observation (St-Hilaire et al. 2006).

It is important to notice that the effect of HX531 on AMPH-induced ambulatory activity was observed only after the third day of administration in wild type mice (see Fig. 3B), suggesting that some time is necessary for the effect of this antagonist to be effective. This might be consistent with an effect on gene transcription. *Nurr1* is a close homolog of *Nur77* that is selectively expressed in midbrain dopamine neurons (Zetterström et al. 1996). Interestingly, reduced *Nurr1* expression as observed in heterozygous *Nurr1* mice (*Nurr1*^{+/-}) provoked an increased sensitivity to AMPH-induced ambulatory activity (Rojas et al. 2007). This suggests that striatal *Nur77* and midbrain *Nurr1* might both participate in AMPH-induced locomotor activity.

Interestingly, RAR drugs (both synthetic agonist and antagonist) remained inactive in AMPH-induced locomotor activity. As described in the introduction section, the striatum expresses high levels of RAR β and RXR γ retinoid receptor isoforms (Krezel et al. 1999; Langlois et al. 2001; Zetterström et al. 1999). We have previously reported that RAR β 1-3 and RXR γ 1 transcripts co-localized to nearly 100% in striatal cells (Lévesque and Rouillard 2007). Thus, it would suggest that retinoid receptor activity (RAR-RXR) might be present within the striatum, as previously suggested from other reports (Krezel et al. 1998; 1999; Zetterström et al. 1999). But, we did not observe any effect of RAR drugs. Instead, we demonstrate that *Nur77* is needed for the expression of the effect of the synthetic RXR antagonist, similarly to what we have previously shown for antipsychotic drug-induced dyskinetic movements (Ethier et al. 2004b). Indeed, previous reports have demonstrated that *Nur77* and RXR can form functional heterodimers that display a

retinoid-dependent transcriptional activity (Mangelsdorf and Evans 1995; Perlmann and Jansson 1995). Thus, the present results do not support a role of a classic retinoid receptor (RAR-RXR) signaling in AMPH-induced ambulatory activity, but rather suggest the involvement of a *Nur77*-RXR complex. This is in contrast with previous results obtained in double RAR-RXR knockout mice, which displayed strong reduction of cocaine-induced locomotor activity (Krezel et al., 1998). It suggests that influence on striatal development and, for instance, dopamine receptor expression might be responsible for the modification of motor functions observed in these mice.

Reduction of vertical (rearing) activity induced by AMPH is consistent with the strong activation of ambulatory (horizontal) activity induced by the drug that competes with vertical exploratory activity. It is interesting to note that HX531 (RXR antagonist) reduced rearing activity. However, this effect is not dependent of *Nur77* since a similar effect is observed in *Nur77* knockout mice. Further exploration of the role of RXR on the exploratory behavior repertoire would be necessary in order to understand this observation, but suggests that RXR drugs might modulate exploratory behaviors when the animals are exposed to a novel environment.

In conclusion, the present study shows for the first time that RXR and *Nur77* participate in AMPH-induced ambulatory and stereotyped-like activities in mice and thus represent neural substrates for AMPH-induced locomotor activity, whereas selective RAR drugs remained without effect. Because RXR and *Nur77* are involved in the modulation of gene expression that can have prolonged and persistent effects over neuronal circuit activity, these transcription factors might play a role in long-term neuroadaptation related to psychostimulant drug taking. Consequently, this study prompts for further investigations on the role of *Nur77* and RXR in addiction and reward-related behaviors.

Disclosure/Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgements

We acknowledge support of grants from Canadian Institutes for Health Research (CIHR), the National Alliance for Research on Schizophrenia and Depression (NARSAD) and the Stanley Medical Research Institute (SMRI). DL holds a senior scholarship from the “Fonds de la Recherche en Santé du Québec” (FRSQ). EB and JM hold fellowships from the FRSQ and CIHR, respectively.

Table 1. Effects of selective retinoic acid receptor (RAR) and retinoid X receptor (RXR) drugs on basal and amphetamine (AMPH)-induced vertical activities in wild type (*Nur77*(+/+)) and *Nur77* deficient (-/-) mice.

Treatment	Vertical activity scores (rearing)/h	
	<i>Nur77</i> (+/+) mice	<i>Nur77</i> (-/-) mice
Vehicle:	33 ± 5	20 ± 5
HX531:	14 ± 4*	5 ± 4*
LE135:	23 ± 5	-
AM80:	26 ± 5	-
AMPH:	4 ± 1 **	9 ± 3*
AMPH + HX531:	1 ± 1 **	3 ± 2*
AMPH + LE135:	1 ± 1 **	-
AMPH + AM80:	3 ± 1 **	-

Values represent means ± SEM (N=10). Vertical activity scores represent numbers of beams of the second row that have been interrupted during the one-hour test session. These data were taken from locomotor activity recording following the 1st day of AMPH (2.5 mg/kg) administration. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs respective vehicle group (- : not performed).

References

- Amalric M, Koob GF (1993) Functionally selective neurochemical afferents and efferents of the mesocorticolimbic and nigrostriatal dopamine system. *Prog Brain Res* 99:209-226
- Beaudry G, Langlois M-C, Weppe I, Rouillard C, Lévesque D (2000) Contrasting patterns and cellular specificity of transcriptional regulation of the nuclear receptor Nerve Growth Factor-Inducible B by haloperidol and clozapine in the rat forebrain. *J Neurochem* 75:1694-1702
- Bhardwaj SK, Beaudry G, Quirion R, Lévesque D, Srivastava LK (2003) Neonatal ventral hippocampus lesion leads to reductions in Nerve Growth Factor Inducible-B mRNA in the prefrontal cortex and increased amphetamine response in the nucleus accumbens and dorsal striatum. *Neuroscience* 122:669-676
- Chambon P (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 10:940-954
- Dickson PR, Lang CG, Hinton SC, Kelley AE (1994) Oral stereotypy induced by amphetamine microinjection into striatum: an anatomical mapping study. *Neuroscience* 61:81-91
- Ebisawa M, Umemiya H, Ohta K, Fukasawa H, Kawachi E, Christoffel G, Gronemeyer H, Tsuji M, Hashimoto Y, Shudo K, Kagechika H (1999) Retinoid X receptor-antagonistic diazepinylbenzoic acids. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 47:1778-1786
- Ethier I, Beaudry G, St-Hilaire M, Milbrandt J, Rouillard C, Lévesque D (2004a) The transcription factor NGFI-B (*Nur77*) and retinoids play a critical role in acute neuroleptic-induced extrapyramidal effect and striatal neuropeptide gene expression. *Neuropsychopharmacology* 29:335-346
- Ethier I, Kagechika H, Shudo K, Rouillard C, Lévesque D (2004b) Docosahexaenoic acid reduces haloperidol-induced dyskinesias in mice: Involvement of *Nur77* and retinoid receptors. *Biol Psychiatry* 56:522-526

Fetsko LA, Xu R, Wang YY (2003) Alterations in D₁/D₂ synergism may account for enhanced stereotypy and reduced climbing in mice lacking dopamine D_{2L} receptor. *Brain Res* 967:191-200

Gilbert F, Morissette M, St-Hilaire M, Paquet B, Rouillard C, Di Paolo T, Lévesque D (2006) *Nur77* gene knockout alters dopamine neuron biochemical activity and dopamine turnover. *Biol Psychiatry* 60:538-547

Gonzalez-Nicolini V, McGinty JF (2002) Gene expression profile from the striatum of amphetamine-treated rats: a cDNA array and in situ hybridization histochemical study. *Brain Res Gene Expr Patterns* 1:193-198

Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ (2006) Neural mechanisms of addiction: The role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 29:565-598

Kagechika H, Kawachi E, Hashimoto Y, Shudo K (1984) New type inducers of differentiation of human HL-60 promyelocytic leukemia cells. Terephthalic anilides. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 32:4209-4212

Kagechika H, Shudo K (2005) Synthetic retinoids: recent developments concerning structure and clinical utility. *J Med Chem* 48:5875-5883

Krezel W, Ghyselinck N, Samad TA, Dupé V, Kastner P, Borrelli E, Chambon P (1998) Impaired locomotion and dopamine signaling in retinoid receptor mutant mice. *Science* 279:863-867

Krezel W, Kastner P, Chambon P (1999) Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system. *Neuroscience* 89:1291-1300

Langlois M-C, Beaudry G, Zekki H, Rouillard C, Lévesque D (2001) Impact of antipsychotic drug administration on the expression of nuclear receptors in the neocortex and striatum of the rat brain. *Neuroscience* 106:117-128

Lee SL, Wesselschmidt RL, Linette GP, Kanagawa O, Russell JH, Milbrandt J (1995) Unimpaired thymic and peripheral T cell death in mice lacking the nuclear receptor NGFI-B (*Nur77*). *Science* 269:532-535

Lévesque D, Rouillard C (2007) *Nur77* and retinoid X receptors: crucial factors in dopamine-related neuroadaptation. *Trends Neurosci* 30:22-30

Li Y, Hashimoto Y, Agadir A, Kagechika H, Zhang X (1999) Identification of a novel class of retinoic acid receptor β -selective retinoid antagonists and their inhibitory effects on AP-1 activity and retinoic acid-induced apoptosis in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 274:15360-15366

Maheux J, Ethier I, Rouillard C, Lévesque D (2005) Induction patterns of transcription factors of the *Nur* family (*Nurr1*, *Nur77* and *Nor-1*) by typical and atypical antipsychotics in the mouse brain: Implication for their mechanism of action. *J Pharmacol Exp Ther* 313:460-473

Mangelsdorf DJ, Evans RM (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83:841-850

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835-839

Mata de Urquiza A, Liu S, Sjöberg M, Zetterström RH, Griffiths W, Sjövall J, Perlmann T (2000) Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science* 290:2140-2144

Miyamoto S, Snouwaert JN, Koller BH, Moy SS, Lieberman JA, Duncan GE (2004) Amphetamine-induced Fos is reduced in limbic cortical regions but not in the caudate or accumbens in a genetic model of NMDA receptor hypofunction. *Neuropsychopharmacology* 29:2180-2188

Morita K, Kawana K, Sodeyama M, Shimomura L, Kagechika H, Makishima M (2005) Selective allosteric ligand activation of the retinoid X receptor heterodimers of NGFI-B and *Nurr1*. *Biochem Pharmacol* 71:98-107

Nestler EJ (2004) Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology* 47 (Suppl 1):24-32

Niculescu M, Ehrlich ME, Unterwald EM (2005) Age-specific behavioral responses to psychostimulants in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 82:280-288

Perlmann T, Jansson L (1995) A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev* 9:769-82

- Rojas P, Joodmardi E, Hong Y, Perlmann T, Ogren SO (2007) Adult mice with reduced *Nurr1* expression: an animal model for schizophrenia. *Mol Psychiatry* 12:756-766
- Saga Y, Kobayashi M, Ohta H, Murai N, Nakai N, Oshima M, Taketo MM (1999) Impaired extrapyramidal function caused by the targeted disruption of retinoid X receptor RXR γ 1 isoform. *Genes Cells* 4:219-228
- Shudo K, Kagechika H, Yamazaki N, Igarashi M, Tateda C (2004) A synthetic retinoid Am80 (tamibarotene) rescues the memory deficit caused by scopolamine in a passive avoidance paradigm. *Biol Pharm Bull* 27:1887-1889
- St-Hilaire M, Bourhis E, Lévesque D, Rouillard C (2006) Impaired behavioural and molecular adaptations to dopamine denervation and repeated L-DOPA treatment in *Nur77* knockout mice. *Eur J Neurosci* 24:795-805
- St-Hilaire M, Tremblay P-O, Lévesque D, Barden N, Rouillard C (2003) Effects of cocaine on *c-fos* and NGFI-B mRNA expression in transgenic mice underexpressing glucocorticoid receptors. *Neuropsychopharmacology* 28:478-489
- Valdenaire O, Maus-Moatti M, Vincent J-D, Mallet J, Vernier P (1998) Retinoic acid regulates the developmental expression of dopamine D₂ receptor in rat striatal primary cultures. *J Neurochem* 71:929-936
- Vezina P, Blanc G, Glowinski J, Tassin JP (1991) Opposed behavioural outputs of increased dopamine transmission in prefrontocortical and subcortical areas: a role for the cortical D-1 dopamine receptor. *Eur J Neurosci* 3:1001-1007
- Wallen-Mackenzie A, de Urquiza AM, Petersson S, Rodriguez FJ, Friling S, Wagner J, Ordentlich P, Lengqvist J, Heyman RA, Arenas E, Perlmann T (2003) *Nurr1*-RXR heterodimers mediate RXR ligand-induced signaling in neuronal cells. *Genes Dev* 17:3036-3047
- Werme M, Olson L, Brené S (2000) NGFI-B and *Nor1* mRNAs are upregulated in brain reward pathways by drugs of abuse: different effects in Fischer and Lewis rats. *Mol Brain Res* 76:18-24
- Yamauchi T, Waki H, Kamon J, Murakami K, Motojima K, Komeda K, Miki H, Kubota N, Terauchi Y, Tsuchida A, Tsuboyama-Kasaoka N, Yamauchi N, Ide T,

Hori W, Kato S, Fukayama M, Akanuma Y, Ezaki O, Itai A, Nagai R, Kimura S, Tobe K, Kagechika H, Shudo K, Kadowaki T (2001) Inhibition of RXR and PPAR γ ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes. *J Clin Invest* 108:1001-1013

Zetterström RH, Lindqvist E, de Urquiza AM, Tomac A, Eriksson U, Perlmann T, Olson L (1999) Role of retinoids in the CNS: differential expression of retinoid binding proteins and receptors and evidence for presence of retinoic acid. *Eur J Neurosci* 11:407-416

Zetterström RH, Williams R, Perlmann T, Olson L (1996) Cellular expression of the immediate-early transcription factors *Nurr1* and NGFI-B suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system. *Mol Brain Res* 41:111-120

Legends to figures

Figure 1. Comparison of spontaneous locomotor activities in *Nur77*(+/+) and (-/-) mice.

Wild type (+/+) and *Nur77* deficient (-/-) mice were placed individually in the Flex-Field apparatus and their locomotor activity was recorded for a 1-hour period. We evaluated ambulatory activity (**A**) or horizontal locomotor activity, non-ambulatory activity (**B**) and vertical activity (rearing) (**C**) (see material and methods for details). Histogram bars represent mean \pm SEM of respective locomotor activity scores average for the 1-hour period (* $p < 0.05$ vs *Nur77*(+/+) mice, N=20 per group).

Figure 2. Comparison of the effect of two doses of amphetamine in *Nur77*(+/+) and (-/-) mice.

Wild type (*Nur77*(+/+)) and *Nur77* deficient (*Nur77*(-/-)) mice were treated with the vehicle (VEH) or AMPH 2.5 mg/kg (i.p.) (**A,B**) or AMPH 5 mg/kg (**C,D**) for five consecutive days. Ambulatory (**A,C**) activity and non-ambulatory (**B,D**) activities were recorded after the first (Day 1) and the fifth injection (Day 5), respectively. Histogram bars represent mean \pm SEM ambulatory or non-ambulatory activity scores average for the 1-hour test session (In **A**: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs respective VEH-treated group, ++ $p < 0.01$ and +++ $p < 0.001$ vs respective Day 1; in **C**: *** $p < 0.001$ vs respective VEH-treated group, +++ $p < 0.001$ vs respective *Nur77*(+/+)-AMPH group; in **D**: * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs respective VEH-treated group, +++ $p < 0.001$ vs respective *Nur77*(+/+)-AMPH group, # $p < 0.05$ vs Day 1, N=8 per group).

Figure 3. Effect of the RXR antagonist HX531 on AMPH-induced ambulatory activity in *Nur77*(+/+) mice.

(**A**) Time-course of the effect of AMPH after the 1st and 5th injections. Groups of wild type mice received the vehicles (V-V), HX531 alone (20 mg/kg) (V-HX),

AMPH (2.5 mg/kg) (A-V) or AMPH plus HX531 (A-HX). Ambulatory activity is shown for the 1st and the 5th AMPH or vehicle injections and recorded for a 1-hour period. Data points represent ambulatory activity means \pm SEM of crossed photobeam for each 5-min interval at treatment day 1 and 5. **(B)** Development of the AMPH-induced locomotor sensitization. Mean ambulatory activity was measured for 5 consecutive days (sensitization phase). After each injection, mice were immediately placed individually in the Flex-Field apparatus and their ambulatory activity was recorded for a 1-hour period. Data points represent mean \pm SEM from averaged ambulatory activity for the 1-hour period (* $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs respective vehicle-treated group, ¶ $p < 0.05$ vs Day 1 treatment and #### $p < 0.001$ between A-V and A-HX groups according to an ANOVA for repeated measures, N=10 per group).

Figure 4. Effect of the RXR antagonist HX531 on AMPH-induced ambulatory activity in *Nur77*(-/-) mice.

(A) Time-course of the effect of AMPH after the 1st and 5th injections. Groups of *Nur77* deficient mice received the vehicles (V-V), HX531 alone (20 mg/kg) (V-HX), AMPH (2.5 mg/kg) (A-V) or AMPH plus HX531 (A-HX). Ambulatory activity is shown for the 1st and the 5th AMPH or vehicle injections and recorded for a 1-hour period. Data points represent ambulatory activity means \pm SEM of crossed photobeam for each 5-min interval at treatment day 1 and 5. **(B)** Development of the AMPH-induced locomotor sensitization. Mean ambulatory activity was measured for 5 consecutive days (sensitization phase). After each injection, mice were immediately placed individually in the Flex-Field apparatus and their ambulatory activity was recorded for a 1-hour period. Data points represent mean \pm SEM from averaged ambulatory activity for the 1-hour period (** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs respective vehicle-treated group and ¶ $p < 0.05$ vs Day 1 treatment, N=10 per group).

Figure 5. Effect of the RXR antagonist on AMPH-induced locomotor sensitization.

(A) Wild type (+/+) and (B) *Nur77* deficient (-/-) mice were treated with vehicles (V-V), HX531 alone (V-HX), AMPH (A-V) or AMPH + HX531 (A-HX) for 5 days (sensitization phase, presented in Figs. 3 and 4, respectively). Then, a drug free washout period of 5 day was performed. At day 11 all groups were challenged with AMPH (2.5 mg/kg, i.p.) (expression phase). Histogram bars represent mean \pm SEM from averaged ambulatory activity for a 1-hour period following AMPH administration (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$ vs V-V or V-HX group, N=10 per group).

Figure 6. Effect of RAR drugs on AMPH-induced ambulatory activity in *Nur77*(+/+) mice.

(A) Time-course of the effect of AMPH after the 1st and 5th injections. Groups of wild type mice received the vehicles (V-V), LE135 alone (5 mg/kg) (V-LE), AMPH (2.5 mg/kg) (A-V) or AMPH plus LE135 (A-LE). (B) Development of the AMPH-induced locomotor sensitization. Mean ambulatory activity was measured for 5 consecutive days (sensitization phase). After each injection, mice were immediately placed individually in the Flex-Field apparatus and their ambulatory activity was recorded for a 1-hour period (* $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs respective vehicle-treated group and ¶ $p < 0.05$ vs Day 1 treatment, N=10 per group). (C) Time-course of the effect of AMPH after the 1st and 5th injections. Groups of wild type mice received the vehicles (V-V), AM80 alone (5 mg/kg) (V-AM), AMPH (2.5 mg/kg) (A-V) or AMPH plus AM80 (A-AM). (D) Development of the AMPH-induced locomotor sensitization. Mean ambulatory activity was measured for 5 consecutive days (sensitization phase). After each injection, mice were immediately placed individually in the Flex-Field apparatus and their ambulatory activity was recorded for a 1-hour period (** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs respective vehicle-treated group and ¶ $p < 0.05$ vs Day 1 treatment, N=10 per group). In A and C, ambulatory activity was recorded after the 1st and the 5th AMPH or vehicle injections. Data points represent ambulatory activity means \pm SEM of crossed photobeam for each

5-min interval at treatment day 1 and 5. In **B** and **D**, Data points represent mean \pm SEM from averaged ambulatory activity for the 1-hour period.

Figure 7. Effect of RAR drugs on AMPH-induced locomotor sensitization.

Wild type mice were treated with vehicles (V-V), LE135 alone (V-LE) or AM80 alone (V-AM), AMPH (A-V), AMPH + LE135 (A-LE) (**A**) or AMPH + AM80 (A-AM) (**B**) for 5 days (sensitization phase, presented in Fig. 6). Then, a drug free washout period of 5 day was performed. At day 11 all groups were challenged with AMPH (2.5 mg/kg, i.p.) (expression phase). Histogram bars represent mean \pm SEM from averaged ambulatory activity for a 1-hour period following AMPH administration (* $p < 0.05$ vs V-V, V-LE or V-AM group, N=10 per group).

Figure 8. The HX531 compound did not displace [³H]raclopride specific binding to D₂ receptors.

We performed competition curves of [³H]raclopride binding to the D₂ receptor in striatal tissue homogenates. We displaced [³H]raclopride binding with quinpirole (filled circles), a potent D₂ receptor agonist, and HX531 (open circles), a synthetic RXR antagonist. Each data was performed in duplicate. IC₅₀ of quinpirole for [³H]raclopride binding displacement is 129 nM, which correspond to an inhibitory constant (K_i) of 36 nM (we used a K_d of 1.15 nM for raclopride at the D₂ receptor (Maheux et al. 2005) for the calculation). Non-specific binding was obtained in the presence of 1 μ M eticlopride. These competition curves are representative of 3 experiments with similar results performed separately.

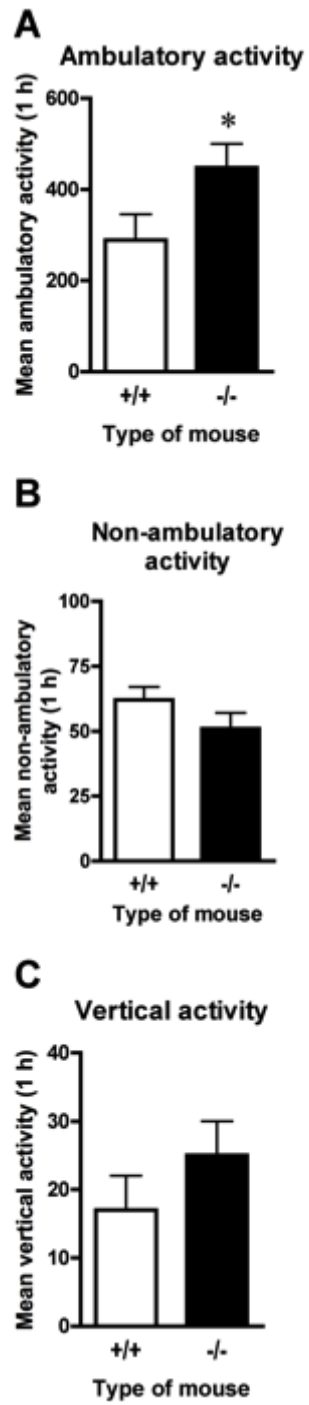


Figure 1

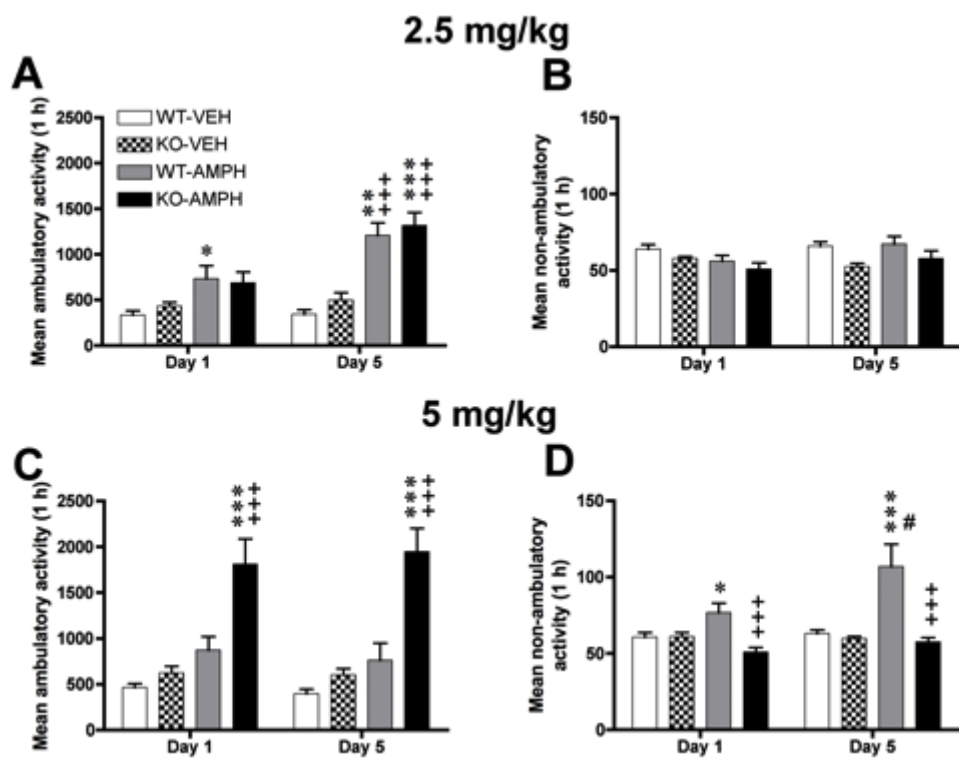


Figure 2

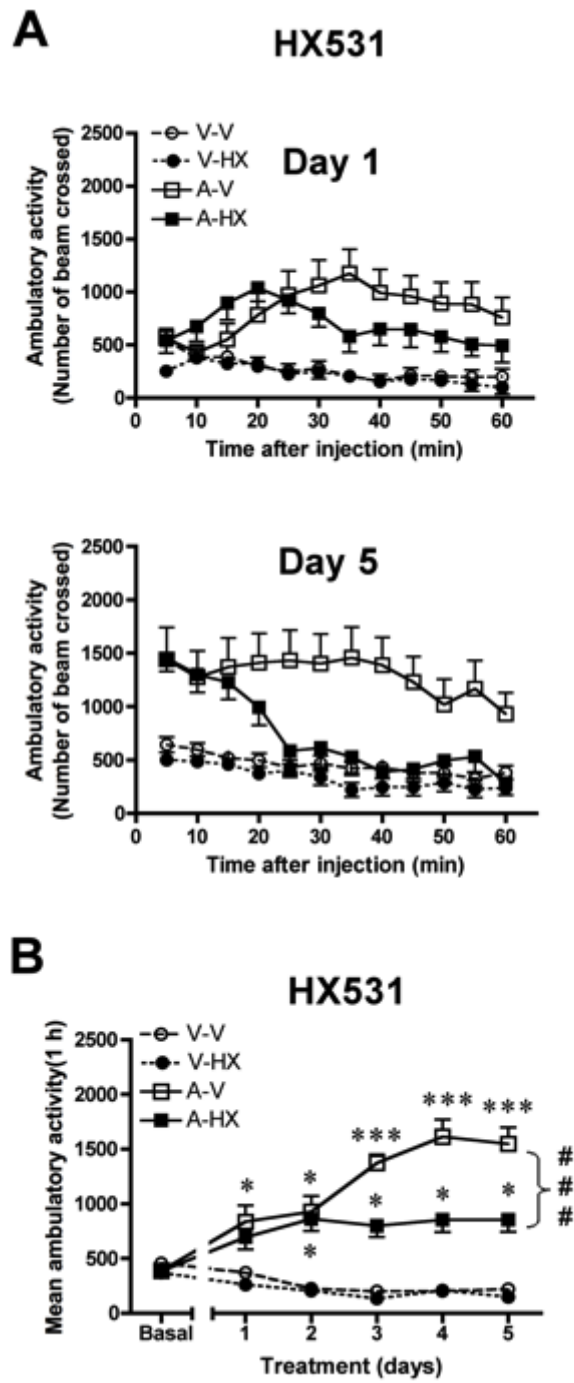


Figure 3

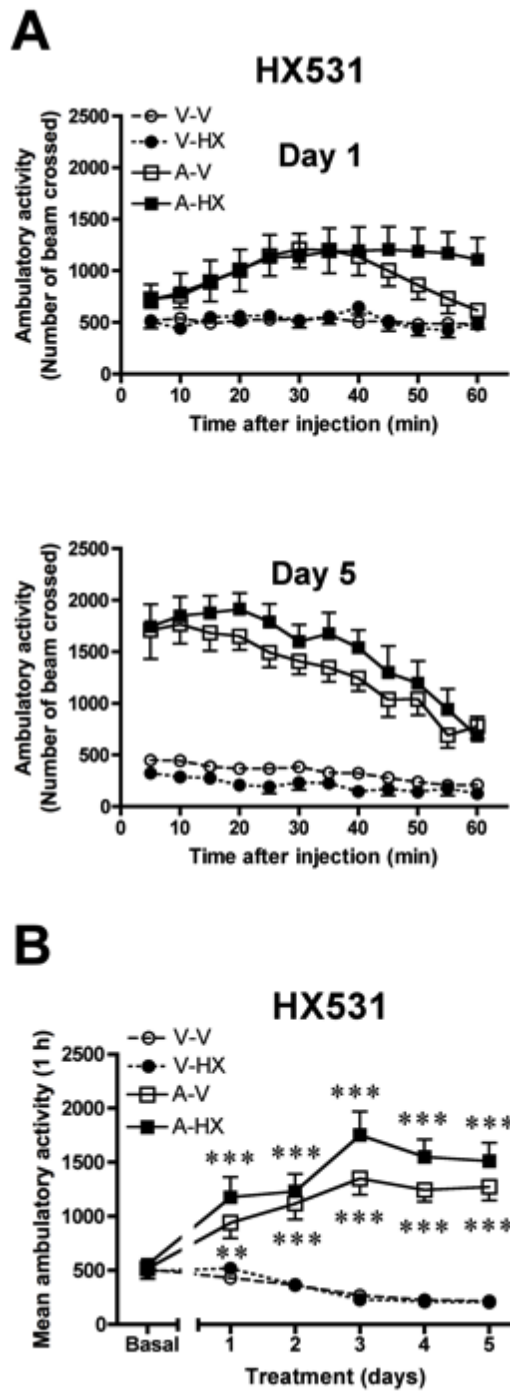


Figure 4

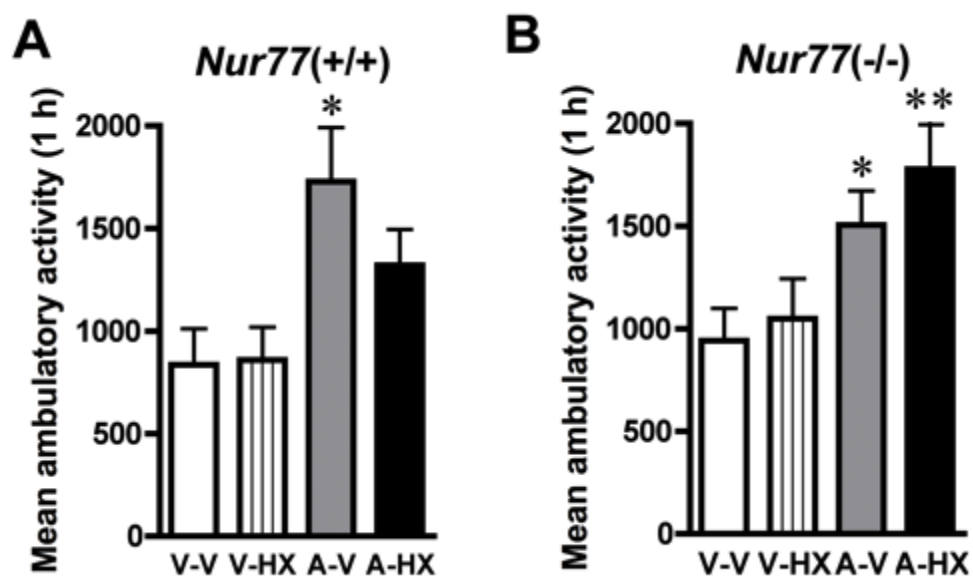
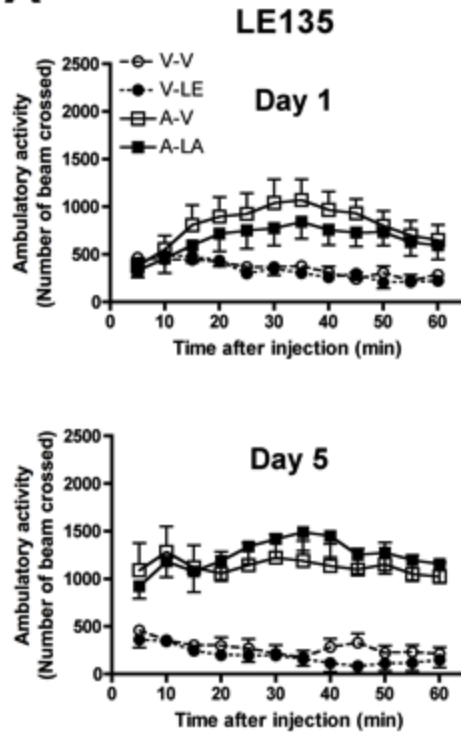
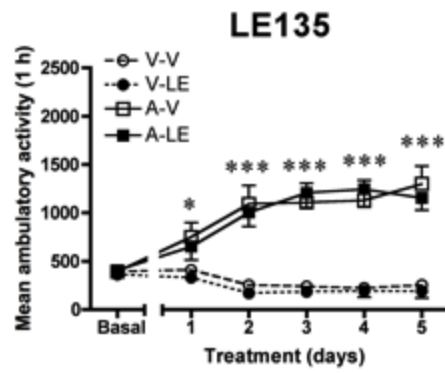


Figure 5

A**B**

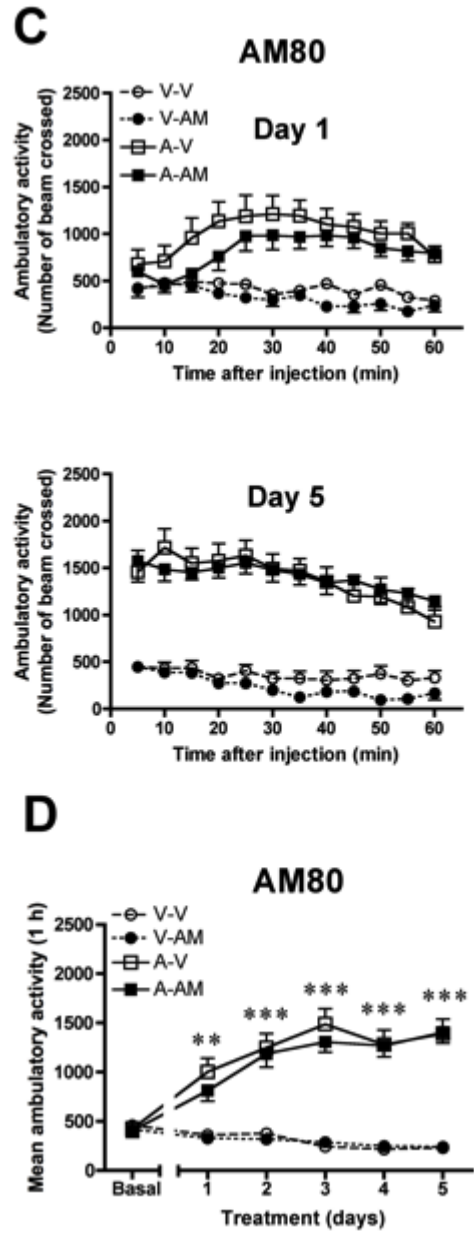


Figure 6

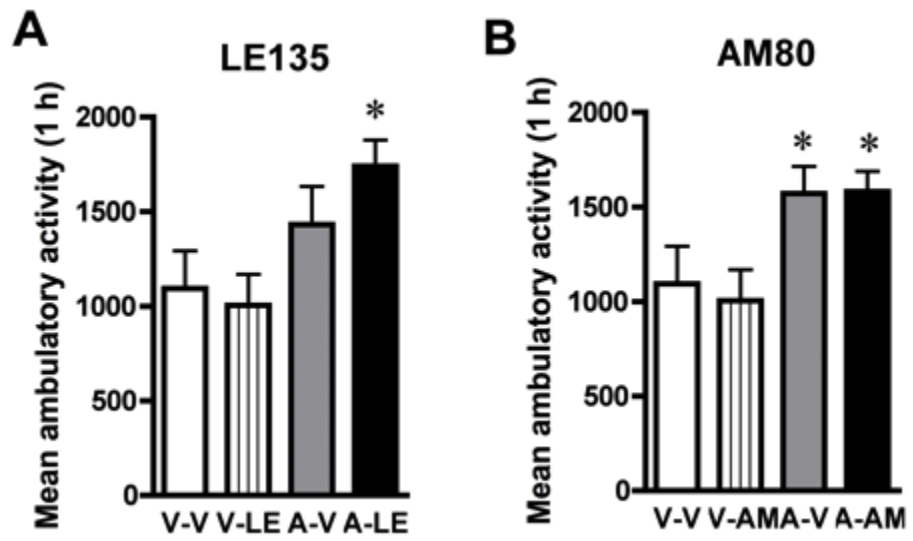


Figure 7

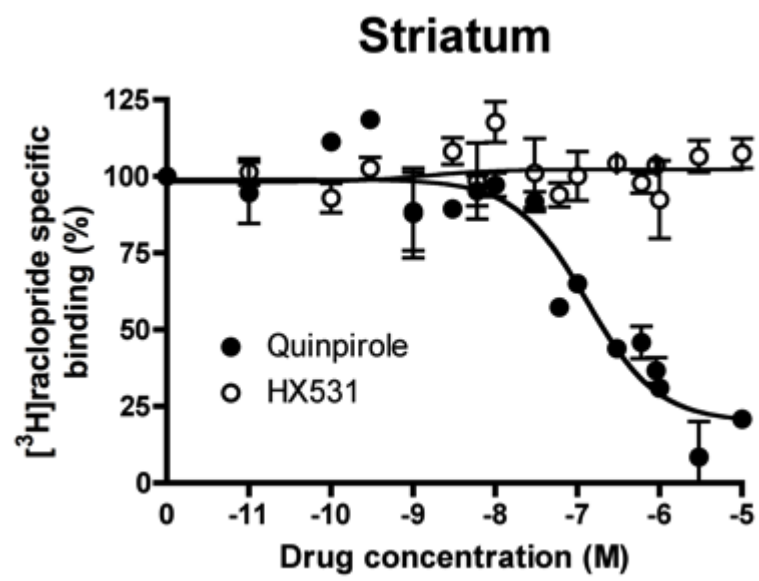


Figure 8

Chapitre 4 : résultats des voies signalétiques impliquées dans la modulation de l'expression de Nur77 et Nor-1

Ma contribution à cet article est de 100%, de la mise en place des protocoles expérimentaux aux figures qui sont dans l'article.

**EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASES
(ERK) AND PROTEIN KINASE C (PKC) ACTIVITIES
ARE INVOLVED IN THE MODULATION OF *NUR77*
AND *NOR-1* EXPRESSION BY DOPAMINERGIC
DRUGS**

**Emmanuelle Bourhis¹, Jérôme Maheux¹, Claude Rouillard² and Daniel
Lévesque¹***

*¹Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada and ² Unité de
Neuroscience, Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CHUQ) and Département de
Médecine, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, Qc, Canada.*

Correspondence should be addressed to Dr. Daniel Lévesque, Faculty of Pharmacy,
University of Montreal, Pavillon Jean-Coutu, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville,
Montreal, Qc, H3C 3J7, Tel. (514) 343-6339, Fax. (514) 343-7073,

Abbreviated title: Signalling cascades involved in the modulation of *Nur* expression

Keywords: NGFI-B, *Nurr1*, NR4A, dopamine D₁ receptor, dopamine D₂ receptor, Mitogen-associated protein kinases (MAPK), gene transcription, striatum, antipsychotic drugs, psychostimulants, *in situ* hybridization, catalepsy, locomotor activity

Abbreviations: AcC, nucleus accumbens core; AcSh, nucleus accumbens shell; cAMP, cyclic AMP; CC, cingulate cortex; CRE, cAMP-response element; CREB, cAMP-response element binding protein; CNS, central nervous system; ERK, Extracellular signal-regulated kinases; IEG, immediate-early gene; MAPK, Mitogen-associated protein kinase; MEF2, myocyte enhancing binding factor 2; MEK, MAPK- and ERK-related kinases; mGluR5, metabotropic glutamate receptor type 5; mPFC, medial prefrontal cortex; MSK, Mitogen- and Stress-regulated kinase; NMDA, N-methyl-D-aspartate; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; PLC, Phospholipase C; SN, substantia nigra; StDL, dorsolateral striatum; StDM, dorsomedial striatum; StVL, ventrolateral striatum; StVM, ventromedial striatum; VTA, ventral tegmental area

Abstract

The dopamine system is the main target of antipsychotic and psychostimulant drugs. These drugs induce intracellular events that culminate in the transcription of immediate early genes, such as *c-fos*. Another class of transcription factors, namely the nuclear receptor subgroup called *Nurs* (*Nur77*, *Nurr1* and *Nor-1*), has recently been associated with behavioural and biochemical effects mediated by dopamine. However, the signalling cascade leading to modulation of *Nur* mRNA levels in the brain has never been investigated. In the present study, we explore *in vivo* using specific kinase inhibitors the role of Mitogen-associated and Extracellular signal-regulated Kinases (MEK) and protein kinase C (PKC) in the modulation of *Nur* expression induced by dopamine receptor drugs. Modulation of *Nur77* expression by a dopamine D₂ receptor antagonist is associated with MEK and PKC activities, whereas only the PKC activity participates in the modulation of *Nor-1* expression. Both MEK and PKC activities also participate in the modulation of *Nur77* mRNA levels induced by dopamine receptor agonists, whereas a selective MEK activity is associated with the modulation of *Nor-1* mRNA levels. Interestingly, modulation of dopamine drug-induced locomotor activities by kinase inhibitors is in accordance with effects on *Nur77*, but not *Nor-1*, expression. Taken together, the results indicate that signalling events leading to modulation of *Nur77* and *Nor-1* expression following dopamine receptor interacting drugs are distinct. Considering that orphan nuclear receptors of the *Nur* subgroup display an important ligand-independent constitutive activity, characterization of the signalling cascades involved in the regulation of their expression represents an important step for understanding their role in dopamine system physiology and pathophysiology.

Introduction

The dopamine system is the main target of antipsychotic and psychostimulant drugs. Classically, administration of these drugs induces intracellular cascades that culminates in the transcription of genes such as the immediate early gene (IEG) *c-fos* in selective brain areas (Hyman *et al.* 2006). This initial step is essential to trigger neuroadaptive responses of these cell populations in order to restore homeostasis. Dopamine effects are mediated through its interaction with G-protein-coupled membrane receptors (reviewed in (Missale *et al.* 1998)). Dopamine D₁ receptors activation is coupled to adenylyl cyclase activity; resulting in an increase cyclic AMP (cAMP) levels and activation of protein kinase A (PKA). On the other hand, stimulation of the D₂ dopamine receptor leads to a decrease in adenylyl cyclase activity; resulting in reduced cAMP levels and a shutting off of PKA (Stoof and Kebabian 1981). Although the individual stimulation of D₁ and D₂ receptors results in opposing effects on the cAMP cascade, synergistic effects of concomitant stimulations of D₁ and D₂ receptors have been reported for striatal *c-fos* (Paul *et al.* 1992; Keefe and Gerfen 1995) and *Nur77* (St-Hilaire *et al.* 2003a) expression. This suggests that D₂ receptors might act through mechanisms other than the reduction of cAMP levels. One possibility is a mechanism involving an increase of intracellular calcium levels and activation of calcium-dependent protein kinase (PKC) pathways (Nishi *et al.* 1997). Indeed, activation of D₂ receptors can regulate gene expression through the Gq/PLCβ pathway, leading to an elevation of intracellular Ca²⁺ and activation of PKC and to the phosphorylation and activation of mitogen-associated protein kinases (MAPK) and cAMP response element binding protein (CREB) (Yan *et al.* 1999; Hernandez-Lopez *et al.* 2000). Dopamine D₁ receptor agonists can also regulate the MAPK signalling pathways *in vitro* (Vincent *et al.* 1998; Chen *et al.* 2004), whereas a coordinated stimulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate and dopamine D₁ receptors is required to stimulate phosphorylation of Extracellular signal-Regulated Kinases (ERK) *in vivo* (Valjent *et al.* 2005). Administration of psychostimulants such as cocaine or amphetamine, which are indirect dopamine agonists, also induced ERK phosphorylation (Valjent *et al.* 2000; 2005; Choe *et al.* 2002; Zhang *et al.* 2004; Shi and McGinty 2006). A tremendous body of evidence indicate that transcription factors of the Fos family (*c-fos*, FosB, ΔFosB and FRAs) are downstream targets of dopamine receptors (McClung *et al.*

2004). Amphetamine- and cocaine-evoked *c-fos* expression in the ventral striatum depends on the ERK/MAPK signalling cascade (Ferguson and Robinson 2004; Zhang *et al.* 2004; Shi and McGinty 2006). This signalling cascade is also the target of dopamine D₂ receptor antagonists, such as typical antipsychotic drugs (Konradi and Heckers 1995; Pozzi *et al.* 2003), which interestingly are also potent inducers of *c-fos* in the striatum (Robertson *et al.* 1994). In recent years, data supporting an important role for another IEG class of transcription factors in dopamine-mediated effects, namely the nuclear receptor subgroup called *Nurs*, have emerged (for a review see (Lévesque and Rouillard 2007)). *Nur77*, *Nurr1* and *Nor-1* are members of the nuclear hormone receptor superfamily and collectively they form the orphan NR4A subgroup (NR4A1: *Nur77* (also known as *NGFI-B*), NR4A2: *Nurr1* and NR4A3: *Nor-1*). The *Nurr1* transcript is mainly found in midbrain mesencephalic dopamine neurons of the substantia nigra (SN) and ventral tegmental area (VTA) (Zetterström *et al.* 1996). In basal conditions, *Nur77* and *Nor-1* are mainly expressed in target areas of dopamine neurons, such as the nucleus accumbens, striatum and prefrontal cortex (Zetterström *et al.* 1996; Beaudry *et al.* 2000; Werme *et al.* 2000a). Their mRNA levels are extremely low in midbrain dopamine neurons in basal conditions (Zetterström *et al.* 1996; Maheux *et al.* 2005). However, *Nur77* and *Nor-1* expression are significantly up-regulated in dopamine neurons of SN/VTA regions by the administration of D₂ antagonists (antipsychotic drugs) (Maheux *et al.* 2005). These drugs also strongly up-regulate *Nur77* and *Nor-1* expression in the striatum (Beaudry *et al.* 2000; Werme *et al.* 2000b; Maheux *et al.* 2005). Psychostimulants, as well as a combined treatment with a dopamine D₁ and D₂ agonists that reproduce most of the biochemical effects of psychostimulants, also up-regulate the expression of *Nur77* in the striatal complex (Werme *et al.* 2000a; Bhardwaj *et al.* 2003; St-Hilaire *et al.* 2003a; 2003b).

Nuclear receptors of the *Nur* subgroup display an important ligand-independent constitutive activity (Wilson *et al.* 1991; Philips *et al.* 1997; Wang *et al.* 2003). Therefore, modulation of their expression represents an important step for the regulation of their transcriptional activity and characterization of the signalling cascades involved in the regulation of their expression is crucial to understand their role. In cell cultures, transcriptions of *Nur77* and *Nor-1* are stimulated by forskolin treatment, a drug that activates PKA and phosphorylates CREB through an elevation of cAMP levels (Fass *et al.*

2003). In corticotroph-derived cell lines, both PKA and ERK are involved in the regulation of *Nur77* and *Nurr1* transcription (Kovalovsky *et al.* 2002), whereas in fibroblasts, mitogen- and stress-activated kinases (MSK), which act downstream to ERK, modulates *Nur77*, *Nurr1* and *Nor-1* expression (Darragh *et al.* 2005). These results suggest that multiple kinase activities can regulate *Nurs* transcription in different cell populations outside the brain. However, the signalling cascade leading to modulation of *Nur* mRNA levels in the central nervous system has never been investigated.

To explore *in vivo* the signalling cascade associated with the modulation of *Nur* expression by dopaminergic drugs, we studied the effects of two kinase inhibitors that are able to cross the blood brain barrier (SL327, a MAPK- and ERK-related kinases (MEK) inhibitor and NPC-15437, a PKC inhibitor) on the up-regulation of *Nur77*, *Nor-1* and *Nurr1* induced by a dopamine D₂ antagonist or by a combination of dopamine D₁ and D₂ agonists.

Materials and Methods

Drugs

The selective dopamine D₁ receptor agonist SKF82958 and the selective dopamine D₂ antagonist eticlopride were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO), whereas the selective dopamine D₂ receptor agonist quinpirole was bought from Tocris-Bioscience (Avonmouth, UK). The selective MEK inhibitor SL327 and the selective PKC inhibitor NPC-15437 were obtained from Tocris-Bioscience and Sigma-Aldrich, respectively. Sterile water was used as vehicle for SKF82958 (SKF), quinpirole (QUIN) and eticlopride (ETI). A mix of ethanol (10% of the total volume or 10% DMSO) and PEG 40% was used as vehicle for SL327, whereas NPC-15437 was dissolved in sterile phosphate-buffered saline (PBS).

Animals and treatments

All procedures, including means to minimize discomfort, were reviewed and approved by the University of Montreal and Laval University Animal Care Committees. Male wild type C57BL/6 mice were purchased from Charles River, Canada (St-Constant, Qc, Canada). Young adults male weighing 20-25 g were acutely treated with injections (0.25 ml, i.p.) of a combination of dopamine receptor agonists SKF82958 (1 mg/kg), a D₁ agonist, plus quinpirole (1.5 mg/kg), a D₂ agonist; or a D₂ antagonist, eticlopride (1 mg/kg) alone or in combination with SL327 (100 mg/kg), a selective MEK inhibitor. The same experimental paradigm was replicated with the PKC inhibitor NPC-15437 (4 mg/kg). Kinase inhibitors were injected 30 min before dopamine receptor agonists or antagonists. Previous studies have shown that these kinase inhibitors are able to penetrate into the brain after systemic injections (Valjent *et al.* 2000; 2005; Harlan *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2004; Shi and McGinty 2006) and to alter ERK1/2 phosphorylation (Valjent *et al.* 2000; Beaulieu *et al.* 2006). All drug dosages were based on previous reports (for dopaminergic drugs: (Pozzi *et al.* 2003; St-Hilaire *et al.* 2003a); for kinase inhibitors: (Valjent *et al.* 2000; Harlan *et al.* 2004)).

Phospho-ERK1/2 immunoreactivity

To evaluate the effect of kinase inhibitors, we measured activation of the ERK pathway using a selective antibody directed against a phosphorylated form of ERK. Groups of animals treated with the vehicles, combination of dopamine agonists (SKF82958, 1 mg/kg

and quinpirole, 1.5 mg/kg), the selective dopamine D₂ antagonist eticlopride (1 mg/kg), SKF82958/quinpirole plus SL327 (100 mg/kg), SKF82958/quinpirole plus NPC-15437 (4 mg/kg), eticlopride plus SL327 and eticlopride plus NPC-15437 were used. Fifteen minutes after drug treatment, animals were deeply anesthetized with ketamine/xylazine and immediately perfused transcardially with a 0.9 % NaCl saline solution followed by cold paraformaldehyde (4%) in phosphate buffer (0.1M, pH 7.4). Brains were removed and post-fixed in paraformaldehyde (4%) for 24 h and cryoprotected in a 20% sucrose solution for another 24 h. Brains were then cut on a cryostat (Leica model CM3050S, Leica Microsystems, Richmond Hill, ON, Canada) to obtain coronal slices (30 µm thick) and collected in PBS. Sections were rinsed 3 times in PBS and incubated in 3% H₂O₂ PBS solution 30 min then rinsed 3 times in PBS and incubated 1 h in the blockade solution (5% normal goat serum, 1% triton in PBS). After a 12 h incubation at 4°C with the specific antibody (pERK1/2 (p44/42, pThr²⁰²-pTyr²⁰⁴) 1:1000, Cell Signalling Technology, Danvers, MA), slices were rinsed 3 times with PBS and incubated 1 h with IgG (1:1000), rinsed with PBS, incubated 1 h in Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA), rinsed and revealed with a DAB solution (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO). After washes, slices were mounted on slides and cover-slipped with DPX mounting medium (Fluka, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO). Slides were examined with a Zeiss AXIO image A1. Images of pERK1/2 immunoreactivity in the ventral striatum (nucleus accumbens) were taken using a X10 objective and an AxioCam HRc digital imaging camera and software package (AxioVision, Zeiss, Gottingen, Germany). pERK1/2 immunoreactivity was quantified in these regions by counting the number of immunoreactive nuclei using ScionImage Software. In all cases, cell counts were performed on 3-4 sections per animal.

In situ hybridization

In another series of treatments, we measured the effect of dopamine receptor interacting drugs and kinase inhibitors on *Nur77*, *Nor-1* and *Nurr1* mRNA levels. Animals were killed by decapitation under CO₂ anaesthesia one hour after the administration of dopamine receptor agonists or antagonists. We have previously shown that this time point is optimal for measurement of *Nur* induction by dopaminergic drugs (Beaudry *et al.* 2000; St-Hilaire *et al.* 2003a; Maheux *et al.* 2005). Brains were rapidly removed and immediately immersed into cold isopentane (-40°C) for a few seconds and kept at -80°C

until used. *In situ* hybridization procedure for *Nur77*, *Nor-1* and *Nurr1* have been previously described in details (Maheux *et al.* 2005). Briefly, cryostat coronal brain sections (12 μ m) were mounted onto Snowcoat X-traTM slides (Surgipath, Winnipeg, MA, Canada) and stored at -80°C until used. Brain sections were fixed in 4% paraformaldehyde at 4°C for 20 min. Specific [³⁵S] UTP-radiolabeled complementary RNA (cRNA) probes were used. The *Nur* probes preparation and radiolabeling have been described in details elsewhere (Maheux *et al.* 2005). *In situ* hybridization of riboprobes with tissue sections were done at $56-58^{\circ}\text{C}$, overnight, in a standard hybridization buffer containing 50% formamide (Beaudry *et al.* 2000; Ethier *et al.* 2004b). Tissue sections were then apposed against BiomaxMR (Kodak, New Haven, CT) radioactive sensitive films for 2 to 10 days according to the transcript.

Levels of radioautographic labelling on films were quantified by computerized densitometry. Digitized brain images were obtained by a CCD camera model XC-77 (Sony) equipped with a 60 mm f/2.8D (Nikon) magnification lens. Images were analyzed using the ImageJ software (Wayne Rasband, NIH). Optical densities of autoradiograms were transformed to $\mu\text{Ci/g}$ of tissue using [¹⁴C] radioactivity standards (ARC 146A-¹⁴C standards, American Radiolabeled Chemicals Inc., St-Louis, MO). For *Nur77* and *Nor-1*, brain areas investigated included the dorsolateral (StDL), dorsomedial (StDM), ventrolateral (StVL) and ventromedial (StVM) portions of the striatum, the shell (AcSh) and core (AcC) of the nucleus accumbens, medial prefrontal (mPFC) and cingulate (CC) cortices, the substantia nigra (SN) and the ventral tegmental area (VTA). *Nurr1* mRNA levels were measured in the SN and VTA.

Ambulatory Activity

Effects of kinase inhibitors on ambulatory activity were investigated in groups of young adult male mice (n=8/group) weighing 20-25 g. A first group was treated with the dopamine agonist SKF82958 (1 mg/kg) and quinpirole (1.5 mg/kg) and a second group with the same dopamine receptor agonists but also with SL327 (100 mg/kg, injected 30 min before the dopamine receptor agonists). A third group was treated with dopamine agonists and NPC-15437 (4 mg/kg). Animals were injected in their home cage and immediately placed into locomotor activity chambers after the administration of the dopamine agonists. Total ambulatory or horizontal activity was assessed in a Flex Field apparatus (San Diego Instruments, San Diego, CA) equipped with a photobeam detection

device. Ambulatory activity was assessed for a 1-hour period following drug administration. Ambulatory activity counts represent the total number of interrupted beams computed at every 5 min and averaged for the entire 1-hour test session.

Catalepsy

Groups of young adult male mice (n=8/group) weighing 20-25 g were treated with eticlopride (1 mg/kg) alone or in combination with SL327 (100 mg/kg, injected 30 min before the D₂ receptor antagonist) or NPC-15437 (4 mg/kg). Catalepsy was measured 30 min following dopamine receptor antagonist administration. Catalepsy was measured by placing mice on a mesh wire grid inclined to an angle of 70°, as previously described (Ethier *et al.* 2004b). The catalepsy time was defined as the time for the mice to move all four paws. The test was performed for a maximal duration of 180 sec.

Statistical analysis

All data were expressed as group mean \pm SEM and statistical analysis was performed with « StatView 5.0 » (SAS Institute) program. Statistical analysis of mRNA level variances was performed using a one-way ANOVA. When a significant variance analysis was reported, a Bonferonni's test was performed as *post hoc* analysis. A value of $p < 0.05$ was considered for significance.

Results

Dopamine receptor drugs and kinase inhibitors modulate phospho-ERK levels

To evaluate the effect of kinase inhibitors, we measured activation of the ERK pathway using a selective antibody directed against a phosphorylated form of ERK. Activation of the ERK pathway induced by psychostimulant drugs is well documented (Valjent *et al.* 2005; 2006; Beaulieu *et al.* 2006). Although their main effect is to increase the level of dopamine in the synaptic cleft (indirect dopamine agonists), the effect of psychostimulant drugs is complex because they alter other neurotransmitter systems, such as serotonin and adrenergic neurotransmissions, in addition to dopamine. To test if direct dopamine receptor agonists can activate the ERK pathway, as previously observed with psychostimulants, we measured the level of ERK1/2 phosphorylation upon administration of a combination of D₁ plus D₂ dopamine receptor agonists. We also investigated the effect of a selective dopamine D₂ receptor antagonist. Our results show that both the D₂ receptor antagonist eticlopride and the combined quinpirole (D₂ agonist) and SKF82958 (D₁ agonist) administration significantly increased the number of pERK1/2-immunoreactive cells in the ventral striatum (nucleus accumbens) (Fig. 1). However, the induction associated with the dopamine D₂ antagonist (Fig. 1A) was smaller compared to the agonists (Fig. 1B). We did not detect significant pERK1/2 in dorsal portions of the striatum in our experimental conditions (not shown). Administration of the MEK inhibitor (SL327) significantly reduced the number of pERK1/2 cells detected induced by dopamine agonists or antagonist (Fig. 1). Interestingly, administration of the PKC inhibitor (NPC-15437) also significantly reduced the number of pERK1/2 positive cells induced by the D₂ antagonist (Fig. 1A), whereas it remained without effect on pERK1/2 levels induced by dopamine agonists (Fig. 1B).

The MEK and PKC inhibitors have contrasting effects on the modulation of Nur77 and Nor-1 expression induced by a dopamine D₂ receptor antagonist

Figure 2 shows representative autoradiograms of *Nur77*, *Nor-1* and *Nurr1* *in situ* hybridization signals in groups of animals treated with SL327. Brain areas showing strongest *Nur* modulations following dopamine receptor drug administration are presented in Figures 3 and 4. They included the ventrolateral portion of the striatum (StVL), shell of nucleus accumbens (AcSh) and substantia nigra (SN). In general but with few exceptions,

similar results were found in other striatal or accumbal subterritories but with different amplitudes (see in Tables 1 and 2). Administration of SL327 alone did not alter basal expression of *Nur77*, *Nor-1* or *Nurr1* in any of the brain structures examined (Figs. 3-5 and Tables 1, 2). On the other hand, the PKC inhibitor, NPC-15437 reduced basal *Nur77* expression in most of the brain structures examined (Fig. 3 and Table 1). Interestingly, contrasting effects of the two kinase inhibitors were observed in selective brain areas. Eticlopride administration significantly increased the expression of *Nur77* and *Nor-1* in the accumbal, striatal and SN territories (Fig. 3 and Tables 1, 2). Co-administration of SL327, the MEK inhibitor, with eticlopride significantly exacerbated the expression of *Nur77* in accumbal and striatal brain areas, except for the AcSh, StDM and SN territories (Fig. 3 left panels and Table 1). SL327 had no significant effect on eticlopride-induced *Nor-1* expression in the brain areas investigated (Fig. 3 right panels and Table 2). NPC-15437, the PKC inhibitor, decreased eticlopride-induced *Nur77* expression in striatal territories with the exception of the StVL and AcC regions (Fig. 3 left panels and Table 1). NPC-15437 also significantly reduced eticlopride-induced *Nor-1* expression in striatal territories (Fig. 3 right panels and Table 2). In summary, modulation of *Nur77* mRNA levels by eticlopride can be associated with both MEK and PKC activities, but in opposite directions, whereas modulation of *Nor-1* mRNA levels by the dopamine D₂ antagonist is selectively related to a PKC activity.

The MEK and PKC inhibitors have contrasting effects on the modulation of *Nur77* and *Nor-1* expression induced by a combination of D₁ + D₂ receptor agonists

Combined dopamine D₁ (SKF82958) and D₂ (quinpirole) agonist administration increased *Nur77* mRNA levels in accumbal, striatal and cortical territories, as previously reported in rats (St-Hilaire *et al.* 2003a), but not in the SN/VTA area (Fig. 4 left panels and Table 1). We also report, for the first time, modulation of *Nor-1* mRNA levels by dopamine agonists in accumbal and striatal territories (Fig. 4 right panels and Table 2). Co-administration of SL327 (MEK inhibitor) with the dopamine receptor agonists reduced the expression of *Nur77* in accumbal, striatal and cortical territories (Fig. 4 left panels and Table 1). NPC-15437 (PKC inhibitor) also reduced dopamine receptor agonist-induced *Nur77* expression in StVL, StDL and StDM striatal and cortical areas, but remained without effect in nucleus accumbens territories (Fig. 4 left panels and Table 1). On the other hand, SL327 reduced *Nor-1* mRNA levels induced by dopamine receptor agonists in

accumbal and striatal territories (Fig. 4 right panels and Table 2), whereas NPC-15437 remained inactive on dopamine receptor agonists-induced *Nor-1* expression (Fig. 4 right panels and Table 2). Concomitant administration of dopamine agonists and NPC-15437 strongly increased *Nor-1* expression in the SN (Fig. 4 lower right panel) and VTA (not shown). In summary, modulation of *Nur77* mRNA levels by dopamine agonists can also be associated with both MEK and PKC activities (in same directions), whereas modulation of *Nor-1* mRNA levels by dopamine agonists is selectively related to a MEK activity.

Effects of kinase inhibitors on *Nurr1* expression

Administration of these two kinase inhibitors alone did not alter basal expression of *Nurr1* in SN or VTA (Fig. 5). Eticlopride consistently induced *Nurr1* expression in the SN, while the effect of this D₂ antagonist remained inconsistent in the VTA (Fig. 5). Both kinase inhibitors tend to reduce eticlopride-induced *Nurr1* expression in the SN and VTA (Fig. 5). Note however, that magnitudes reached for *Nurr1* induction in the SN/VTA complex were very small compared to modulation of *Nur77* and *Nor-1* expression in these brain areas (compared SN levels in Fig. 5 with Fig. 3). Dopamine agonists did not alter *Nurr1* expression in SN/VTA areas (Fig. 5).

Effects of kinase inhibitors on dopamine-related locomotor activities

We investigated the effect of kinase inhibitors on the ambulatory activity induced by dopamine receptor agonists and cataleptic response produced by the D₂ receptor antagonist (Fig. 6). Administration of kinase inhibitors alone did not significantly alter basal locomotor responses (Fig. 6). Interestingly, the MEK inhibitor reduced ambulatory activity induced by the combined dopamine D₁ + D₂ receptor agonist treatment (Fig. 6A left panel), whereas it enhanced the cataleptic response induced by the dopamine D₂ antagonist eticlopride (Fig. 6B left panel). On the other hand, NPC-15437 (PKC inhibitor) reduced ambulatory activity induced by dopamine receptor agonists, while it remained without effect on eticlopride-induced catalepsy (Fig. 6 right panels).

Discussion

The present study shows for the first time that modulation of *Nur77* and *Nor-1* expression induced by dopaminergic drugs depends on the activity of kinase-regulated signalling cascades *in vivo*. Modulation of *Nur77* expression by a dopamine D₂ receptor antagonist is associated with both MEK and PKC activities, but in opposite directions, whereas modulation of *Nor-1* expression involved a PKC activity. On the other hand, modulation of *Nur77* mRNA levels by the combination of dopamine receptor agonists involved MEK and PKC activities, but in same directions, whereas a selective MEK activity is associated with the modulation of *Nor-1* mRNA levels. Taken together, the results indicate that signalling events leading to modulation of *Nur77* and *Nor-1* expression following dopamine receptor drugs are distinct. The relevance of these kinase pathways in dopamine-mediated effects is illustrated by the fact that the modulation of dopamine drug-induced locomotor activities by these kinase inhibitors is correlated with their effects on *Nur77* expression.

Outside the brain, *Nur77*, *Nurr1* and *Nor-1* transcriptions are up-regulated by similar stimuli (Saucedo-Cardenas *et al.* 1997; Kovalovsky *et al.* 2002; Darragh *et al.* 2005) and might be functionally redundant in some peripheral systems (Lee *et al.* 1995). In addition, we have shown that dopamine receptor drugs produce similar effects on *Nor-1* and *Nur77* expression in the striatal complex (nucleus accumbens and striatum) and SN/VTA ((Maheux *et al.* 2005) and present data). Thus, a distinct modulation of *Nur77* and *Nor-1* by the kinase inhibitors was somewhat surprising. However, two lines of evidence might support distinct regulatory pathways for individual members of the *Nur* subgroup in the CNS. First, in contrast to *Nur77* mouse promoter, *Nurr1* and *Nor-1* have one or more classical CRE sites in their promoters. Instead, *Nur77* possesses AP-1-like sequences that function as CRE and might mediate activation through interaction with CREB (Castillo *et al.* 1997; Darragh *et al.* 2005). Indeed, CREB is able to bind to an endogenous *Nur77* promoter *in vivo* (Impey *et al.* 2004). Other responsive elements that regulated *Nur* expression in peripheral cells such as Elk-1, myocyte enhancing binding factor 2 (MEF2) or NF- κ B might also contribute to distinct promoter responses between *Nur77* and *Nor-1*.

In addition, it has been shown that the ERK2 kinase can phosphorylate *Nur77* in primary cultures of striatal neurons, indicating that the MEK pathway can regulate *Nur77* activity at multiple levels (phosphorylation and transcription) (Castro-Obregon *et al.* 2004). However, additional works will be necessary in order to fully characterize signalling cascades involved in the regulation of *Nurs* at transcriptional levels.

Second, we have previously shown that *Nur77* can be associated with dopamine-related behavioural (catalepsy, dyskinesias) and biochemical (expression of striatal neurotensin and enkephalin neuropeptides) effects (Ethier *et al.* 2004b; 2004a; St-Hilaire *et al.* 2006). In the present study, the relevance of MEK and PKC activities in locomotor activities associated with dopamine receptor drugs is demonstrated by the fact that catalepsies induced by the D₂ receptor antagonist are exacerbated by SL327, whereas the locomotor activity induced by concomitant D₁ and D₂ receptor agonist administration is blocked by the two kinase inhibitors. These effects of kinase inhibitors on dopamine-mediated locomotor activities are in accordance with the modulation of *Nur77*, but not with *Nor-1*, expression. This supports our previous observation suggesting that *Nur77* and *Nor-1* might supply distinct functions in the mesoaccumbal and nigrostriatal dopamine systems (Lévesque and Rouillard 2007). Another interesting observation is that kinase inhibitors can have distinct effects between accumbal and striatal territories, suggesting that transcriptional regulation of *Nurs* induced by dopamine receptor drugs can also be regionally contrasted. Selective basal modulation of *Nur77* mRNA levels by the PKC inhibitor also supported distinct transcriptional control of *Nur77* and *Nor-1* expression. In addition, this suggests that a tonic calcium-dependent pathway regulated basal *Nur77* expression. This is consistent with preliminary data showing that administration of a glutamate NMDA antagonist (MK-801) strongly reduced basal *Nur77* mRNA levels (Maheux *et al.* 2007) as well as with previous reports on the regulation of *Nur77* in periphery (Youn *et al.* 1999; Kovalovsky *et al.* 2002). The apparent paradoxical modulation of *Nur77* by dopamine agonists and antagonists in the striatum can be explained by the fact that it appeared in two distinct cell populations. Dopamine D₂ antagonists modulate *Nur77* expression in striatal cells expressing the neuropeptide enkephalin (Beaudry *et al.* 2000), whereas combination of dopamine agonists induce *Nur77* mRNA levels in dynorphin-containing cells (St-Hilaire *et al.* 2003a).

A modulation of *Nur77* and *Nor-1* by the MEK inhibitor following dopamine receptor agonists is consistent with previous results showing that drugs of abuse activate ERK in ventral striatum and that the ERK pathway inhibition reduced locomotor activity induced by psychostimulants (Valjent *et al.* 2000; 2005; Zhang *et al.* 2004; Shi and McGinty 2006). In addition, it has been shown that the phosphorylation of CREB, a putative regulator of *Nur* transcription, induced by a psychostimulant is dependent on the activity of ERK (Brami-Cherrier *et al.* 2005). Activation of the ERK pathway by a dopamine D₂ antagonist has also been previously reported (Pozzi *et al.* 2003). On the other hand, the role of a PKC activity in dopamine receptor drug effects *in vivo* is not well documented. An intra-accumbens injection of NPC-15437 is able to block the amphetamine-induced conditioned place preference in rats (Aujla and Beninger 2003), whereas systemic NPC-15437 administration decreased morphine-induced up-regulation of striatal *c-fos* expression (Harlan *et al.* 2004). In periphery however, it has been shown that a PKC-dependent pathway can regulate *Nur77* expression in thymocytes (Kim *et al.* 2005). Interestingly, the PKC inhibitor strongly diminished D₂ antagonist-induced pERK levels, whereas it remained without effect on pERK induced by dopamine agonists. It suggests that D₂ antagonist-induced intracellular events involve convergent MEK and calcium-dependent activities for the modulation of *Nur77* expression.

Compelling evidence indicate that signalling cascades associated with dopamine receptor interacting drugs *in vivo* results from modulation of glutamate neurotransmission and activation of ionotropic and/or metabotropic glutamate receptors (Bamford *et al.* 2004; Valjent *et al.* 2005). Indeed, both dopamine D₂ receptor antagonist and psychostimulant drugs have been shown to modulate glutamate activities. For example, it has been shown that modulation of ERK activity and *c-fos* expression by psychostimulants is in fact associated with glutamate receptor activity (Konradi *et al.* 1996; Valjent *et al.* 2005). In the same spirit, blockade of dopamine D₂ heteroreceptors located on corticostriatal terminals modulates glutamate neurotransmission (Bamford *et al.* 2004). This increases the release of glutamate in the striatum and activates ionotropic (NMDA) and metabotropic (mGluR5) glutamate receptors that increases intracellular content of Ca²⁺ and Gq/PLC/PKC signalling pathways (Nakanishi 1994). Then, *in vivo* modulation of *Nur*

expression by dopamine receptor drugs might be in fact indirect through the modulation of glutamate neurotransmission (Maheux *et al.* 2007).

Although MEK and PKC inhibitors seem to modulate *Nurr1* expression in SN/VTA areas, data on this *Nur* member remain inconclusive because the magnitude of the modulation of *Nurr1* in these brain areas was very low with the D₂ antagonist and absent with dopamine agonists. However, the absence of effect of kinase inhibitors on basal *Nurr1* mRNA levels, which are quite high compared to basal expression of other *Nur* members, reveals that MEK and PKC activities might not regulate basal *Nurr1* expression.

In summary, our data shows that signalling cascades leading to the modulation of *Nur77* and *Nor-1* expression induced by dopamine receptor drug administration are distinct and support a non-redundant role for these transcription factors in the central dopamine system. Further studies will be necessary to fully characterize intracellular signalling events leading to the modulation of *Nur* expression in the brain. The present study shows however, for the first time, that *Nur* transcription can be associated with contrasting MEK and PKC activities in the central dopamine system. Considering that modulation of *Nur* expression represents an important step for the regulation of their transcriptional activity, characterization of signalling cascades involved in the regulation of *Nur* expression in response to perturbations of neurotransmission is crucial for understanding their role in brain dopamine system.

Acknowledgements

We thank Dr. Francesca Cicchetti for giving us access to her Flex Field apparatus. We acknowledge support grants from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR), Parkinson's Disease Foundation (PDF) of United States, National Alliance for Research on Schizophrenia and Depression (NARSAD), a senior scholarship from the "Fonds de la Recherche en Santé du Québec" (FRSQ) to D.L. and FRSQ studentships to E.B. and J.M..

Table 1. Effects of MEK and PKC inhibitors on *Nur77* expression induced by dopamine receptor drugs.

	VEH	SL327	NPC	ETI	SL327 + ETI	NPC + ETI	SKF/QUIN	SL327 + SKF/QUIN	NPC + SKF/QUIN
<i>Nur77</i> mRNA levels (% of vehicle)									
mPFC	100 ± 10	89 ± 9	77 ± 5	106 ± 10	120 ± 23	94 ± 7	157 ± 12 **	97 ± 19 ##	103 ± 4 ##
CC	100 ± 6	98 ± 8	63 ± 6 *	116 ± 18	100 ± 18	72 ± 3 ##	129 ± 3 *	93 ± 7 #	85 ± 8 ##
AcC	100 ± 17	62 ± 6	43 ± 8 *	151 ± 37	252 ± 40 **, #	119 ± 18	445 ± 8 **	287 ± 20 **, ##	417 ± 48 **
StDL	100 ± 8	55 ± 22	37 ± 3 *	649 ± 60 **	1010 ± 35 **, ##	224 ± 31 *, #	290 ± 26 **	117 ± 18 ##	176 ± 9 *, #
StDM	100 ± 8	141 ± 20	30 ± 4 *	483 ± 69 **	535 ± 79 **	82 ± 9 ##	261 ± 20 **	110 ± 13 #	119 ± 3 #
StVM	100 ± 47	68 ± 23	17 ± 4 *	234 ± 38 *	458 ± 77 **, #	99 ± 4 #	437 ± 20 **	150 ± 18 ##	495 ± 7 **

Abbreviations are: CC, cingulate cortex; mPFC, medial prefrontal cortex; AcC, nucleus accumbens core area; StDL, dorsolateral portion of the striatum; StDM, dorsomedial portion of the striatum; StVM, ventromedial portion of the striatum; VEH, vehicle group; SL327, MEK1/2 inhibitor; NPC, NPC-15437, PKC inhibitor; ETI, eticlopride; SKF + QUIN, SKF82958 + quinpirole. * p < 0.05 and ** p < 0.01 vs respective VEH groups; # p < 0.05 and ## p < 0.01 vs respective ETI or SKF/QUIN group (N=5).

Table 2. Effects of MEK and PKC inhibitors on *Nor-1* expression induced by dopamine receptor drugs.

	VEH	SL327	NPC	ETI	SL327 + ETI	NPC + ETI	SKF/QUIN	SL327 + SKF/QUIN	NPC + SKF/QUIN
<i>Nor-1</i> mRNA levels (% of vehicle)									
mPFC	100 ± 9	106 ± 16	74 ± 10	132 ± 7 *	111 ± 13	75 ± 5 #	137 ± 23	121 ± 15	116 ± 8
CC	100 ± 13	86 ± 8	68 ± 9	123 ± 16	118 ± 5	64 ± 6 #	124 ± 16	90 ± 16	102 ± 10
AcC	100 ± 19	78 ± 22	73 ± 18	199 ± 22 *	182 ± 27 *	198 ± 13 *	618 ± 142 *	201 ± 67 ##	586 ± 125 *
StDL	100 ± 25	198 ± 64	96 ± 36	1392 ± 230 **	1354 ± 252 **	669 ± 105 *, #	715 ± 95 **	165 ± 59 #	714 ± 167 **
StDM	100 ± 29	195 ± 59	50 ± 10	677 ± 37 **	518 ± 153 **	72 ± 14 ##	231 ± 41 *	101 ± 27 #	202 ± 44 *
StVM	100 ± 40	211 ± 99	37 ± 14	1235 ± 146 **	1113 ± 435 **	81 ± 18 ##	677 ± 88 *	293 ± 28 *, #	704 ± 185 *

Abbreviations are: CC, cingulate cortex; mPFC, medial prefrontal cortex; AcC, nucleus accumbens core area; StDL, dorsolateral portion of the striatum; StDM, dorsomedial portion of the striatum; StVM, ventromedial portion of the striatum; VEH, vehicle group; SL327, MEK1/2 inhibitor; NPC, NPC-15437, PKC inhibitor; ETI, eticlopride; SKF + QUIN, SKF82958 + quinpirole. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs respective VEH groups; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ vs respective ETI or SKF/QUIN group (N=5).

References

- Aujla H. and Beninger R. J. (2003) Intra-accumbens protein kinase C inhibitor NPC 15437 blocks amphetamine-produced conditioned place preference in rats. *Behav. Brain Res.* **147**, 41-48.
- Bamford N. S., Robinson S., Palmiter R. D., Joyce J. A., Moore C. and Meshul C. K. (2004) Dopamine modulates release from corticostriatal terminals. *J. Neurosci.* **24**, 9541-9552.
- Beaudry G., Langlois M.-C., Weppe I., Rouillard C. and Lévesque D. (2000) Contrasting patterns and cellular specificity of transcriptional regulation of the nuclear receptor Nerve Growth Factor-Inducible B by haloperidol and clozapine in the rat forebrain. *J. Neurochem.* **75**, 1694-1702.
- Beaulieu J. M., Sotnikova T. D., Gainetdinov R. R. and Caron M. G. (2006) Paradoxical striatal cellular signaling responses to psychostimulants in hyperactive mice. *J. Biol. Chem.* **281**, 32072-32080.
- Bhardwaj S. K., Beaudry G., Quirion R., Lévesque D. and Srivastava L. K. (2003) Neonatal ventral hippocampus lesion leads to reductions in Nerve Growth Factor Inducible-B mRNA in the prefrontal cortex and increased amphetamine response in the nucleus accumbens and dorsal striatum. *Neuroscience* **122**, 669-676.
- Brami-Cherrier K., Valjent E., Herve D., Darragh J., Corvol J. C., Pages C., Arthur S. J., Girault J. A. and Caboche J. (2005) Parsing molecular and behavioral effects of cocaine in mitogen- and stress-activated protein kinase-1-deficient mice. *J. Neurosci.* **25**, 11444-11454.
- Castillo S. O., Xiao Q., Lyu M. S., Kozak C. A. and Nikodem V. M. (1997) Organization, sequence, chromosomal localization, and promoter identification of the mouse orphan nuclear receptor Nurr1 gene. *Genomics* **41**, 250-257.
- Castro-Obregon S., Rao R. V., del Rio G., Chen S. F., Poksay K. S., Rabizadeh S., Vesce S., Zhang X. K., Swanson R. A. and Bredesen D. E. (2004) Alternative, nonapoptotic programmed cell death: mediation by arrestin 2, ERK2, and Nur77. *J. Biol. Chem.* **279**, 17543-17553.

- Chen J., Rusnak M., Luedtke R. R. and Sidhu A. (2004) D₁ dopamine receptor mediates dopamine-induced cytotoxicity *via* the ERK signal cascade. *J. Biol. Chem.* **279**, 39317-39330.
- Choe E. S., Chung K. T., Mao L. and Wang J. Q. (2002) Amphetamine increases phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and transcription factors in the rat striatum *via* group I metabotropic glutamate receptors. *Neuropsychopharmacology* **27**, 565-575.
- Darragh J., Soloaga A., Beardmore V. A., Wingate A. D., Wiggin G. R., Peggie M. and Arthur J. S. C. (2005) MSKs are required for the transcription of the nuclear orphan receptors *Nur77*, *Nurr1* and *Nor1* downstream of MAPK signalling. *Biochem. J.* **390**, 749-759.
- Ethier I., Kagechika H., Shudo K., Rouillard C. and Lévesque D. (2004a) Docosahexaenoic acid reduces haloperidol-induced dyskinesias in mice: Involvement of *Nur77* and retinoid receptors. *Biol. Psychiatry* **56**, 522-526.
- Ethier I., Beaudry G., St-Hilaire M., Milbrandt J., Rouillard C. and Lévesque D. (2004b) The transcription factor NGFI-B (*Nur77*) and retinoids play a critical role in acute neuroleptic-induced extrapyramidal effect and striatal neuropeptide gene expression. *Neuropsychopharmacology* **29**, 335-346.
- Fass D. M., Butler J. E. and Goodman R. H. (2003) Deacetylase activity is required for cAMP activation of a subset of CREB target genes. *J. Biol. Chem.* **278**, 43014-43019.
- Ferguson S. M. and Robinson T. E. (2004) Amphetamine-evoked gene expression in striatopallidal neurons: regulation by corticostriatal afferents and the ERK/MAPK signaling cascade. *J. Neurochem.* **91**, 337-348.
- Harlan R. E., Kailas S. R., Tagoe C. E. and Garcia M. M. (2004) Morphine actions in the rat forebrain: role of protein kinase C. *Brain Res. Bull.* **62**, 285-295.
- Hernandez-Lopez S., Tkatch T., Perez-Garci E., Galarraga E., Bargas J., Hamm H. and Surmeier D. J. (2000) D₂ dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability *via* a novel PLCβ1-IP₃-calcineurin-signaling cascade. *J. Neurosci.* **20**, 8987-8995.
- Hyman S. E., Malenka R. C. and Nestler E. J. (2006) Neural mechanisms of addiction: The role of reward-related learning and memory. *Annu. Rev. Neurosci.* **29**, 565-598.

- Impey S., McCorkle S. R., Cha-Molstad H., Dwyer J. M., Yochum G. S., Boss J. M., McWeeney S., Dunn J. J., Mandel G. and Goodman R. H. (2004) Defining the CREB regulon: A genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions. *Cell* **119**, 1041-1054.
- Keefe K. A. and Gerfen C. R. (1995) D₁-D₂ dopamine receptor synergy in striatum: effects of intrastriatal infusions of dopamine agonists and antagonists on immediate early gene expression. *Neuroscience* **66**, 903-913.
- Kim H., Lee J. E., Kim B. Y., Cho E. J., Kim S. T. and Youn H. D. (2005) Menin represses JunD transcriptional activity in protein kinase C theta-mediated *Nur77* expression. *Exp. Mol. Med.* **37**, 466-475.
- Konradi C. and Heckers S. (1995) Haloperidol-induced Fos expression in striatum is dependent upon transcription factor cyclic AMP response element binding protein. *Neuroscience* **65**, 1051-1061.
- Konradi C., Leveque J. C. and Hyman S. E. (1996) Amphetamine and dopamine-induced immediate early gene expression in striatal neurons depends on postsynaptic NMDA receptors and calcium. *J. Neurosci.* **16**, 4231-4239.
- Kovalovsky D., Refojo D., Liberman A. C., Hochbaum D., Paez-Pereda M., Coso O. A., Stalla G. K., Holsboer F. and Arzt E. (2002) Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: Involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. *Mol. Endocrinol.* **16**, 1638-1651.
- Lee S. L., Wesselschmidt R. L., Linette G. P., Kanagawa O., Russell J. H. and Milbrandt J. (1995) Unimpaired thymic and peripheral T cell death in mice lacking the nuclear receptor NGFI-B (*Nur77*). *Science* **269**, 532-535.
- Lévesque D. and Rouillard C. (2007) *Nur77* and retinoid X receptors: crucial factors in dopamine-related neuroadaptation. *Trends Neurosci.* **30**, 22-30.
- Maheux J., Ethier I., Rouillard C. and Lévesque D. (2005) Induction patterns of transcription factors of the *Nur* family (*Nurr1*, *Nur77* and *Nor-1*) by typical and atypical antipsychotics in the mouse brain: Implication for their mechanism of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **313**, 460-473.
- Maheux J., St-Hilaire M., Bourhis E., Rouillard C. and Lévesque D. (2007) Induction of the transcription of *Nur77* by dopamine D₂ receptor antagonists is dependent on

glutamate and adenosine receptors. *Program No. 676.2 2007 Neuroscience Meeting Planner* San Diego, CA, *Society for Neuroscience*, 2007, Online.

McClung C. A., Ulery P. G., Perrotti L. I., Zachariou V., Berton O. and Nestler E. J. (2004) Δ FosB: a molecular switch for long-term adaptation in the brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **132**, 146-154.

Missale C., Nash S. R., Robinson S. W., Jaber M. and Caron M. G. (1998) Dopamine receptors: From structure to function. *Physiol. Rev.* **78**, 189-225.

Nakanishi S. (1994) Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation, and plasticity. *Neuron* **13**, 1031-1037.

Nishi A., Snyder G. L. and Greengard P. (1997) Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine. *J. Neurosci.* **17**, 8147-8155.

Paul M. L., Graybiel A. M., David J.-C. and Robertson H. A. (1992) D1-like and D2-like dopamine receptors synergistically activate rotation and *c-fos* expression in the dopamine-depleted striatum in a rat model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* **12**, 3729-3742.

Philips A., Lesage S., Gingras R., Maira M.-H., Gauthier Y., Hugo P. and Drouin J. (1997) Novel dimeric *Nur77* signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5946-5951.

Pozzi L., Hakansson K., Usiello A., Borgkvist A., Lindskog M., Greengard P. and Fisone G. (2003) Opposite regulation by typical and atypical anti-psychotics of ERK1/2, CREB and Elk-1 phosphorylation in mouse dorsal striatum. *J. Neurochem.* **86**, 451-459.

Robertson G. S., Matsumura H. and Fibiger H. C. (1994) Induction patterns of Fos-like immunoreactivity in the forebrain as predictors of atypical antipsychotic activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **271**, 1058-1066.

Saucedo-Cardenas O., Kardon R., Ediger T. R., Lydon J. P. and Conneely O. M. (1997) Cloning and structural organization of the gene encoding the murine nuclear receptor transcription factor, NURR1. *Gene* **187**, 135-139.

Sheng M. and Greenberg M. E. (1990) The regulation and function of *c-fos* and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* **4**, 477-485.

Shi X. and McGinty J. F. (2006) Extracellular signal-regulated mitogen-activated protein kinase inhibitors decrease amphetamine-induced behavior and neuropeptide gene expression in the striatum. *Neuroscience* **138**, 1289-1298.

St-Hilaire M., Landry É., Lévesque D. and Rouillard C. (2003a) Denervation and repeated L-DOPA induce a coordinate expression of the transcription factor NGFI-B in striatal projection pathways in hemi-parkinsonian rats. *Neurobiol. Dis.* **14**, 98-109.

St-Hilaire M., Bourhis E., Lévesque D. and Rouillard C. (2006) Impaired behavioural and molecular adaptations to dopamine denervation and repeated L-DOPA treatment in *Nur77* knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* **24**, 795-805.

St-Hilaire M., Tremblay P.-O., Lévesque D., Barden N. and Rouillard C. (2003b) Effects of cocaine on *c-fos* and NGFI-B mRNA expression in transgenic mice underexpressing glucocorticoid receptors. *Neuropsychopharmacology* **28**, 478-489.

Stoof J. C. and Kebabian J. W. (1981) Opposing roles of D₁ and D₂ dopamine receptors in efflux of cyclic AMP from rat neostriatum. *Nature* **294**, 366-368.

Valjent E., Corvol J. C., Trzaskos J. M., Girault J. A. and Hervé D. (2006) Role of the ERK pathway in psychostimulant-induced locomotor sensitization. *BMC Neurosci.* **7**, 20.

Valjent E., Corvol J.-C., Pagès C., Besson M.-J., Maldonado R. and Caboche J. (2000) Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. *J. Neurosci.* **20**, 8701-8709.

Valjent E., Pascoli V., Svenningsson P., Paul S., Enslen H., Corvol J.-C., Stipanovich A., Caboche J., Lombroso P. J., Nairn A. C., Greengard P., Hervé D. and Girault J.-A. (2005) Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 491-496.

Vincent S. R., Sebben M., Dumuis A. and Bockaert J. (1998) Neurotransmitter regulation of MAP kinase signaling in striatal neurons in primary culture. *Synapse* **29**, 29-36.

Wang Z., Benoit G., Liu J., Prasad S., Aarnisalo P., Liu X., Xu H., Walker N. P. and Perlmann T. (2003) Structure and function of *Nurr1* identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* **423**, 555-560.

Werme M., Olson L. and Brené S. (2000a) NGFI-B and *Nor1* mRNAs are upregulated in brain reward pathways by drugs of abuse: different effects in Fischer and Lewis rats. *Mol. Brain Res.* **76**, 18-24.

- Werme M., Ringholm A., Olson L. and Brené S. (2000b) Differential patterns of induction of NGFI-B, *Nor1* and *c-fos* mRNAs in striatal subregions by haloperidol and clozapine. *Brain Res.* **863**, 112-119.
- Wilson T. E., Fahrner T. J., Johnston M. and Milbrandt J. (1991) Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science* **252**, 1296-1300.
- Yan Z., Feng J., Fienberg A. A. and Greengard P. (1999) D₂ dopamine receptors induce mitogen-activated protein kinase and cAMP response element-binding protein phosphorylation in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11607-11612.
- Youn H. D., Sun L., Prywes R. and Liu J. O. (1999) Apoptosis of T cells mediated by Ca²⁺-induced release of the transcription factor MEF2. *Science* **286**, 790-793.
- Zetterström R. H., Williams R., Perlmann T. and Olson L. (1996) Cellular expression of the immediate-early transcription factors *Nurr1* and NGFI-B suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system. *Mol. Brain Res.* **41**, 111-120.
- Zhang L., Lou D. W., Jiao H. Y., Zhang D. S., Wang X. K., Xia Y., Zhang J. H. and Xu M. (2004) Cocaine-induced intracellular signaling and gene expression are oppositely regulated by the dopamine D₁ and D₃ receptors. *J. Neurosci.* **24**, 3344-3354.

Figure legends

Figure 1.

(A) Dopamine receptor drugs induced ERK1/2 phosphorylation in the ventral striatum (nucleus accumbens). Photomicrographs illustrate pERK1/2 immunoreactivity in coronal brain slices from animals treated with the vehicle (VEH), the dopamine D₂ antagonist eticlopride (ETI), ETI + SL327 (SL) or ETI + NPC-15437 (NPC). (B) Photomicrographs illustrate pERK1/2 immunoreactivity in coronal brain slices from animals treated with the vehicle (VEH), the combination of dopamine D₁ and D₂ receptor agonists SKF 82958 and quinpirole (SKF/QUIN), SKF/QUIN + SL327 or SKF/QUIN + NPC-15437. Histogram bars represent mean \pm SEM of total number of immunoreactive cells within the shell of nucleus accumbens (AcSh), as illustrated in the diagram. Immunoreactive cells were manually counted in 3-4 sections per animal (n=4-5/group). Scale bar, 500 μ m.

Figure 2.

Representative autoradiograms generated with specific ³⁵S-UTP-labelled *Nur77*, *Nor-1* and *Nurr1* mRNA probes after *in situ* hybridization in mouse brain sections from vehicle, SL327, eticlopride, eticlopride plus SL327, SKF 82958 plus quinpirole and SKF 82958 plus quinpirole added with SL327. Kinase inhibitors were administered 30 min before dopamine drugs and animals were sacrificed 1 h after dopamine drug administration.

Figure 3.

Modulation of dopamine D₂ antagonist-induced *Nur77* and *Nor-1* mRNA levels by the MEK and PKC kinase inhibitors. Inductions of *Nur77* (in % of control, left panels) and *Nor-1* (right panels) transcripts were measured in nucleus accumbens shell (AcSh), ventrolateral portion of the striatum (StVL) and substantia nigra (SN) following eticlopride (ETI) administration with and without SL327, a MEK inhibitor, or NPC-

15437, a PKC inhibitor. Histogram bars represent mean \pm SEM. Middle panels represent the area corresponding to the brain region investigated (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs respective VEH groups and ## $p < 0.01$ vs ETI respective group, $n=5$). Effects of kinase inhibitors in other brain areas are presented in Tables 1 and 2.

Figure 4.

Modulation of dopamine agonists-induced *Nur77* and *Nor-1* mRNA levels by the MEK and PKC kinase inhibitors. Inductions of *Nur77* (% of control, left panels) and *Nor-1* (right panels) transcripts were measured in nucleus accumbens shell neurons (AcSh), ventrolateral striatum portion (StVL) and substantia nigra (SN) following SKF82958 (SKF), a D₁ receptor agonist, and quinpirole (QUIN), a D₂ receptor agonist, with and without a MEK inhibitor (SL327) or a PKC inhibitor (NPC-15437). Histogram bars represent mean \pm SEM. Middle panels represent the area corresponding to the brain region investigated (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs respective VEH groups and ## $p < 0.01$ vs SKF/QUIN respective group, $n=5$). Effects of kinase inhibitors in other brain areas are presented in Tables 1 and 2.

Figure 5.

Modulation of dopamine interacting drug-induced *Nurr1* mRNA levels by the MEK and PKC kinase inhibitors. Modulation of *Nurr1* expression following administration of the D₂ antagonist eticlopride (ETI, left panels) or SKF82958 (SKF), a D₁ agonist, and quinpirole (QUIN, right panels), a D₂ agonist, were measured in substantia nigra (SN) and ventral tegmental area (VTA). Histogram bars represent mean \pm SEM. Middle panels represent the area corresponding to the brain region investigated (* $p < 0.05$ vs VEH group, $n=5$).

Figure 6.

Modulation of dopamine receptor drug-induced locomotor activities by the MEK and PKC kinase inhibitors. **A)** Effects of SL327 and NPC-15437 on ambulatory activity induced by concomitant administration of SKF82958 (SKF), a D₁ agonist, and

quinpirole (QUIN), a D₂ agonist. Total ambulatory activity was recorded for 1 hour. Histogram bars represent mean ± SEM (* p < 0.05 vs vehicle (VEH) group and # p < 0.05 vs SKF/QUIN group, N=8/group). **B)** Effects of SL327 and NPC-15437 on the cataleptic response induced by the D₂ antagonist eticlopride (ETI). Catalepsy times were measured 30 min after administration of the D₂ antagonist. Histogram bars represent mean ± SEM (* p < 0.05 and ** p < 0.01 vs VEH group and ## p < 0.01 vs ETI group, n=8/group). Kinase inhibitors were administered 30 min before dopamine receptor drugs.

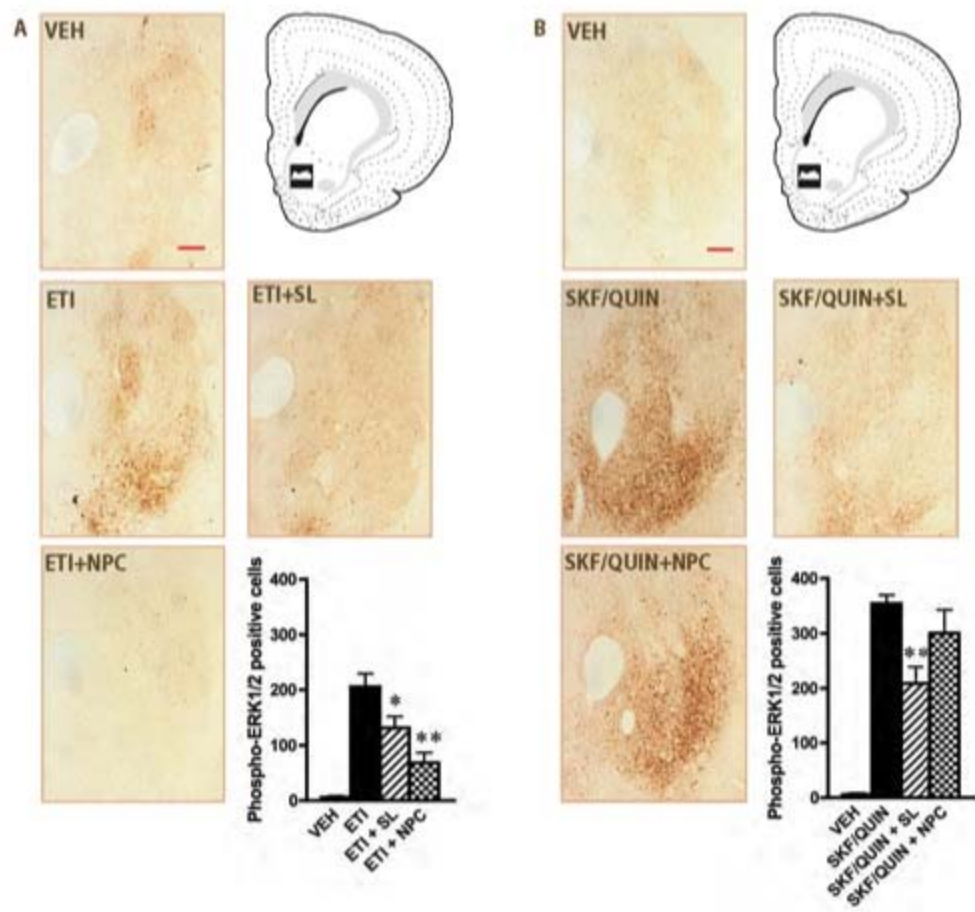


Figure 1

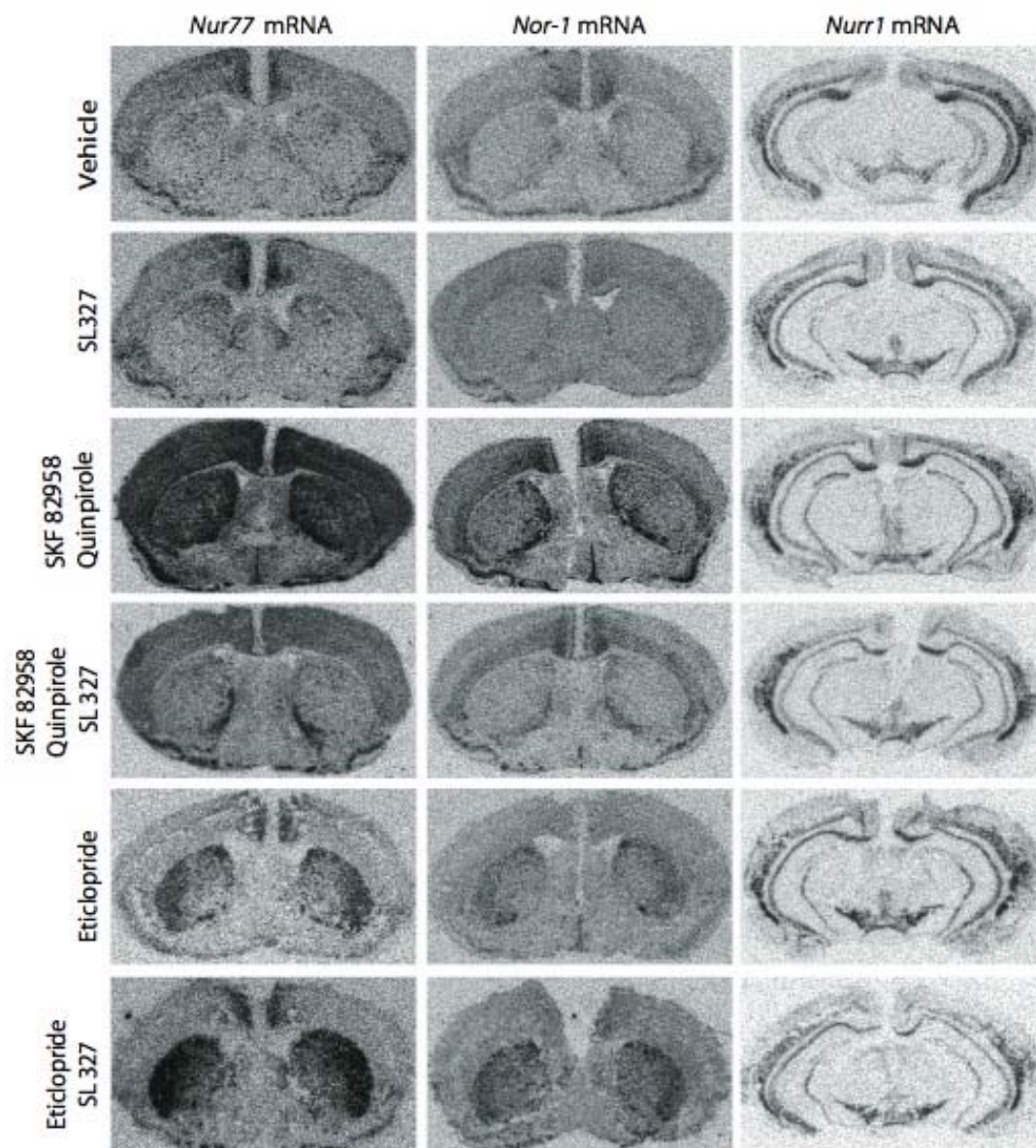


Figure 2

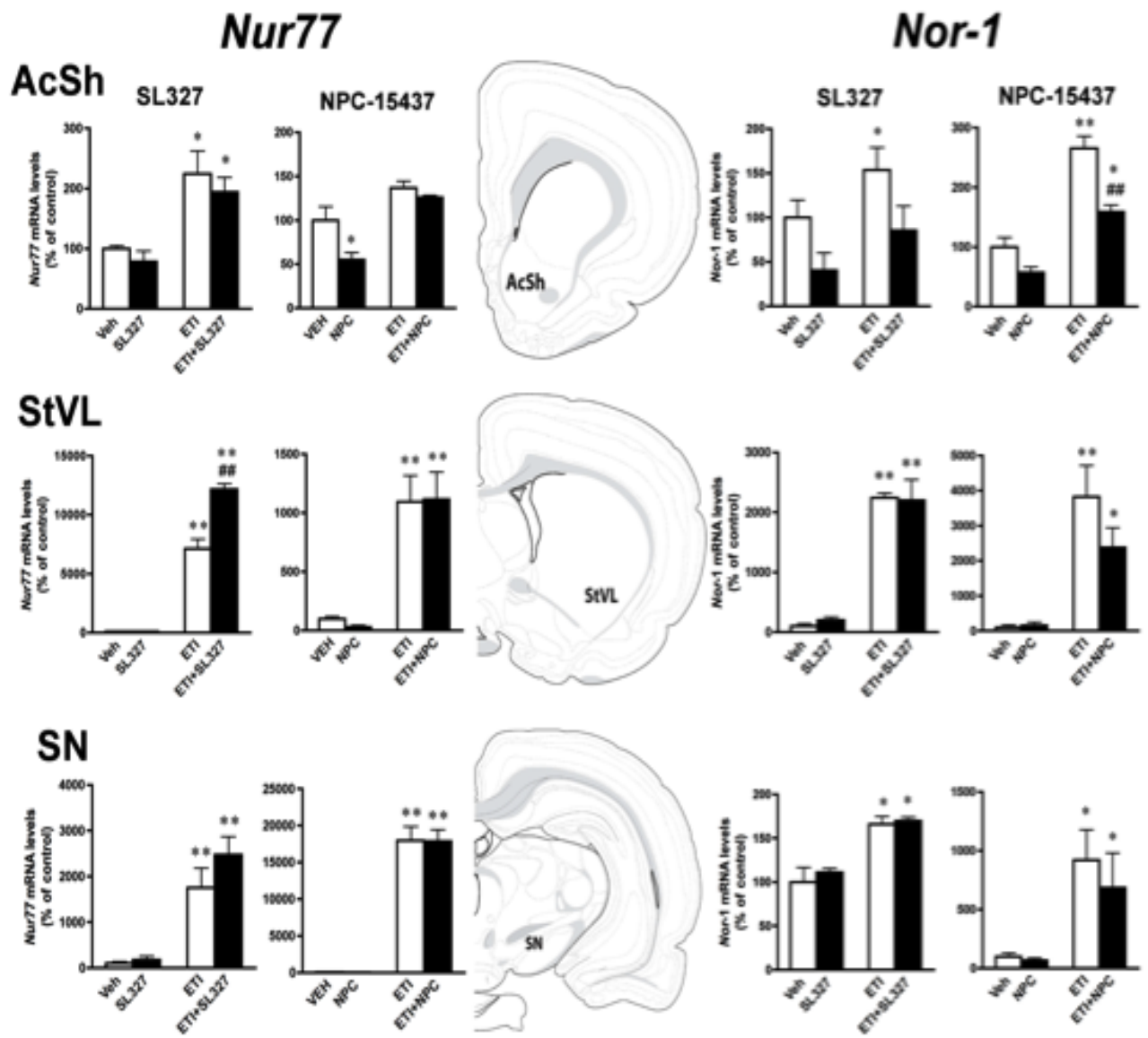


Figure 3

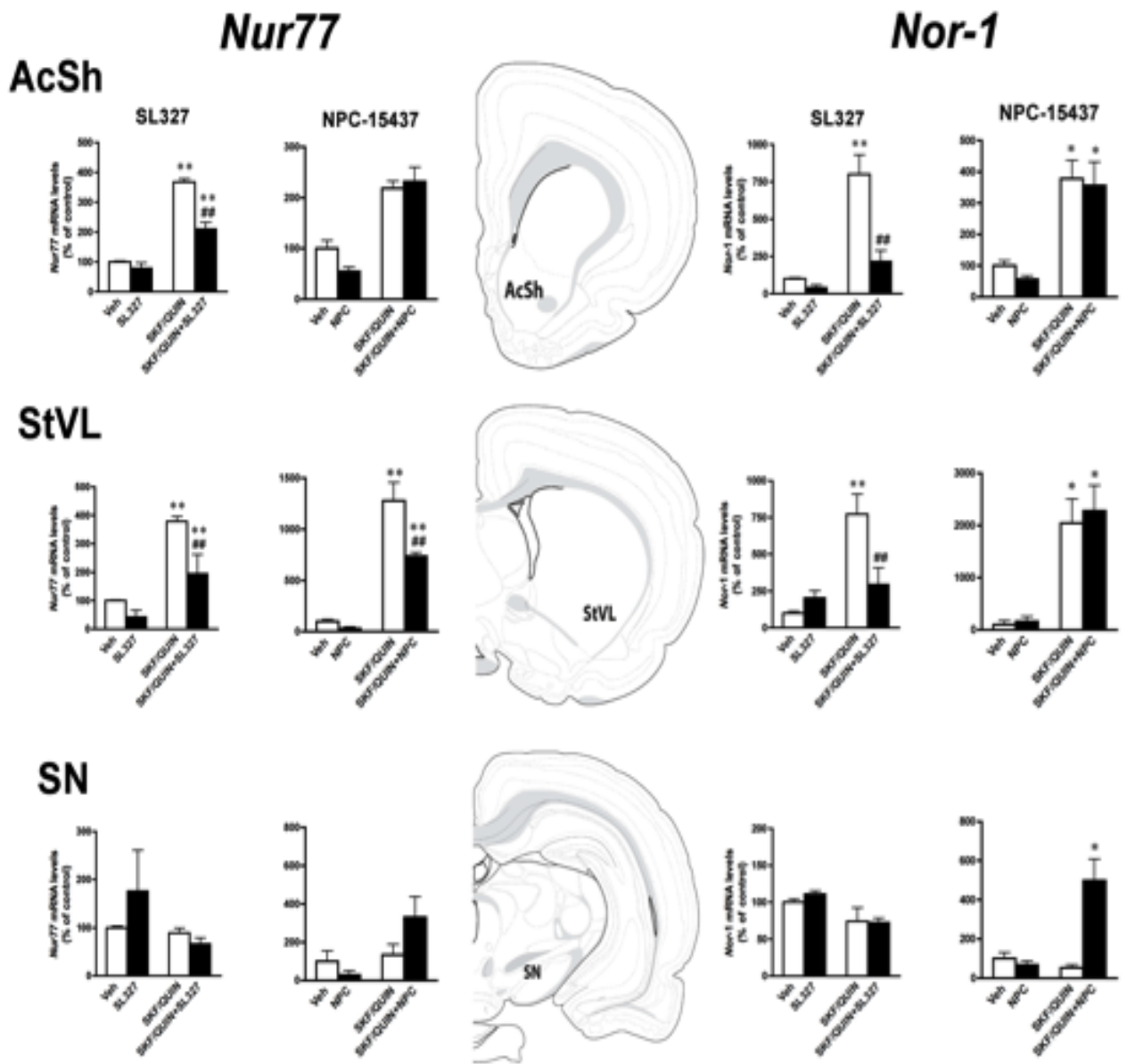


Figure 4

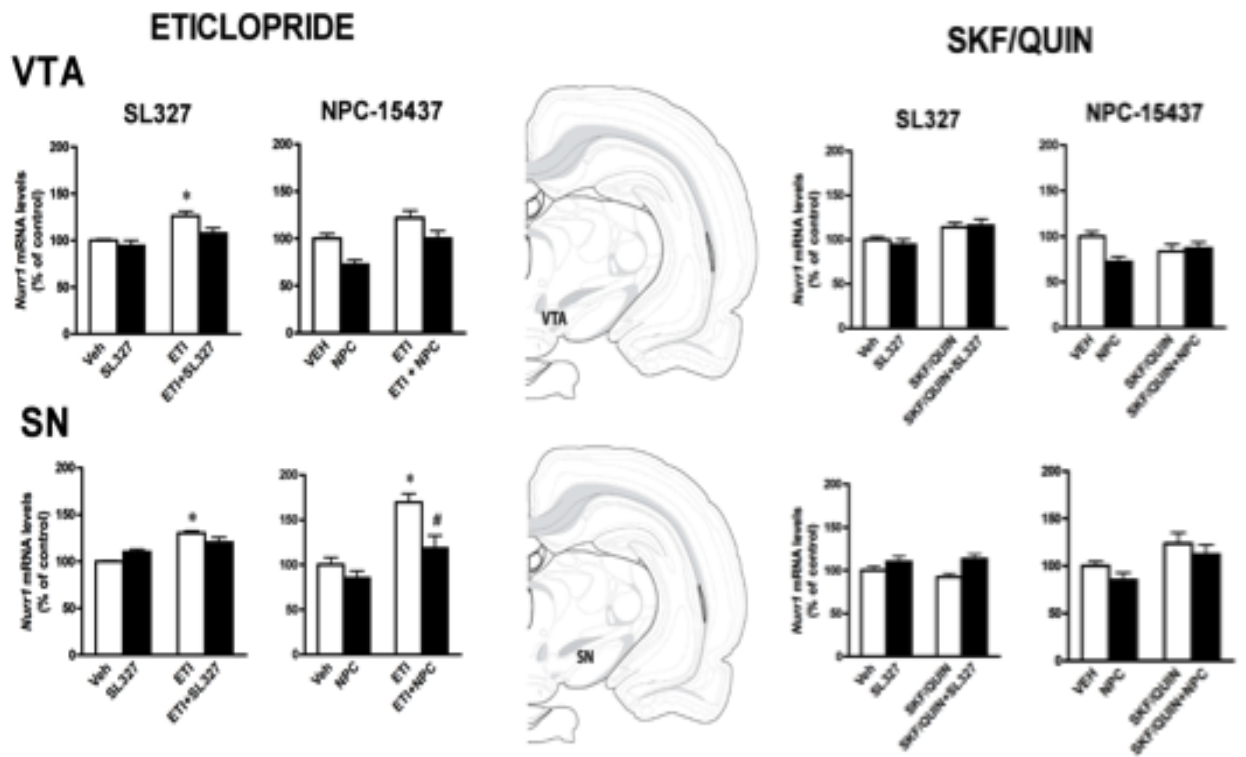


Figure 5

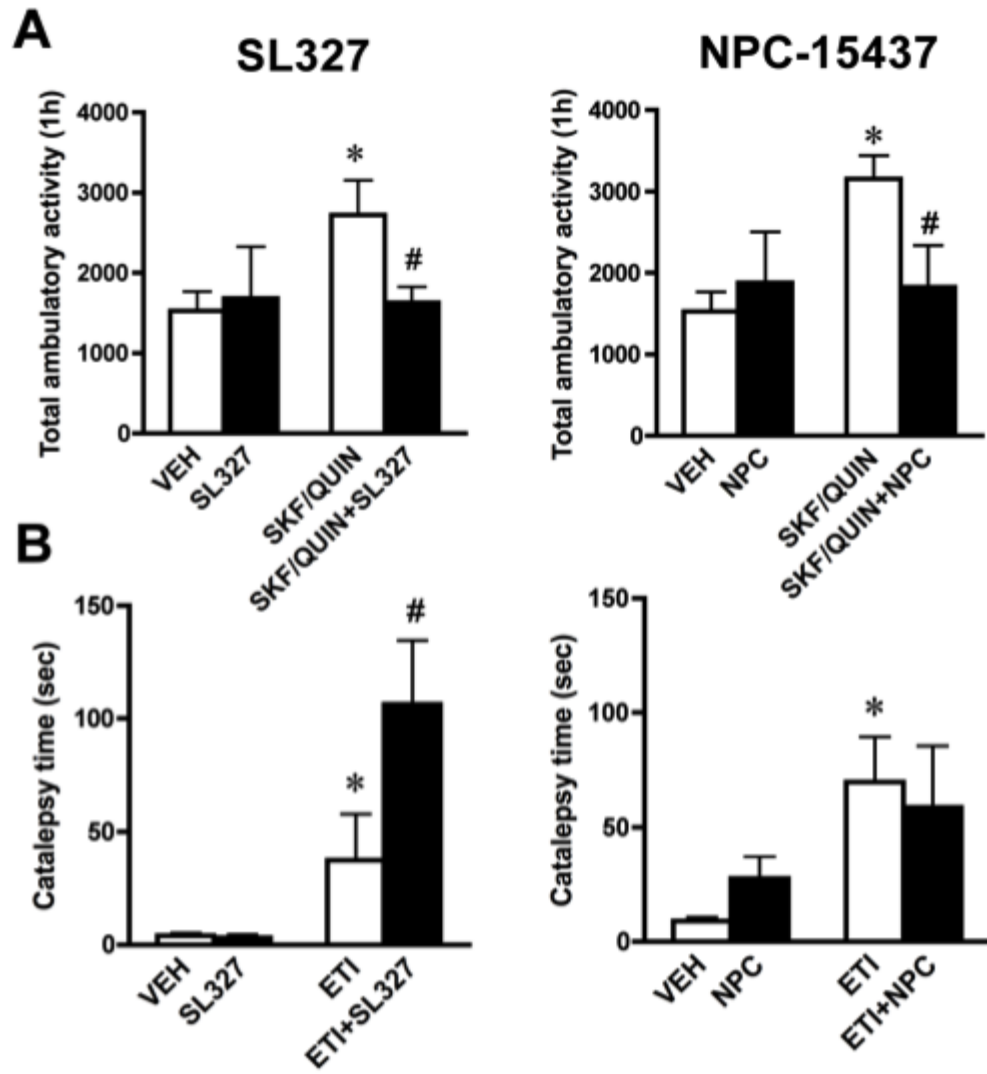


Figure 6

Chapitre 5 : résultats non publiés d'immunoprécipitation

10. Résultats non publiés sur l'implication de Nur77 en tant que facteur de transcription sur le promoteur de l'enképhaline

Le nombre d'évidences concernant l'induction des neuropeptides enképhaline et neurotensine liés à la présence de Nur77 avec ou sans RXR nous a poussé à investiguer la présence de consensus NBRE, NurRE et DRn dans les promoteurs de chacun de ces gènes bien que nos résultats, tant publiés que non publiés, ne convergent pas forcément tous vers cette implication éventuelle d'un complexe transcriptionnel RXR/Nur77 dans les catalepsies ou les VCMs induits par les antipsychotiques.

10. 1. Séquences consensus NBRE et DRn sur les promoteurs des gènes de l'enképhaline et de la neurotensine

Une étude non exhaustive des promoteurs des gènes de l'enképhaline et de la neurotensine nous a permis d'identifier des séquences consensus NBRE et DRn dans chacun des promoteurs (Figure n°14).

<u>MOUSE ENKEPHALIN GENE PROMOTER (Penk):</u>	
NBRE consensus AAAGGTCA	
Site #1: 5'-tccctgtctgagagat AAAGGTCA aattta-3' -3814	(fully conserve sequence)
Site #2: 5'-tcggatagttcagc AGAGGTCA tctctg-3' -752	(partially conserve sequence)*
DR consensus GGTTCAnnnnnAGGTCA	
Site #3: 5'-tgcaaggaaggggca GGTTCA cggaaat-3' -706	(half site of a direct repeat)*
Site #4: 5'-ccgctctctggtcca GGTTCA aaggatt-3' -2019	(half site of a direct repeat)
Site #5: 5'-actttgttttagatg GGTTCA tctata-3' -5334	(half site of a direct repeat)
<u>MOUSE NEUROTENSIN GENE PROMOTER (Nts):</u>	
NBRE consensus AAAGGTCA	
Site #1: 5'-ctatgcatgcatgaatgtgg AGGTCA agagaac-3' -3286	(partially conserve sequence)
DR consensus GGTTCAnnnnnAGGTCA	
Site #2: 5'-tgaacaagtctccaga GGTTCA agagaga-3' -3778	(half site of a direct repeat)
Site #3: 5'-cgtcactttccatcaa GGTTCA cgggtg-3' -149	(half site of a direct repeat)

Figure n°14 : Séquences consensus NBRE et DRn identifiées au sein des promoteurs des gènes de l'enképhaline et de la neurotensine (séquences génomiques NCBI). La numérotation des séquences de 1 à 5 pour le promoteur de l'enképhaline et de 1 à 3 pour le promoteur de la neurotensine fait référence aux amorces utilisées pour l'amplification de ces séquences consensus lors des expérimentations de chromatimmunoprécipitation (ChIP) sur l'ADN total de striatum de souris (figure n°15). Les deux séquences consensus du promoteur de l'enképhaline marquées d'une étoile sont suffisamment proches pour être amplifiées sur le même fragment de PCR dont les amorces ont été sélectionnés à l'aide du logiciel primer3.

La présence de ces consensus NBRE et DRn au sein des promoteurs des gènes de l'enképhaline et de la neurotensine nous a conduit à tester l'hypothèse d'une interaction des hétérodimers RXR/Nur77 (séquence consensus DRn) ou monomère (séquence consensus NBRE) en tant que facteurs de transcription de ces gènes par des expériences Chromatimmunoprécipitation (ChIP) *in vivo* dont les résultats préliminaires figurent dans la figure n°15 ci-dessous.

10. 2. Chromatoimmunoprécipitation (ChIP) Nur77 dirigée sur le promoteur de l'enképhaline et de la neurotensine

Les résultats de ces expériences résumés dans la figure n° 15 nous montrent que Nur77 peut se fixer sur le promoteur de l'enképhaline *in vivo* suggérant une régulation effective potentielle du promoteur de l'enképhaline et de la neurotensine par le facteur de transcription Nur77 en monomère ou hétérodimère avec RXR.

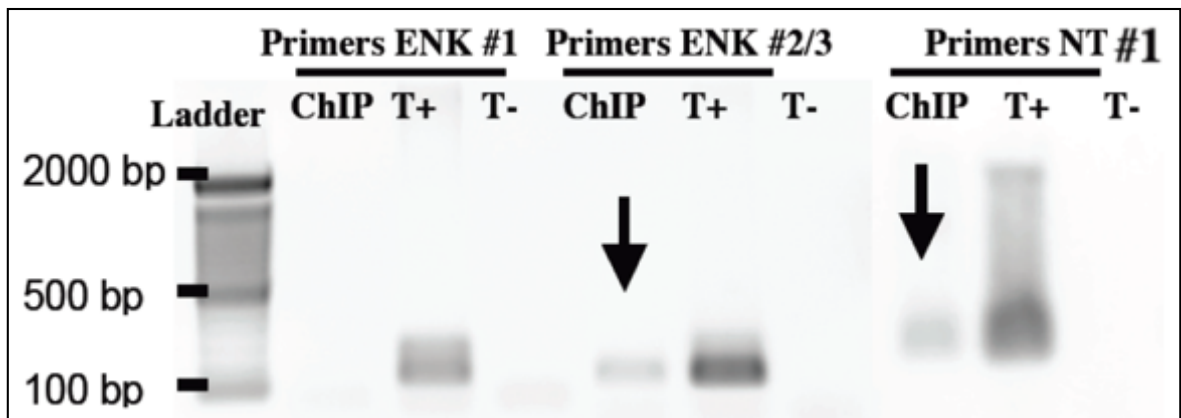


Figure n°15 : Résultats de chromatoimmunoprécipitation (ChIP) avec l'anticorps Nur77 sur de l'ADN total de striatum de souris sauvages. Les numéros des amorces représentent les séquences consensus amplifiées par PCR représentées dans la figure n° 14. Chaque témoin positif (T+) nous indique que la PCR à bien fonctionnée et chaque témoin négatif (T-) nous indique que nous n'avons pas de contamination d'ADN génomique exogène c'est pourquoi, nous pouvons conclure que supposément (cf. la partie limite méthodologiques du présent chapitre 10. 3.) les séquences consensus numéro 2 et 3 (MBRE et DRn) du promoteur de l'enképhaline mais pas la séquence consensus NBRE numéro 1 fixent le facteur de transcription Nur77 ce qui est également le cas de la séquence consensus NBRE numéro 1 du promoteur de la neurotensine.

Ces résultats de ChIP, que je qualifierais de préliminaires parce que je n'ai jamais réussi à prouver par western blot la spécificité de l'immunoprécipitation (reconnaissance spécifiques de l'anticorps Nur77 et la protéine facteur de transcription Nur77 fixé sur sa séquence consensus), sont toutefois encourageants puisque *via* les témoins négatifs, nous voyons que la PCR est spécifique pour les segments d'ADN obtenus par technique de ChIP ce qui n'explique toute fois pas pourquoi nous ne retrouvons pas de Nur77 sur la séquence consensus NBRE conservée ENK #1.

Deuxièmement, ceci va également dans le sens d'un rôle du neuropeptide enképhaline dans la régulation des dyskinésies tardives induites par les antipsychotiques et cible encore plus les neurones de la population indirecte du striatum comme cible des antipsychotiques bien sûr mais en corolaire, lieux des dérèglements moteurs provoquant les dyskinésies tardives puisqu'une récente étude épidémiologique démontrant qu'un polymorphisme de Nur77 a été associé aux dyskinésies tardives sur une population de 171 schizophrènes (Novak et al. 2010) vient conforter cette hypothèse. De plus, ces résultats de ChIP *in vivo* ont été confirmés *in vitro* au sein du laboratoire par la technique de retard sur gel qui montre effectivement une interaction de Nur77 avec le semi consensus NBRE like de la séquence DRn ENK#3 sur le promoteur proximal de la préproenképhaline. Selon moi, comme déjà mentionné dans une demande de bourse FRSQ, l'activité fonctionnelle des interactions protéines/promoteurs reste à être établie *in vitro* par des analyses de gènes rapporteurs ou essais luciférase. En outre, je pense qu'il serait bon pour la séquence consensus numéro 3 du promoteur de l'enképhaline qui est une demi séquence DRn spécifique de l'hétérodimère RXR/Nur77 de tester aussi une ChIP ciblée RXR ce qui permettrait de poser des bases vers une vérification de la théorie exposée plus haut d'un transfert de transcription RXR/Nur77 dépendant lors d'administration d'antipsychotiques (Levesque and Rouillard, 2007) si l'expérience est menée sur deux groupes de souris sauvages, un groupe contrôle et un groupe sous halopéridol.

10. 3. Limites méthodologiques de l'étude sur les mécanismes d'action moléculaires par lesquels Nur77 diminuerait les dyskinésies tardives induites par les antipsychotiques typiques

En ce qui concerne ces expériences de ChIP, les séquences génomiques utilisées sont celles de la banque génomique NCBI, le dessin des amorces de PCR a été réalisé grâce au logiciel primer 3 mais les séquences consensus recherchées et localisées grâce à la fonction recherche du logiciel Word. Or il me semble que nous aurions dû confronter ces recherches préliminaires à l'aide de logiciels plus spécialisés tels que : Jalview

(<http://www.jalview.org/> (9 juillet 2012)); CONSENSUS 6d (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::consensus> (9 juillet 2012))... De plus, nous aurions du localiser les séquences NBRE et NurRE avant même de penser aux séquences DRn parce que les séquences DRn contiennent une séquence répétée de la séquence NBRE.

En outre, j'ai personnellement rencontré un problème technique majeur lors des expériences de CHIP. Je n'ai jamais réussi à prouver la spécificité de l'immunoprécipitation Nur77 dirigée après le cross link. En effet les western blots effectuées sur ces échantillons Nur77 dirigé avec des IGg de lapin (70 kDa) se confondent avec le lieu de migration de la protéine Nur77 elle même (70 ≈ kDa) ce qui fait un énorme amalgame sur le western que je n'ai pas réussi à séparer. On aurait pu, vue que les consensus DRn contiennent une séquence du consensus NBRE faire une vérification croisée AcNur77, AcRXR. En effet, à cette étape ci, les facteurs de transcription sont encore fixés à l'ADN et si Nur77/RXR est l'hétérodimère qui se fixe sur les séquences DRn et bien un western blot RXR sur ces échantillons en plus d'un western Nur77 aurait supposément fonctionné surtout que les PCR ENK#2#3 qui ciblent des consensus DRn sont positives.

Remarque n°1 : compte tenu que les deux séquences –GGTTCA- et –AGGTCA- des consensus DRn que nous avons localisées in silico sont espacées de plus de 5 nucléotides, une confrontation de nos recherches préliminaires avec un logiciel spécialisé dans l'identification de consensus de promoteurs me paraît primordiale ici.

Remarque n°2 : une expérience de Fluorescence Résonance Énergie Transfert (FRET) ou de Bioluminescence Résonance Énergie Transfert (BRET) permettrait de donner une base solide à cette théorie du complexe transcriptionnel RXR/Nur77 dans les D2 en complément de la manipe de chromatoimmunoprécipitation (ChIP) décrite ci-dessus.

Chapitre 6 : discussion générale

11. Première hypothèse de recherche : Nur77 et RXR jouent-ils un rôle dans les phénomènes de sensibilisation et moteurs liés à la consommation d'amphétamine?

11. 1. Récapitulatif des résultats concernant le rôle de Nur77 et des rétinoïdes dans les phénomènes de sensibilisation et moteurs liés à la consommation d'amphétamine

Les souris Nur77^{-/-} ont une activité ambulatoire ou locomotrice de base plus forte que celle des souris sauvages avec des mouvements exploratoires verticaux (rearing) et des stéréotypies (mouvements non ambulatoires) identiques; une activité locomotrice plus forte sous amphétamine (et un seuil rotatoire plus élevé sous L-DOPA). À faibles doses, l'amphétamine induit une augmentation de l'activité locomotrice, de la sensibilisation mais pas de stéréotypies pareillement chez les souris Nur77^{-/-} et Nur77^{+/+}. À fortes doses, les souris Nur77^{-/-} ont une activité locomotrice augmentée dans la durée comparé aux souris sauvages; les souris Nur77^{-/-} ne présentent pas de stéréotypies contrairement aux souris sauvages et les deux souches de souris sensibilisent pareillement. En ce qui concerne une implication des rétinoïdes, seul le HX531 qui est un antagoniste RXR (les agonistes et antagonistes RAR n'ont absolument aucun effet chez des souris sauvages que ce soit sur l'activité motrice, non motrice ou la sensibilisation) diminue, au bout de 3 jours de traitement, l'activité locomotrice des souris sauvages sans aucun effet sur l'activité locomotrice des souris Nur77^{-/-}. De plus, les souris sauvages sous HX531 semblent moins sensibiliser que les souris sauvages sans HX531 ou les souris Nur77^{-/-} qui sensibilisent à l'identique mais nous ne pouvons par exclure un effet directe du HX531 sur l'activité purement locomotrice (une période de sevrage de HX531 serait nécessaire chez ces souris).

Remarque : lorsque l'activité locomotrice augmente comme c'est le cas sous amphétamine, les mouvements exploratoires verticaux diminuent, mais le HX531 tend à diminuer spontanément les rearings chez les souris Nur77^{-/-} et Nur77^{+/+}.

11. 2. Conclusions sur le rôle de Nur77 et des rétinoïdes dans les phénomènes de sensibilisation et moteurs liés à la consommation d'amphétamine

En ce qui concerne l'implication de Nur77 dans les phénomènes de sensibilisation liés aux drogues d'abus et bien l'hypothèse est rejetée. Les souris sauvages tout comme les souris Nur77 knockout sensibilisent ce qui rejoint ce que nous avons observé avec la L-DOPA dans les LIDs (St-Hilaire et al., 2006).

En ce qui concerne l'implication de Nur77 dans les phénomènes moteurs liés aux drogues d'abus et bien oui. Les souris Nur77 knockout montrent une augmentation basale de l'activité locomotrice (Gilbert et al., 2006) et une plus forte activité locomotrice sous amphétamine ce qui cible particulièrement un rôle moteur de Nur77 (la sensibilisation est identique) sous amphétamine.

En ce qui concerne l'implication des rétinoïdes dans l'activité locomotrice induite par l'amphétamine et bien oui. L'utilisation d'agonistes, antagonistes RAR et RXR spécifiques nous permet d'impliquer un rôle spécifique pour RXR dans les adaptations motrices liées à l'amphétamine (les agonistes antagonistes RAR n'ayant pas d'effet dans ce paradigme expérimental ci). De plus, tout comme ce qui est observé sous halopéridol, le HX531, l'antagoniste RXR, diminue l'activité locomotrice de souris sauvages et n'a plus d'effet chez les souris Nur77 knockout indiquant ici aussi la nécessité de la présence de Nur77 et peut être l'implication d'un hétérodimère RXR/Nur77 dans les effets liés à l'amphétamine.

Cependant, il est à noter que d'autres résultats concomitants et parallèles, non publiés dans le même paradigme expérimental avec du DHA ont permis de démontrer que cet agoniste RXR diminuait, lui aussi, l'activité locomotrice sous amphétamine que ce soit chez les souris sauvages ou Nur77 déficientes. Il est à noter toute fois que, les analyses statistiques n'étant pas faites, nous ne pouvons pas exclure totalement un rôle de Nur77 qui viendrait atténuer la diminution d'activité locomotrice induite par le DHA (il est observé une diminution plus prononcée de l'activité locomotrice sous DHA chez les souris Nur77-/-).

Remarque : l'amphétamine, tout comme la L-DOPA induisant Nur77 dans les D1 (figure n°16) (St-Hilaire et al., 2003) et (St-Hilaire et al., 2005) je vais me permettre ici une comparaison. Dans un contexte de maladie de Parkinson, nous avons observé que le DHA diminuait et retardait l'apparition des LIDs en même temps que de provoquer une plus forte induction de l'ARNm de Nur77 or ici, moins de Nur77 corrèlerait avec une plus forte diminution de l'activité locomotrice sous amphétamine, tandis que moins d'induction de Nur77 corrèlerait avec plus de LIDs sous L-DOPA...? De plus, les résultats du HX531, un antagoniste RXR qui diminue l'activité locomotrice sous amphétamine, m'interpellent car ils sont en contradiction avec l'effet du DHA qui est un agoniste RXR et qui diminue aussi l'activité locomotrice sous amphétamine ce qui va, en revanche, dans le sens de l'effet anti dyskinétique voir même préventif du DHA, sur les LIDs (Samadi et al., 2006b) associée à tort ou à raison avec une augmentation de Nur77 dans les D1 (Mahmoudi et al., 2009). C'est pourquoi, pour conclure cette remarque, il me semble essentiel et nécessaire de mieux caractériser l'action du DHA au sein des neurones du système dopaminergique des ganglions de la base à cause de son implication thérapeutique bénéfique potentielle.

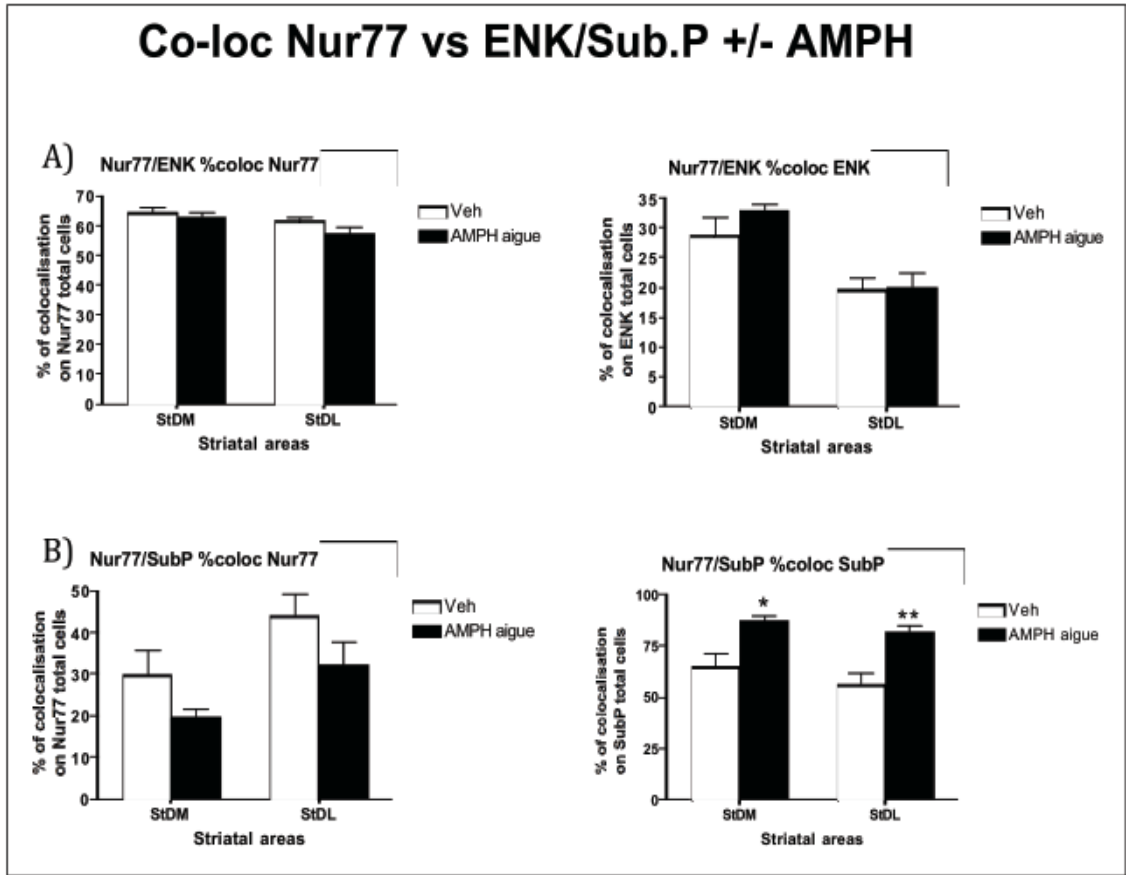


Figure n°16 : Co-localisation Nur77, substance P (SubP), enképhaline (ENK) dans le striatum suite à une injection aigue d'amphétamine. Double hybridation in situ Nur77, ENK et SubP au sein des sections dorsomédiales (StDM) et dorsolatérales (StDL) du striatum suite à des injections aigues (5 mg/kg) de D-amphétamine. **A)** Le pourcentage de co-localisation Nur77/ENK *versus* la totalité des neurones exprimant Nur77 ou l'ENK ne montre aucune différence significative tandis que le pourcentage de neurones co-exprimant Nur77 et la SubP *versus* le pourcentage de neurones exprimant la SubP **B)** montre que quasiment 100% des neurones SubP positifs voient leur induction de Nur77 activée sous amphétamine. La substance P est un neuropeptide spécifique des neurones striataux de la voie directe alors que l'enképhaline est spécifique de la voie indirecte.

11. 3. Discussion sur le rôle de Nur77 et des rétinoïdes dans les phénomènes de sensibilisation et moteurs liés à la consommation d'amphétamine

À la vue de nos résultats et de ceux trouvés en collaborations avec le Dr Michel St-Hilaire (St-Hilaire et al., 2006), il me semble que Nur77 ne soit clairement pas impliqué dans le phénomène de sensibilisation.

Pour ce qui est de l'hypothèse de Nur77 comme régulateur basale de mouvement, et bien oui dans les neurones de la voie D2 où les souris Nur77^{-/-} ont plus de VCMs (Ethier et al., 2004a), moins de catalepsies (Ethier et al., 2004b), un seuil rotatoire d'emblé plus élevé pour les LIDs (St-Hilaire et al., 2006), et comme ici, une activité locomotrice sous amphétamine plus forte et plus longue chez les souris Nur77^{-/-} (Bourhis et al., 2009). De plus, ce qui cible toujours les neurones striataux de la voie D2, les antipsychotiques atypiques, qui ne provoquent pas d'effets secondaires moteurs extrapyramidaux, ne provoquent pas cette induction de Nur77 en chronique (Beaudry et al., 2000). Cependant, nous ne pouvons pas non plus exclure un rôle de Nur77 (selon moi autre que moteur vu que le DHA agit sur la diminution de l'activité locomotrice à la fois chez les souris sauvages et Nur77^{-/-} (résultats non publiés)) dans les neurones striataux de la voie directe puisque nous observons une augmentation de Nur77, en aigüe comme en chronique, dans les neurones de la voie D1 (figure n°16) sous amphétamine et dans les LIDs (St-Hilaire et al., 2003), (St-Hilaire et al., 2005) et (Mahmoudi et al., 2009).

Pour en revenir à cette diminution de l'activité locomotrice sous amphétamine *via* le HX531, un antagoniste RXR, je me demande si il ne s'agirait pas d'un effet indirecte du complexe activateur de transcription RXR/Nur77 (le HX531 est sensé inhiber ce complexe) sur l'activation d'un gène pro-dyskinétique (ce qui irait dans le sens d'un gène « pro-locomoteur ») comme *c-fos* par exemple qui déjà voit sa transcription (Jaffey et al., 1992) ou sa participation au complexe AP-1 (Simonson MS, 1994), (Takeshita et al., 2002) inhibées par l'acide rétinoïc. En effet le corolaire scientifique actuel admet largement une implication délétère de *c-fos* dans les phénomènes de drogues d'abus, le mode d'action des antipsychotiques (Ohno et al., 2010), (Yanahashi et al., 2004),

(Budser et Deutch 2002), (Werme et al., 2000), (Robertson et al., 1994) ou les LIDs (Cao et al., 2010), (Xu et al., 2003) ce qui souligne le fait que cette implication transcriptionnelle indirecte Nur77/RXR soit possible et qui rejoint en un sens la notion d'apprentissage dans les D1 liée aux LIDs et à l'amphétamine. En effet, ce complexe transcriptionnel Nur77/RXR (activé cette fois-ci par le DHA) ou Nur77 en monomère ou homodimère, pourrait aller favoriser la transcription de gènes impliqués dans du LTP à long terme ou la transcription de gènes favorisant l'inhibition du LTD. De plus, si RXR aurait besoin du DHA pour accomplir son rôle d'activateur de transcription (ce qui ne veut pas dire que ce soit le seul mécanisme d'action du DHA), il n'en serait pas de même pour Nur77 qui, comme les autres membres de la famille des Nurs, possède une activité agoniste transcriptionnel constitutive. En effet, ce que l'on observe avec la L-DOPA, bien que le contexte neuronal soit différent à cause de la dénervation, est similaire sur le plan de l'induction de Nur77 à ce que l'on observe avec l'amphétamine (induction de Nur77 dans les neurones de la voie directe) ce qui 1- est normal considérant que ce sont toutes deux des drogues psychoactives en lien avec la dopamine et qui 2- fait appel à une notion d'apprentissage erronée ou usurpée. Cependant, le fait que ce soit des agonistes RXR qui réduisent les LIDs dans les D1 (voie facilitatrice de mouvements) et des agonistes RXR qui réduisent les VCMs dans les D2 (voie inhibitrice de mouvements) souligne deux choses :

- 1- que le complexe RXR/Nur77 si il existe, soit capable de cibler des gènes totalement différents que ce soit dans la population D1, D2 ou les striosomes. Ceci est corroboré par le contenu de ces neurones qui sont de base déjà très hétérogènes, que ce soit pour les neurones de la voie D1 ou D2 ou les striosomes mais aussi par le fait que nous observons un délais de trois jours donc probablement de la neuro-adaptation avant d'observer l'effet du HX531 que ce soit sous amphétamine ou dans les VCMs.
- 2- l'importance du contexte neuronal dans lequel Nur77 va agir puisqu'il semble que ce soit une molécule multifonctionnelle (Nur77 sous forme phosphorylée au cytoplasme est capable d'interagir avec Bcl2 pour induire l'apoptose des neurones dopaminergiques de la SNc (communication personnelle Dr Claude Rouillard)).

De plus, dans son article sur les singes MPTP, Souha démontre que l'induction de Nur77 dans les D1 se fait principalement dans les striosomes qui sont des sous structures du striatum principalement associées au mouvement alors que dans la matrice la voie D1 serait plus associée au système limbique (Mahmoudi et al., 2009) ce qui serait en revanche fortement en adéquation avec les effets de l'amphétamine qui en chronique induit Nur77 dans tout le striatum mais l'on ne peut pas faire chez la souris cette distinction striosomes matrice comme chez les singes et l'expérience sous amphétamine serait à faire chez le primate où il a cependant déjà été démontré que les IEG c-fos, JunB, FRA, NGFI-A et Arc étaient principalement induits dans les D1 des striosomes sous amphétamine mais aussi dans les D1 dans la matrice sous cocaïne en aigue (Tan et al., 2000). Un autre point qui pourrait aller dans le sens d'une implication de Nur77 dans les phénomènes adaptatifs d'une plasticité neuronale erronée incriminée par le Dr Charles R. Gerfen est le fait que Nur77 est induit sous L-DOPA qui restaure la plasticité synaptique perdue lors de la dénervation et que son induction perdure lors des LIDs. De plus, ces observations sont également valables pour l'amphétamine, où les Drs Hymman, Malenka et Nestler incriminent la toxicomanie comme de l'apprentissage pathologique et où nous voyons que Nur77 participe aux effets moteurs de l'amphétamine, en aigue comme en chronique, mais aussi où nous observons que les souris Nur77^{-/-} n'ont pas de stéréotypies qui sont des mouvements anormaux auxquels certains auteurs ajoutent la notion de psychomotrice que l'on retrouve dans la toxicomanie (sans oublier que les souris Nur77^{-/-} n'ont plus de CPP à la cocaïne). En outre, la majorité des études sur un apprentissage erroné des LIDs et la toxicomanie ayant été faites sur les cascades de signalisation ERKs, cela nous pousse à investiguer l'influence de la cascade des ERK/MAPK ainsi que celle de la PKC sur l'induction des Nurs.

11. 4. Limites et perspectives sur le rôle de Nur77 et des rétinoïdes dans les phénomènes de sensibilisation et moteurs liés à la consommation d'amphétamine

En perspective, il serait pertinent de tester les agonistes/antagonistes RAR RXR dans un modèle de dyskinésies induites à la L-DOPA comme dans le paradigme expérimental 6-OHDA utilisé par le Dr St-Hilaire afin de conforter certains résultats déjà obtenus chez les singes MPTP où le DHA (agoniste RXR) diminue les LIDs (Samadi et al., 2006b) mais où l'ARNm de Nur77 est induit dans les D1 (Mahmoudi et al., 2009) alors que dans le cas du modèle de souris 6-OHDA où Nur77 suite à une lésion est induit dans les D2 mais devient inductible dans les D1 et dans les D2 du côté intacte mais pas du côté lésé suite à un traitement de L-DOPA (St-Hilaire et al., 2003). En effet, si une implication claire des rétinoïdes dans la signalisation dopaminergique a déjà été démontrée (Krezel et al., 1998), et que d'autres expériences ont aussi indiquées une implication spécifique de l'isoforme RXR γ dont l'absence diminue les catalepsies induites à la chlorpromazine, un antipsychotique typique (Saga et al., 1999) le mécanisme d'action de ces protéines, Nur77 et RXR demeure encore à éclaircir. De plus, à la vue des résultats avec le DHA qui agit en présence ou en absence de Nur77 sous amphétamine, d'autres partenaires potentiels d'RXR, où il a le rôle actif, devraient être recherchés, ainsi que les différents mécanismes d'action du DHA au sein du striatum. En effet, un autre article récent montre que le DHA chez des singes MPTP, en plus de réduire la sévérité et d'augmenter le délais d'apparition des dyskinésies (Samadi et al., 2006b), diminue l'induction à la foie d'enképhaline et de dynorphine (Tamim et al. 2010) allant avec l'hypothèse que les voies D1 et D2 sont toutes deux vraisemblablement impliquées mais de façon différentes, puisque RXR γ 1 est exprimé dans les D1 et les D2 de base, dans les LIDs et ouvre vraisemblablement un peu plus la porte à d'autres partenaires que Nur77 pour RXR dans les D1 mais aussi dans les D2 chez le singe puisque Nur77 n'est pas induit suite à une lésion dans les D2 chez le singe (Mahmoudi et al., 2009) alors que l'on observe une augmentation d'enképhaline spécifique des D2 dans ce modèle (Tamim et al. 2010).

12. Deuxième hypothèse de recherche : les kinases ERKs et PKCs jouent-elles un rôle dans l'induction de l'ARNm des Nurs *via* les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 *in vivo* au sein du striatum, du Nac, de la SN et de la VTA?

12. 1. Récapitulatif des résultats concernant le rôle des kinases ERKs et PKCs dans l'induction de l'ARNm des Nurs *via* les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 *in vivo* au sein du striatum, du Nac, de la SN et de la VTA

Immunohistochimie phospho-ERK1/2: une combinaison d'agonistes D1/D2 (tout comme l'amphétamine) ainsi qu'un antagoniste D2 sont capables d'induire la phosphorylation de ERK1/2 dans le striatum ventral, aucun effet sur la phosphorylation de ERK1/2 dans le striatum dorsal n'a été trouvé et l'effet d'un antagoniste D2 est approximativement deux fois plus faible que l'effet d'agonistes D1/D2 sur la phosphorylation de ERK1/2 à moins qu'il ne s'agisse de la quantité de ERK1/2 dans les D2 qui soit deux fois plus faible, une expérience de cytométrie en flux pourraient permettre de répondre à la question. En outre, la phosphorylation de ERK1/2 est perdue dans les neurones de la voie directe sous SL327 (inhibiteur de MEK) alors que le NPC15347 (inhibiteur de la PKC) laisse la phosphorylation de ERK1/2 intacte. Ceci n'est pas le cas dans les neurones de la voie indirecte où l'inhibiteur de ERK1/2 (le SL327) et l'inhibiteur de PKC (le NPC15347) inhibent la phosphorylation de ERK1/2. Ce qui prouve 1- que nos inhibiteurs de kinases sont spécifiques et 2- va tout à fait dans le sens de ce qui a précédemment été observé dans la littérature où il a été démontré, avec certaines évidences scientifiques assez fortes, que la phosphorylation de ERK2 était dépendante de la PKC dans les neurones striataux de la voie indirecte (D2) alors qu'elle ne le serait pas *via* des agonistes D1 (voie directe) (Yan et al., 1999). De plus, ceci corrèle tout à fait avec certains débats scientifiques concernant l'activation des kinases

ERKs qui ne semble pas se faire de la même façon dans le striatum dorsal et l'accumbens (Gerfen et al., 2008) et (Santini et al., 2007).

Hybridations in situ NR4As : l'inhibiteur de MEK seul n'altère pas l'induction basale des Nurs (Nur77, Nor-1 et Nurr1) tandis qu'inhiber les PKCs diminue l'induction de Nur77 dans toutes les structures où il est exprimé. Inhiber MEK dans les neurones de la voie indirecte augmente globalement l'expression de Nur77 dans les quatre cadrans du striatum, le core de l'accumbens mais pas le shell où une diminution de Nur77 est observée (aucun effet n'est observé sur l'induction de Nor-1). Tandis qu'inhiber la PKC dans les neurones de la voie indirecte diminue globalement l'expression de Nur77 et de Nor-1 dans les quatre cadrans du striatum, le cortex préfrontal, le cortex cingulaire; le shell mais pas le core du noyau accumbens, voire la substance noire pour Nor-1. Dans les neurones de la voie directe, inhiber MEK diminue l'expression de Nur77 et de Nor-1 dans les quatre cadrans du striatum, le core et le shell du noyau accumbens voire le cortex cingulaire; mais aussi le cortex préfrontal pour Nur77; tandis qu'inhiber la PKC diminue l'induction de Nur77 et n'a pas d'effet sur Nor-1 (schéma n°2). Seul l'antagoniste D2 augmente l'expression de l'ARNm de Nurr1 dans la substance noire et la VTA et il n'y a pas d'effet des inhibiteurs de MEK ou de PKC.

Analyses comportementales : Les agonistes D1/D2 augmentent l'activité locomotrice (tout comme l'amphétamine) tandis que les antagonistes D2 provoquent des catalepsies (tout comme l'halopéridol). Dans les neurones de la voie directe (D1), inhiber MEK et inhiber la PKC (ce qui diminue l'induction de Nur77 dans les D1) diminue l'activité locomotrice, tout comme le HX531, un antagoniste RXR sous amphétamine diminue l'activité locomotrice (Bourhis et al., 2009) mais je pense qu'il faut être prudent concernant les liens que l'on peut faire entre l'inhibition des kinase, notamment ERK qui se fait dans l'accumbens, l'induction des IEG (Nur77, Nor-1) que l'on observe à travers tout le striatum et l'accumbens et les effets moteurs qui ont leur siège dans le striatum dorsal. Dans les neurones de la voie D2, inhiber MEK (ce qui induit l'ARNm

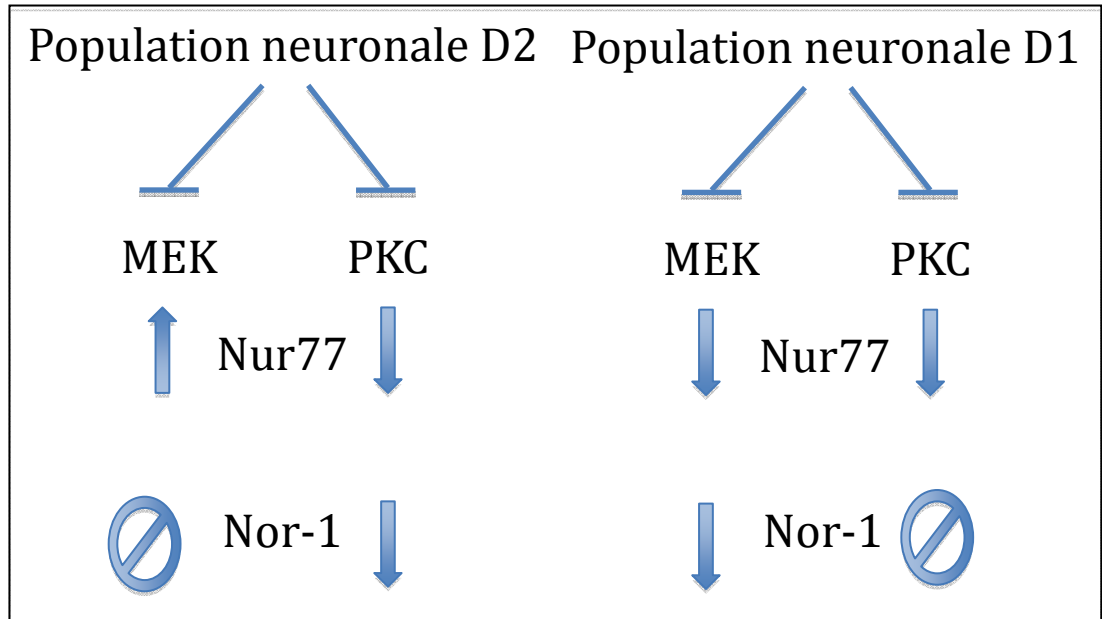


Schéma n°2 : Schéma récapitulatif des résultats d'hybridation in situ Nur77 et Nor-1 dans le striatum et le noyau accumbens de souris sauvages sous agonistes D1/D2 ou antagonistes D2 avec ou sans inhibiteurs de MEK ou de PKCs. Les traits barrés signifient une inhibition des kinases MEK donc ERK1/2 ou PKCs, les flèches ascendantes ou descendantes représentent une augmentation ou une diminution de l'induction de l'ARNm des gènes *nur77* ou *nor-1* par rapport au groupe avec antagoniste D2 seul (population neuronale D2) ou avec agonistes D1/D2 seuls (population neuronale D1). Les cercles barrés représentent un zéro effet sur l'induction de l'ARNm du gène en question. Ces résultats correspondent aux régions du striatum ventrolatéral et de l'accumbens.

de Nur77 dans les D2) augmente les catalepsies (on observe exactement l'inverse chez les souris Nur77 knockout qui ne présentent plus de catalepsies) et inhiber la PKC (ce qui diminue l'induction de Nur77 dans les D2) n'a pas d'effet sur les catalepsies (schéma n°3).

De plus, même à forte dose (100 mg/kg pour le SL327) les inhibiteurs de kinase n'ont pas d'effet sur les activités motrices spontanée ce qui rejoint tout à fait d'autres résultats où 30 mg/kg de SL327 réduisent de 62 à 89% la phosphorylation de ERK selon les régions du cerveau et n'altère pas l'activité locomotrice spontanée ou l'hyperlocomotion aigüe induite par la cocaïne ou la D-amphétamine (Valjent et al., 2006b). En outre, d'autres études ont également montrées que des inhibiteurs de MEK diminuaient significativement l'activité motrice induite par l'amphétamine et l'expression des gènes striataux (Shi and McGinty, 2006) et bloque complètement l'induction des gènes PPE et

PPD (Shi and McGinty, 2006) ce qui colle avec nos résultats présents sur les agonistes D1 où l'inhibition de ERK diminue l'activité locomotrice et l'induction de Nur77 voir même celle de Nor-1 tout en restant prudent compte tenu du contexte scientifique actuel.

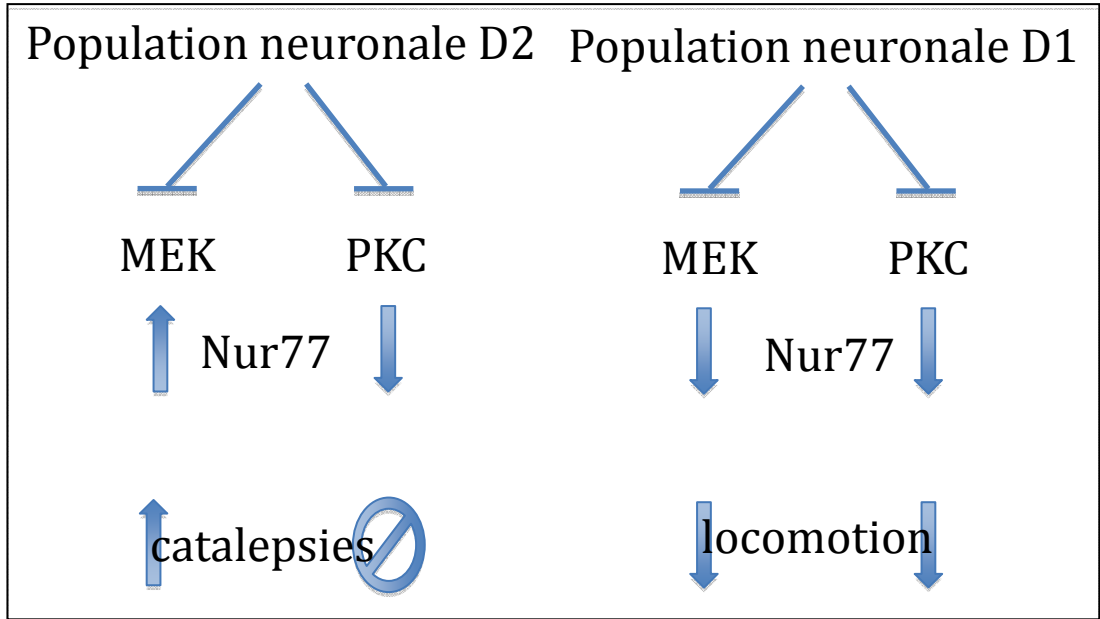


Schéma n°3 : Schéma récapitulatif des résultats comportementaux chez des souris sauvages sous agonistes D1/D2 ou antagonistes D2 avec ou sans inhibiteurs de MEK ou de PKCs. Les traits barrés signifient une inhibition des kinases MEK donc ERK1/2 ou PKCs, les flèches ascendantes ou descendantes représentent une augmentation ou une diminution de l'induction de l'ARNm du gène de *nur77* ou une augmentation ou une diminution du comportement locomoteur ou cataleptique des souris en fonction des drogues injectées.

12. 2. Conclusions concernant le rôle des kinases ERKs et PKCs dans l'induction de l'ARNm des Nurs *via* les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 *in vivo* au sein du striatum, du Nac, de la SN et de la VTA

En ce qui concerne l'impacte d'une inhibition pharmacologique spécifique des kinases ERKs et PKCs et bien oui, leur inhibition, que ce soit dans les neurones de la voie directe ou indirecte influe sur l'induction des ARNm de Nur77 et/ou de Nor-1 dans le striatum et le noyau accumbens mais pas d'influence sur l'induction de l'ARNm de Nurr1 dans la SN. De plus, il existe bel et bien des conséquences motrices de l'inhibition

de ces kinases probablement *via* leur effet sur l'induction de l'ARNm de Nur77 puisque l'administration des inhibiteurs de kinase à eux seuls n'altère pas l'activité locomotrice ni les catalepsies mais la même expérience chez des souris Nur77^{-/-} apporterait un meilleur élément de réponse à la question.

En conclusion, ces résultats démontrent que les cascades de signalisation conduisant à l'induction des ARNms de Nur77 et Nor-1 suite à une activation des récepteurs dopaminergiques sont distinctes. Ces différences d'induction face aux kinases ERKs et PKCs peuvent s'expliquer par des corégulateurs différents sur les promoteurs de chacun des gènes Nur77, Nor-1 et même Nurr1 puisque ce dernier n'est pas affecté. En outre, ces résultats impliquent les kinases ERKs et PKCs ainsi que les IEGs Nur77 et Nor-1 dans les phases initiales des différentes réponses neuro-adaptatives déclenchées lors de perturbations du système dopaminergique. De plus, le fait que des inhibiteurs de MEKs et PKCs influent sur l'activité locomotrice appuie leur participation aux effets du système dopaminergique. L'activation différentielle des ERKs et PKCs dans le striatum dorsal ou ventral corrèle avec une différence de signalisation déjà observée selon les structures anatomiques.

12. 3. Discussion concernant le rôle des kinases ERKs et PKCs dans l'induction de l'ARNm des Nurs *via* les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 *in vivo* au sein du striatum, du Nac, de la SN et de la VTA

Si l'induction différentielle des Nurs par différentes voies kinasiques peut s'expliquer par des séquences consensus différentes au sein des promoteurs; certaines études ont néanmoins démontrées une forte auto-induction de la transcription de *nur77* par Nur77 *via* des agonistes de Nur77 tels que la cytosporone B (Liu et al., 2010) (Zhan et al., 2008) ce qui brouillerait un peu les cartes quand aux effets purs des kinases sur l'induction de Nur77 *in vivo* où il est possible que ce soit la protéine Nur77 qui prenne le relais de sa transcription une fois induite (une immunohistochimie sur nos coupes au sein de ce paradigme expérimental contre la protéine Nur77 phosphorylée et non

phosphorylé, donc au cytoplasme ou au noyau, nous permettrait de vérifier cette hypothèse). Quoi qu'il en soit, des investigations supplémentaires sont nécessaires afin de mieux caractériser les kinases des cascades d'inductions des Nurs comme par exemple l'utilisation d'inhibiteurs PKC spécifiques. De plus, l'effet d'un inhibiteur de PKC sur l'induction striatale de Nur77 ou Nor-1 démontre la participation d'une cascade de signalisation calcium dépendante dans l'induction des Nurs que ce soit dans les neurones de la voie D1 ou D2.

12. 4. Perspectives concernant le rôle des kinases ERKs et PKCs dans l'induction de l'ARNm des Nurs *via* les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 *in vivo* au sein du striatum, du Nac, de la SN et de la VTA

Personnellement, je pense qu'il serait bon de penser à des modèles de culture cellulaire neuronaux tels que les cellules PC12 qui sont des phéochromocytomes de rats, les lignées cellulaires de neuroblastomes de rats, NG-108, ou d'hippocampe de souris HT22 etc. qui permettent une utilisation plus facile des différents inhibiteurs de kinases disponibles sur le marché ainsi qu'un meilleur contrôle de la spécificité de la signalisation des récepteurs (D1, D2, glutamatergiques, A_{2A}...). En effet, presque tous les isoformes de PKC sont exprimés dans le cerveau c'est pourquoi, une utilisation d'inhibiteurs de PKC spécifiques en culture cellulaire ou en culture de neurones primaires (tous les inhibiteurs de PKCs ne passent pas la barrière hémato-encéphalique) permettrait de mieux caractériser les cascades de signalisation. De plus, nous pourrions reproduire ce paradigme expérimental d'agonistes D1/D2 et antagonistes D2 avec de l'amphétamine, un antipsychotique typique (halopéridol) et un antipsychotique atypique (clozapine) pour approcher plus ce qui se passe en situation de thérapie; sans oublier qu'une administration concomitante d'inhibiteur de ERKs et de PKCs nous permettrait de voir s'il existe une synergie ou un effet additionnel de ces kinases dans les neurones de la voie indirecte (D2).

12. 5. Limites de l'étude concernant le rôle des kinases ERKs et PKCs dans l'induction de l'ARNm des Nurs *via* les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 *in vivo* au sein du striatum, du Nac, de la SN et de la VTA

Une immunohistochimie PKC spécifique aurait du être faite afin de mesurer le taux de phosphorylation de PKCs dans le striatum dorsal et ventral suite à des injections d'agonistes D1/D2 et antagonistes D2 *in vivo*. Ceci aurait permis ensuite de vérifier l'efficacité effective inhibitrice du NPC15347 sur la PKC notamment dans les neurones de la voie directe car il a été rapporté qu'un agonistes D2 inhibait la PKC (Giambalvo, 2003). De plus, cela nous aurait permis de confirmer la signalisation croisée PKC activant ERK dans les neurones de la voie indirecte. En outre, concernant les résultats comportementaux et biochimiques, il aurait été bon de les confirmer avec des injections intra-striatales de U0126, un inhibiteur de MEK comme l'ont fait Shi et McGinty dans leur article sur l'amphétamine où il sont pu démontrer que même en aigue, le SL327 abolissait l'induction de préprodynorphine et de préproenképhaline sous amphétamine (Shi and McGinty, 2006). Ensuite, connaissant la polémique autour de l'implication de DARPP-32 dans l'activation de ERK dans le striatum ventral mais pas dorsal sous psychostimulant (Sgambato et al., 1998) alors qu'avec des agonistes dopaminergiques ou la L-DOPA DARPP-32 ne serait pas requis ni dans le striatum dorsal ni dans le striatum ventral (Valjent et al., 2005), nous aurions pu, par pure curiosité scientifique, tester une immunohistochimie phospho-DARPP-32 (Gerfen et al., 2008).

13. Perspectives générales du rôle de NR4A1 au sein des désordres dopaminergiques

13. 1. Rôle d'NR4A1 dans les dyskinésies tardives (VCMs)

En ce qui concerne les VCMs, il semblerait que Nur77 ait un rôle de régulation du mouvement venant appuyer le sens physiologique d'inhibition du mouvement de la voie indirecte striatale. En effet, il semble que l'induction de l'ARNm de Nur77 soit un maillon de l'induction de neuropeptides régulateurs comme l'enképhaline et la neurotensine responsables de corriger certains dérèglements moteurs induits par des perturbations du système dopaminergique (St-Hilaire et al., 2006). De plus, il semblerait que Nur77 en tant que facteur de transcription n'agisse pas seul mais en concomitance avec d'autres voies impliquant RXR ou en synergique avec la cascade RXR ou tout simplement avec RXR comme partenaire d'hétérodimérisation. Un grand pas dans la compréhension de ces phénomènes serait de prouver la véracité biologique d'un complexe RXR/Nur77 effectif dans les neurones épineux moyens de la voie D2 du striatum d'autant que nos résultats préliminaires de ChIP sur le rôle de Nur77 comme facteur de transcription semblent encourageants; que des techniques comme le FRET ont été mises au point *in vivo* sur des tranches de striatum ou de Nac core et shell (Hasbi et al., 2011) (Perrault et al., 2010) et qu'un tel complexe RXR/Nur77 a déjà été démontré dans le cytoplasme de PC12 suite à l'intervention du NGF (Katagiri et al., 2000).

13. 2. Rôle d'NR4A1 dans les dyskinésies induites à la L-DOPA (LIDs)

Dans la maladie de Parkinson, le Dr Pershia Samadi, étudiante au sein du laboratoire en codirection avec les Drs Paul J. Bedard et Claude Rouillard, avait élaboré une théorie concernant le rôle régulateur à court terme, *via* l'inactivation de la cascade des ERKs, des neuropeptides opioïdiques enképhaline et dynorphine induit lors d'une dénervation puis d'un traitement de L-DOPA (Samadi et al., 2006a). En effet, le Dr

Samadi émet l'hypothèse qu'un manque d'activation des récepteurs D2 dans la maladie de Parkinson soit compensé par une augmentation de la neurotransmission opioïdérique qui inhibe la signalisation ERK sur activée par un antagonisme D2. Ensuite, comme les opioïdes dans le striatum auraient un rôle près-synaptique d'inhibition de la sur-régulation glutamatergique corticostriatale, ils pourraient également inhiber la signalisation des ERKs sur activée par une hypersensibilité des D1 causant les LIDs sous L-DOPA. Ainsi, les opioïdes, *via* leur rôle d'inhibiteurs de cascades de signalisation sur activées pourraient contrecarrer l'activation aberrante des ERKs dans les D2 puis dans les D1 (Samadi et al., 2006a). Or, Nur77 est sous le contrôle des ERKs à la fois dans les D2 et dans les D1 (Bourhis et al., 2008). En outre, si l'induction de Nur77 est impliquée dans celle de l'enképhaline ce qui tend à diminuer les mouvements anormaux, elle ne l'est pas pour la dynorphine. Or le fait que Nur77 ne soit pas impliqué dans l'induction de la dynorphine qui participerait à l'initiation de la sensibilisation sans en être responsable nous laisse le champ libre à une implication de Nur77 dans les effets à long terme de la L-DOPA *via* les cascades des ERKs et de la PKC qui initieraient un apprentissage erroné. En effet, dans un contexte *in vivo* plus physiologiques, des agonistes D1/D2 activent ERK et la PKC qui elles mêmes provoquent l'induction de l'ARNm de Nur77 (inhiber ERK ou la PKC diminue l'induction de Nur77 dans les D1 (Bourhis et al., 2008)). De plus, la fonction physiologique de la voie striatale directe est d'induire le mouvement et l'augmentation de l'ARNm de Nur77 induit par une administration de L-DOPA chez les singes MPTP ne semble pas empêcher l'occurrence des LIDs (Samadi et al., 2006b). En outre, même si il y a plus de Nur77 dans les neurones des striosomes et de la matrice des singes sous DHA qui présentent un moindre risque de LIDs (Mahmoudi et al., 2009), nous avons vu que chez le rongeur, l'action du DHA anti-locomotion ne passe pas forcément par Nur77 (résultats non publiés, section de la discussion sur l'AMPH, l'effet du DHA est identique chez les souris sauvages et Nur77 knockout). Donc, puisque l'induction de l'ARNm de Nur77 dans les D1 est sous l'influence des ERKs et de la PKC et que les ERKs et la PKC sont des kinases clés des mécanismes du LTP/LTD, Nur77 ne pourrait-il pas intervenir dans les processus d'apprentissage? Particulièrement dans les LIDs et les phénomènes liés à l'amphétamine

(le DHA diminue aussi l'activité locomotrice des souris Nur77^{-/-} sous amphétamine montrant que Nur77 n'est pas essentiel aux phénomènes purement moteurs de cette drogue) où l'on sait qu'une hyper sensibilité des D1 (L-DOPA suite à une dénervation) active les cascades d'apprentissage de façon anarchique (Gerfen et al., 2002) et où forcer les mécanismes d'apprentissage naturels (amphétamine) active les ERKs (Valjent et al., 2006b)?

13. 3. Rôle d'NR4A1 dans les désordres liés à la prise d'amphétamine

Pour ne faire qu'une brève remise en situation, il a largement été démontré l'implication des ERKs dans plusieurs phénomènes d'apprentissages liés à la prise de drogue. En effet, le Dr Emmanuel Valjent et ses collaborateurs, ont démontré qu'inhiber la voie des ERKs de façon concomitante à une réexposition à la cocaïne ou à la morphine effaçait de façon durable et spécifique le CPP précédemment acquis; qu'une administration de SL327 (inhibiteur de MEK) avant chaque injection de cocaïne prévient l'installation du CPP; que ces deux mécanismes, effacer ou prévenir le CPP, se faisaient *via* un mécanisme synthèse protéique dépendant (NDR : Nur77 est un IEG mais aussi un facteur de transcription) (Valjent et al., 2006a). De plus, le blocage des MEKs prévient le développement des mécanismes d'apprentissage mais pas l'expression des mécanismes moteurs de la sensibilisation comportementale induite par une exposition répétée aux psychostimulants (Valjent et al., 2006b). Or ces résultats de l'implication des ERK dans les phénomènes de CPP mais pas d'expression de la sensibilisation suivent un parallèle étroit avec les variations de Nur77. En effet, dans nos différents protocoles de LIDs (St-Hilaire et al., 2006) ou de sensibilisation à l'amphétamine (Bourhis et al., 2009) les souris Nur77 knockout sensibilisent de la même façon que les souris sauvages. De plus, nous avons vu qu'inhiber ERK ou la PKC dans les D1 diminue l'induction de Nur77 (Bourhis et al., 2008). Or, si inhiber ERK empêche voir même efface le CPP à la cocaïne comme à l'amphétamine (Valjent et al., 2006b) et si lorsque nous inhibons ERK dans les D1 nous diminuons l'induction de Nur77 (inhiber les PKCs diminue aussi Nur77) et que des résultats non publiés du laboratoire démontrent que les

souris Nur77 knockout ne présentent pas de CPP à la cocaïne (comme ce que le Dr Valjent observe lorsqu'il inhibe ERK qui nous le savons maintenant diminue l'induction de Nur77 et efface voire empêche le CPP) serait-il possible que Nur77 soit un acteur non pas des phénomènes de sensibilisation liés aux drogues d'abus mais des phénomènes de plasticité synaptique liés aux phénomènes d'apprentissages dans les D1? En effet, sous drogues d'abus, ce phénomène de formation ou de consolidation de la mémoire est D1 spécifique puisque ERK n'est actif dans les D2 que si la drogue est donnée dans un nouvel environnement (Ferguson and Robinson, 2004). D'ailleurs, le Dr Susan M. Ferguson en conclue que l'administration d'amphétamine dans un nouvel environnement active le néocortex, que cela stimule la libération de glutamate dans le striatum recrutant les récepteurs NMDA contenant la sous unité NR2B sur les neurones D2 et qu'en présence de dopamine, cela va activer la cascade de transcription ERK/MAP kinase (Ferguson and Robinson, 2004) qui inhibe l'induction de l'ARNm de Nur77 dans les D2 (Bourhis et al., 2008).

Remarque n°1 : dans les neurones de la voie D2 la régulation de Nur77 semble complexe puisqu'inhiber ERK augmente Nur77 et inhiber la PKC diminue l'induction de Nur77 alors que l'activation de ERK y est PKC dépendante (Bourhis et al., 2008).

Remarque n°2 : les souris Nur77 knockout n'ont plus de CPP à la cocaïne mais cela nécessiterait une reproduction expérimental sous amphétamine car les mécanismes d'action de la cocaïne et de l'amphétamine sont différents.

13. 4. NR4A1 et les mécanismes d'apprentissage?

Certains travaux du Dr James D. Surmeier démontrent, en ciblant le phénomène de « synaptic scaling » des synapses glutamatergiques corticostriatales (le « synaptic scaling » est une forme de plasticité synaptique qui suivrait dans le temps le LTP/LTD mais destinée à maintenir les réseaux neuronaux dans un état de connectivité optimale (Tian et al. 2010)) qu'il était dépendant d'une dépolarisation soutenue et de l'ouverture des canaux calciques Cav1.2 de type L où l'entrée de calcium, en activant la calcineurine (phosphatase calcium dépendante aussi appelée PP2B) allait induire l'activation transcriptionnelle de MEF2 qui a pour résultat d'induire la transcription de

deux gènes précédemment liés au remodelage synaptique Arc (Shepherd et al., 2006) et Nur77 (MEF2 est constitutivement fixé sur le promoteur de Nur77 qu'il réprime avec la Cabin1) (Shalizi et al., 2006) ce qui aurait pour conséquence un élagage abusif des synapses corticostriatales des neurones de la voie indirecte (Tian et al. 2010). De ce fait, inhiber Nur77 dans les D2 semble favoriser les phénomènes d'apprentissage et de mémorisation alors que ce serait son induction dans les D1 qui favoriserait ces phénomènes.

Remarque : nous sommes ici dans un contexte de maladie de Parkinson et la dépolarisation soutenue reproduirait (selon ce que j'ai compris) in vitro la dénervation dopaminergique observée in vivo où le récepteur D2 tend à diminuer l'excitabilité des neurones striatopallidaux lorsque la dopamine n'est plus présente.

Je dis qu'inhiber Nur77 dans les D2 favoriserait les phénomènes d'apprentissage et de mémorisation car c'est dans les D2 que Nur77 est induit lors d'une dénervation et c'est aussi dans les D2 que la densité des épines dendritiques glutamatergiques corticostriatales est diminuée lors d'une dénervation (l'intégrité des synapses des neurones striatonigraux est relativement bien préservée). De plus, il a été prouvé sur des coupes de cervelet, qu'un dominant négatif de Nur77 favorisait le développement et la différenciation des épines dendritiques comparé à la transfection d'un vecteur de Nur77 sauvage où la morphogenèse des épines dendritiques était moins avancée indiquant que réprimer la transcription de Nur77 était favorable à la différenciation des épines dendritiques (Shalizi et al., 2006). Je parle également d'une induction de Nur77 dans les D1 qui serait bénéfique pour l'apprentissage (apprentissage pathologique dans les LIDs) dans les phénomènes de toxicomanie, à cause d'un article récent publié en collaboration au sein du laboratoire (Bedard et al., 2011). En effet, l'équipe du Dr Anne-Noël Samaha y démontre qu'une administration continue d'halopéridol mais pas une administration chronique journalière, potentialise l'habileté de l'amphétamine à lier une valeur prédictive aux indices reliés à la drogue indiquant par là même qu'un traitement chronique mais intermittent d'halopéridol serait peut être plus indiqué chez les patients schizophrènes à fort risque de comportements d'addiction (Bedard et al., 2011). Or, si l'habileté de l'halopéridol à augmenter la réponse conditionnée à l'amphétamine serait

liée au développement d'une hypersensibilité comportementale due à la stimulation continue des récepteurs dopaminergiques qui exagère la réponse psychomotrice liée à l'amphétamine (Bedard et al., 2011); personnellement, je me demande si l'halopéridol en continue ne reproduirait pas, d'une certaine façon, les changements moléculaires associés à une délétion dopaminergique dans la maladie de Parkinson re-crétant la sur-activation des cascades de signalisation ERK observée dans les D1 (Samadi et al., 2006a)? Cette sur activation des cascade d'apprentissage dans les D1 permettrait la facilitation d'apprentissage des indices liés à l'amphétamine comme observé. De plus, la composante glutamatergique des antipsychotiques comme récemment démontré au sein du laboratoire permettrait peut être une facilitation ou un pré-amorçage du LTP striatal et de l'accumbens mGluR dépendant qui sont induits et renforcés par les mécanismes d'action de l'amphétamine. En outre, si l'on reprend les résultats d'hybridation *in situ* de l'article du Dr Samaha, l'halopéridol en continue pose les bases d'une plus forte induction de Nur77 dans les D1 suite à un challenge d'amphétamine comparé à l'administration d'halopéridol chronique mais journalière (NDR: dans l'article nous pouvons observer que l'induction de Nur77, comme celle de c-fos, se fait dans les D1 et dans les D2 de façon significative mais elle est très faible dans les D2 comparativement aux D1) me ramenant encore à la question d'un rôle potentiel de Nur77 dans les phénomènes d'apprentissage (LTP/LTD) liés à l'amphétamine dans les D1?

Quoi qu'il en soit, cette théorie de Nur77 dans les mécanismes de LTP/LTD n'en est qu'à ses balbutiements et une bonne approche pour déterminer le rôle de Nur77 non seulement dans les D2 vis à vis d'une dénervation ou des antipsychotiques mais aussi dans les D1 pour la L-DOPA ou les drogues d'abus serait de reproduire une induction forcée sélective (anatomiquement parlant accumbens *versus* striatum dorsal et neurone spécifique D1 *versus* D2) chez la souris adulte de Nur77 (ceci à déjà était fait par le Dr Éric J. Nestler pour Δ FosB sur exprimable dans les neurones D1 du Nac et du striatum par le système de régulation génique à la tétracycline afin de tester une sur-expression de Δ FosB avant administration de cocaïne (Kelz et al., 1999)) avant l'administration de drogue (ou de tout autre protocole) pour voir si la présence à priori de Nur77 dans ces

neurones permettrait de déterminer un rôle vers une facilitation de l'apprentissage tout comme une sur activation de ERK2 dans le striatum facilite l'apprentissage et la mémorisation chez les souris ERK1 knockout (Mazzucchelli et al., 2002).

Bibliographie

- Agranoff BW (1976) Biochemical concomitants of the storage of behavioral information. *Biochem Sensory Funct* 597-623.
- Ahmad Z, Lee FT, DePaoli-Roach A, Roach PJ (1984) Phosphorylation of glycogen synthase by the Ca²⁺- and phospholipid-activated protein kinase (protein kinase C). *J Biol Chem* 259:8743-8747.
- Aloyo VJ, Zwiers H, Gispen WH (1983) Phosphorylation of B-50 protein by calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase and B-50 protein kinase. *J Neurochem* 41:649-653.
- Andersson M, Hilbertson A, Cenci MA (1999) Striatal fosB expression is causally linked with l-DOPA-induced abnormal involuntary movements and the associated upregulation of striatal prodynorphin mRNA in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 6:461-474.
- Andreassen OA, Finsen B, Ostergaard K, Sorensen JC, West MJ, Jorgensen HA (1999) The relationship between oral dyskinesias produced by long-term haloperidol treatment, the density of striatal preproenkephalin messenger RNA and enkephalin peptide, and the number of striatal neurons expressing preproenkephalin messenger RNA in rats. *Neuroscience* 88:27-35.
- Anwyl R (2009) Metabotropic glutamate receptor-dependent long-term potentiation. *Neuropharmacology* 56:735-740.
- Aouadi M, Binetruy B, Caron L, Le Marchand-Brustel Y, Bost F (2006) Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. *Biochimie* 88:1091-1098.
- Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD (1998) The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci* 1:602-609.
- Aubert I, Guigoni C, Hakansson K, Li Q, Dovero S, Barthe N, Bioulac BH, Gross CE, Fisone G, Bloch B, Bezard E (2005) Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia. *Ann Neurol* 57:17-26.
- Badiani A, Browman KE, Robinson TE (1995) Influence of novel versus home environments on sensitization to the psychomotor stimulant effects of cocaine and amphetamine. *Brain Res* 674:291-298.
- Badiani A, Oates MM, Day HE, Watson SJ, Akil H, Robinson TE (1999) Environmental modulation of amphetamine-induced c-fos expression in D1 versus D2 striatal neurons. *Behav Brain Res* 103:203-209.
- Bailey CH, Kandel ER (1993) Structural changes accompanying memory storage. *Annu Rev Physiol* 55:397-426.
- Baldessarini RJ (1990) Drugs and the treatment of psychiatric disorders. In: *The Pharmacology Basis of Therapeutics*(A. G. Goodman, T. W. R., ed), pp 383-435 New York: Pergamon Press.

- Barnes TD, Kubota Y, Hu D, Jin DZ, Graybiel AM (2005) Activity of striatal neurons reflects dynamic encoding and recoding of procedural memories. *Nature* 437:1158-1161.
- Battaini F (2001) Protein kinase C isoforms as therapeutic targets in nervous system disease states. *Pharmacol Res* 44:353-361.
- Batty IR, Nahorski SR, Irvine RF (1985) Rapid formation of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate following muscarinic receptor stimulation of rat cerebral cortical slices. *Biochem J* 232:211-215.
- Beaudry G, Langlois MC, Weppe I, Rouillard C, Levesque D (2000) Contrasting patterns and cellular specificity of transcriptional regulation of the nuclear receptor nerve growth factor-inducible B by haloperidol and clozapine in the rat forebrain. *J Neurochem* 75:1694-1702.
- Beaulieu JM, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Caron MG (2006) Paradoxical striatal cellular signaling responses to psychostimulants in hyperactive mice. *J Biol Chem* 281:32072-32080.
- Beaulieu JM, Sotnikova TD, Marion S, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Caron MG (2005) An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell* 122:261-273.
- Beaulieu JM, Sotnikova TD, Yao WD, Kockeritz L, Woodgett JR, Gainetdinov RR, Caron MG (2004) Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:5099-5104.
- Bedard AM, Maheux J, Levesque D, Samaha AN (2011) Continuous, but not intermittent, antipsychotic drug delivery intensifies the pursuit of reward cues. *Neuropsychopharmacology* 36:1248-1259.
- Benavides DR, Bibb JA (2004) Role of Cdk5 in drug abuse and plasticity. *Ann N Y Acad Sci* 1025:335-344.
- Benoit-Marand M, Borrelli E, Gonon F (2001) Inhibition of dopamine release via presynaptic D2 receptors: time course and functional characteristics in vivo. *J Neurosci* 21:9134-9141.
- Berke JD, Hyman SE (2000) Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron* 25:515-532.
- Berke JD, Paletzki RF, Aronson GJ, Hyman SE, Gerfen CR (1998) A complex program of striatal gene expression induced by dopaminergic stimulation. *J Neurosci* 18:5301-5310.
- Berretta S, Robertson HA, Graybiel AM (1992) Dopamine and glutamate agonists stimulate neuron-specific expression of Fos-like protein in the striatum. *J Neurophysiol* 68:767-777.

- Berridge MJ, Irvine RF (1984) Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312:315-321.
- Bertran-Gonzalez J, Bosch C, Maroteaux M, Matamales M, Herve D, Valjent E, Girault JA (2008) Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *J Neurosci* 28:5671-5685.
- Bezard E, Ferry S, Mach U, Stark H, Leriche L, Boraud T, Gross C, Sokoloff P (2003) Attenuation of levodopa-induced dyskinesia by normalizing dopamine D3 receptor function. *Nat Med* 9:762-767.
- Bibb JA, Chen J, Taylor JR, Svenningsson P, Nishi A, Snyder GL, Yan Z, Sagawa ZK, Ouimet CC, Nairn AC, Nestler EJ, Greengard P (2001) Effects of chronic exposure to cocaine are regulated by the neuronal protein Cdk5. *Nature* 410:376-380.
- Birkmayer W, Hornykiewicz O (1961) [The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia]. *Wien Klin Wochenschr* 73:787-788.
- Bjorklund A, Dunnett SB (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 30:194-202.
- Blanchet PJ, Konitsiotis S, Chase TN (1998) Amantadine reduces levodopa-induced dyskinesias in parkinsonian monkeys. *Mov Disord* 13:798-802.
- Blanchet PJ, Metman LV, Chase TN (2003) Renaissance of amantadine in the treatment of Parkinson's disease. *Adv Neurol* 91:251-257.
- Blanchet PJ, Parent MT, Rompre PH, Levesque D (2012) Relevance of animal models to human tardive dyskinesia. *Behav Brain Funct* 8:12.
- Bliss TV, Gardner-Medwin AR (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:357-374.
- Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:331-356.
- Blum S, Moore AN, Adams F, Dash PK (1999) A mitogen-activated protein kinase cascade in the CA1/CA2 subfield of the dorsal hippocampus is essential for long-term spatial memory. *J Neurosci* 19:3535-3544.
- Bondy GP (1991) Phorbol ester, forskolin, and serum induction of a human colon nuclear hormone receptor gene related to the NUR 77/NGFI-B genes. *Cell Growth Differ* 2:203-208.
- Bordet R, Ridray S, Carboni S, Diaz J, Sokoloff P, Schwartz JC (1997) Induction of dopamine D3 receptor expression as a mechanism of behavioral sensitization to levodopa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3363-3367.

- Bordet R, Ridray S, Schwartz JC, Sokoloff P (2000) Involvement of the direct striatonigral pathway in levodopa-induced sensitization in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Eur J Neurosci* 12:2117-2123.
- Borgland SL, Taha SA, Sarti F, Fields HL, Bonci A (2006) Orexin A in the VTA is critical for the induction of synaptic plasticity and behavioral sensitization to cocaine. *Neuron* 49:589-601.
- Boulton TG, Cobb MH (1991) Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regul* 2:357-371.
- Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD (1991) ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65:663-675.
- Bourhis E, Maheux J, Paquet B, Kagechika H, Shudo K, Rompre PP, Rouillard C, Levesque D (2009) The transcription factors Nur77 and retinoid X receptors participate in amphetamine-induced locomotor activities. *Psychopharmacology (Berl)* 202:635-648.
- Bourhis E, Maheux J, Rouillard C, Levesque D (2008) Extracellular signal-regulated kinases (ERK) and protein kinase C (PKC) activities are involved in the modulation of Nur77 and Nor-1 expression by dopaminergic drugs. *J Neurochem* 106:875-888.
- Bouzinba-Segard H, Fan XT, Perderiset M, Castagna M (1994) Synergy between phorbol esters and retinoic acid in inducing protein kinase C activation. *Biochem Biophys Res Commun* 204:112-119.
- Braconi Quintaje S, Church DJ, Rebsamen M, Valloton MB, Hemmings BA, Lang U (1996) Role of protein phosphatase 2A in the regulation of mitogen-activated protein kinase activity in ventricular cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 221:539-547.
- Braithwaite SP, Paul S, Nairn AC, Lombroso PJ (2006) Synaptic plasticity: one STEP at a time. *Trends Neurosci* 29:452-458.
- Brambilla R, Gnesutta N, Minichiello L, White G, Roylance AJ, Herron CE, Ramsey M, Wolfer DP, Cestari V, Rossi-Arnaud C, Grant SG, Chapman PF, Lipp HP, Sturani E, Klein R (1997) A role for the Ras signalling pathway in synaptic transmission and long-term memory. *Nature* 390:281-286.
- Brami-Cherrier K, Valjent E, Herve D, Darragh J, Corvol JC, Pages C, Arthur SJ, Girault JA, Caboche J (2005) Parsing molecular and behavioral effects of cocaine in mitogen- and stress-activated protein kinase-1-deficient mice. *J Neurosci* 25:11444-11454.
- Bruning JC, Gillette JA, Zhao Y, Bjorbaeck C, Kotzka J, Knebel B, Avci H, Hanstein B, Lingohr P, Moller DE, Krone W, Kahn CR, Muller-Wieland D (2000) Ribosomal

- subunit kinase-2 is required for growth factor-stimulated transcription of the c-Fos gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2462-2467.
- Bunzow JR, Van Tol HH, Grandy DK, Albert P, Salon J, Christie M, Machida CA, Neve KA, Civelli O (1988) Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature* 336:783-787.
- Burris KD, Molski TF, Xu C, Ryan E, Tottori K, Kikuchi T, Yocca FD, Molinoff PB (2002) Aripiprazole, a novel antipsychotic, is a high-affinity partial agonist at human dopamine D2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 302:381-389.
- Cador M, Bjiou Y, Cailhol S, Stinus L (1999) D-amphetamine-induced behavioral sensitization: implication of a glutamatergic medial prefrontal cortex-ventral tegmental area innervation. *Neuroscience* 94:705-721.
- Calabresi P, Centonze D, Bernardi G (2000a) Electrophysiology of dopamine in normal and denervated striatal neurons. *Trends Neurosci* 23:S57-63.
- Calabresi P, Di Filippo M, Ghiglieri V, Picconi B (2008) Molecular mechanisms underlying levodopa-induced dyskinesia. *Mov Disord* 23 Suppl 3:S570-579.
- Calabresi P, Giacomini P, Centonze D, Bernardi G (2000b) Levodopa-induced dyskinesia: a pathological form of striatal synaptic plasticity? *Ann Neurol* 47:S60-68; discussion S68-69.
- Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Di Filippo M (2007) Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 30:211-219.
- Callier S, Snapyan M, Le Crom S, Prou D, Vincent JD, Vernier P (2003) Evolution and cell biology of dopamine receptors in vertebrates. *Biol Cell* 95:489-502.
- Calon F, Hadj Tahar A, Blanchet PJ, Morissette M, Grondin R, Goulet M, Doucet JP, Robertson GS, Nestler E, Di Paolo T, Bedard PJ (2000) Dopamine-receptor stimulation: biobehavioral and biochemical consequences. *Trends Neurosci* 23:S92-100.
- Cao X, Yasuda T, Uthayathas S, Watts RL, Mouradian MM, Mochizuki H, Papa SM (2010) Striatal overexpression of DeltaFosB reproduces chronic levodopa-induced involuntary movements. *J Neuroscience* 30(21):7335-43.
- Carlezon WA, Jr., Duman RS, Nestler EJ (2005) The many faces of CREB. *Trends Neurosci* 28:436-445.
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T (1957) 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* 180:1200.
- Carta A, Fenu S, Morelli M (2001) Alterations in GAD67, dynorphin and enkephalin mRNA in striatal output neurons following priming in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. *Neurol Sci* 22:59-60.
- Casadio A, Martin KC, Giustetto M, Zhu H, Chen M, Bartsch D, Bailey CH, Kandel ER (1999) A transient, neuron-wide form of CREB-mediated long-term facilitation

- can be stabilized at specific synapses by local protein synthesis. *Cell* 99:221-237.
- Casey DE, Zorn SH (2001) The pharmacology of weight gain with antipsychotics. *J Clin Psychiatry* 62 Suppl 7:4-10.
- Castillo SO, Baffi JS, Palkovits M, Goldstein DS, Kopin IJ, Witta J, Magnuson MA, Nikodem VM (1998) Dopamine biosynthesis is selectively abolished in substantia nigra/ventral tegmental area but not in hypothalamic neurons in mice with targeted disruption of the *Nurr1* gene. *Mol Cell Neurosci* 11:36-46.
- Castillo SO, Xiao Q, Lyu MS, Kozak CA, Nikodem VM (1997) Organization, sequence, chromosomal localization, and promoter identification of the mouse orphan nuclear receptor *Nurr1* gene. *Genomics* 41:250-257.
- Cenci MA (2002) Transcription factors involved in the pathogenesis of L-DOPA-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Amino Acids* 23:105-109.
- Cenci MA, Kalen P, Mandel RJ, Wictorin K, Bjorklund A (1992) Dopaminergic transplants normalize amphetamine- and apomorphine-induced Fos expression in the 6-hydroxydopamine-lesioned striatum. *Neuroscience* 46:943-957.
- Cenci MA, Lee CS, Bjorklund A (1998) L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA. *Eur J Neurosci* 10:2694-2706.
- Centonze D, Gubellini P, Picconi B, Calabresi P, Giacomini P, Bernardi G (1999) Unilateral dopamine denervation blocks corticostriatal LTP. *J Neurophysiol* 82:3575-3579.
- Chambon P (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 10:940-954.
- Chang C, Kokontis J, Liao SS, Chang Y (1989) Isolation and characterization of human TR3 receptor: a member of steroid receptor superfamily. *J Steroid Biochem* 34:391-395.
- Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410:37-40.
- Chase TN, Oh JD, Konitsiotis S (2000) Antiparkinsonian and antidyskinetic activity of drugs targeting central glutamatergic mechanisms. *J Neurol* 247 Suppl 2:II36-42.
- Chen BT, Bowers MS, Martin M, Hopf FW, Guillory AM, Carelli RM, Chou JK, Bonci A (2008) Cocaine but not natural reward self-administration nor passive cocaine infusion produces persistent LTP in the VTA. *Neuron* 59:288-297.

- Chen RH, Sarnecki C, Blenis J (1992) Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol* 12:915-927.
- Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH (2001) MAP kinases. *Chem Rev* 101:2449-2476.
- Choe ES, Chung KT, Mao L, Wang JQ (2002) Amphetamine increases phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and transcription factors in the rat striatum via group I metabotropic glutamate receptors. *Neuropsychopharmacology* 27:565-575.
- Clark D, White FJ (1987) D1 dopamine receptor--the search for a function: a critical evaluation of the D1/D2 dopamine receptor classification and its functional implications. *Synapse* 1:347-388.
- Clark J, Benjamin H, Gill S, Sidhar S, Goodwin G, Crew J, Gusterson BA, Shipley J, Cooper CS (1996) Fusion of the EWS gene to CHN, a member of the steroid/thyroid receptor gene superfamily, in a human myxoid chondrosarcoma. *Oncogene* 12:229-235.
- Cole AJ, Bhat RV, Patt C, Worley PF, Baraban JM (1992) D1 dopamine receptor activation of multiple transcription factor genes in rat striatum. *J Neurochem* 58:1420-1426.
- Cole DG, Kobiarski LA, Konradi C, Hyman SE (1994) 6-Hydroxydopamine lesions of rat substantia nigra up-regulate dopamine-induced phosphorylation of the cAMP-response element-binding protein in striatal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9631-9635.
- Cole RL, Konradi C, Douglass J, Hyman SE (1995) Neuronal adaptation to amphetamine and dopamine: molecular mechanisms of prodynorphin gene regulation in rat striatum. *Neuron* 14:813-823.
- Colon-Cesario WI, Martinez-Montemayor MM, Morales S, Felix J, Cruz J, Adorno M, Pereira L, Colon N, Maldonado-Vlaar CS, Pena de Ortiz S (2006) Knockdown of Nurr1 in the rat hippocampus: implications to spatial discrimination learning and memory. *Learn Mem* 13:734-744.
- Costentin J (1995) Dopamine et transmissions dopaminergiques In: *Neuropeptides et neuromédiateurs*(INSERM, L. é., ed), pp 97-105: Imprimerie Busson.
- Crawford PA, Sadovsky Y, Woodson K, Lee SL, Milbrandt J (1995) Adrenocortical function and regulation of the steroid 21-hydroxylase gene in NGFI-B-deficient mice. *Mol Cell Biol* 15:4331-4316.
- Creese I, Iversen SD (1975) The pharmacological and anatomical substrates of the amphetamine response in the rat. *Brain Res* 83:419-436.
- Cremona ML, Matthies HJ, Pau K, Bowton E, Speed N, Lute BJ, Anderson M, Sen N, Robertson SD, Vaughan RA, Rothman JE, Galli A, Javitch JA, Yamamoto A (2011)

- Flotillin-1 is essential for PKC-triggered endocytosis and membrane microdomain localization of DAT. *Nat Neurosci* 14:469-477.
- Curran EJ, Watson SJ, Jr. (1995) Dopamine receptor mRNA expression patterns by opioid peptide cells in the nucleus accumbens of the rat: a double in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 361:57-76.
- Dal Toso R, Sommer B, Ewert M, Herb A, Pritchett DB, Bach A, Shivers BD, Seeburg PH (1989) The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO J* 8:4025-4034.
- Darragh J, Soloaga A, Beardmore VA, Wingate AD, Wiggin GR, Peggie M, Arthur JS (2005) MSKs are required for the transcription of the nuclear orphan receptors Nur77, Nurr1 and Nor1 downstream of MAPK signalling. *Biochem J* 390:749-759.
- Das S, Grunert M, Williams L, Vincent SR (1997) NMDA and D1 receptors regulate the phosphorylation of CREB and the induction of c-fos in striatal neurons in primary culture. *Synapse* 25:227-233.
- Datta K, Bellacosa A, Chan TO, Tsichlis PN (1996) Akt is a direct target of the phosphatidylinositol 3-kinase. Activation by growth factors, v-src and v-Ha-ras, in Sf9 and mammalian cells. *J Biol Chem* 271:30835-30839.
- Davis IJ, Hazel TG, Chen RH, Blenis J, Lau LF (1993) Functional domains and phosphorylation of the orphan receptor Nur77. *Mol Endocrinol* 7:953-964.
- Davis S, Vanhoutte P, Pages C, Caboche J, Laroche S (2000) The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci* 20:4563-4572.
- De Mei C, Ramos M, Iitaka C, Borrelli E (2009) Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *Curr Opin Pharmacol* 9:53-58.
- de Urquiza AM, Liu S, Sjoberg M, Zetterstrom RH, Griffiths W, Sjoval J, Perlmann T (2000) Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science* 290:2140-2144.
- Dearry A, Gingrich JA, Falardeau P, Fremeau RT, Jr., Bates MD, Caron MG (1990) Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature* 347:72-76.
- Del Dotto P, Pavese N, Gambaccini G, Bernardini S, Metman LV, Chase TN, Bonuccelli U (2001) Intravenous amantadine improves levodopa-induced dyskinesias: an acute double-blind placebo-controlled study. *Mov Disord* 16:515-520.
- Dequiedt F, Van Lint J, Lecomte E, Van Duppen V, Seufferlein T, Vandenhede JR, Wattiez R, Kettmann R (2005) Phosphorylation of histone deacetylase 7 by protein kinase D mediates T cell receptor-induced Nur77 expression and apoptosis. *J Exp Med* 201:793-804.

- DeYoung RA, Baker JC, Cado D, Winoto A (2003) The orphan steroid receptor Nur77 family member Nor-1 is essential for early mouse embryogenesis. *J Biol Chem* 278:47104-47109.
- Dickinson SD, Sabeti J, Larson GA, Giardina K, Rubinstein M, Kelly MA, Grandy DK, Low MJ, Gerhardt GA, Zahniser NR (1999) Dopamine D2 receptor-deficient mice exhibit decreased dopamine transporter function but no changes in dopamine release in dorsal striatum. *J Neurochem* 72:148-156.
- Ding Y, Won L, Britt JP, Lim SA, McGehee DS, Kang UJ (2011) Enhanced striatal cholinergic neuronal activity mediates L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:840-845.
- Dohlman HG, Thorner J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1991) Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem* 60:653-688.
- Dougherty GG, Jr., Ellinwood EH, Jr. (1981) Chronic D-amphetamine in nucleus accumbens: lack of tolerance or reverse tolerance of locomotor activity. *Life Sci* 28:2295-2298.
- Douglass J, McKinzie AA, Couceyro P (1995) PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J Neurosci* 15:2471-2481.
- Dupre KB (2008) A potential neuroanatomical dissociation of DARPP-32 in striatal ERK signaling. *J Neurosci* 28:10783-10785.
- Durell J, Garland JT, Friedel RO (1969) Acetylcholine action: biochemical aspects. *Science* 165:862-866.
- Duty S, Brotchie JM (1997) Enhancement of the behavioral response to apomorphine administration following repeated treatment in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat is temporally correlated with a rise in striatal preproenkephalin-B, but not preproenkephalin-A, gene expression. *Exp Neurol* 144:423-432.
- Duvoisin RC (1974) Variations in the "on-off" phenomenon. *Adv Neurol* 5:339-340.
- Dynan WS, Tjian R (1983) The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 35:79-87.
- Dziedzicka-Wasylewska M (2004) Brain dopamine receptors--research perspectives and potential sites of regulation. *Pol J Pharmacol* 56:659-671.
- Edeleano L (1887) Uber einige Derivated der Phenylmetacrylsäure und der Phenylisobuttersäure. *Chem Ges*, 20:616-622.
- Eells JB WJ, Ottridge JD, Zuffova E & Nikodem VM (2000) Structure and Function of the Nur77 Receptor Subfamily, a Unique Class of Hormone Nuclear Receptor. *Current Genomics* 1:135-152.

- Ehringer H, Hornykiewicz O (1960) [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klin Wochenschr* 38:1236-1239.
- Elazar Z, Siegel G, Fuchs S (1989) Association of two pertussis toxin-sensitive G-proteins with the D2-dopamine receptor from bovine striatum. *EMBO J* 8:2353-2357.
- Ellinwood EH, Jr., Kilbey MM (1975) Amphetamine stereotypy: the influence of environmental factors and prepotent behavioral patterns on its topography and development. *Biol Psychiatry* 10:3-16.
- Ellinwood EH, Jr., Sudilovsky A, Nelson LM (1973) Evolving behavior in the clinical and experimental amphetamine (model) psychosis. *Am J Psychiatry* 130:1088-1093.
- Engber TM, Boldry RC, Kuo S, Chase TN (1992) Dopaminergic modulation of striatal neuropeptides: differential effects of D1 and D2 receptor stimulation on somatostatin, neuropeptide Y, neurotensin, dynorphin and enkephalin. *Brain Res* 581:261-268.
- English JD, Sweatt JD (1996) Activation of p42 mitogen-activated protein kinase in hippocampal long term potentiation. *J Biol Chem* 271:24329-24332.
- English JD, Sweatt JD (1997) A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation. *J Biol Chem* 272:19103-19106.
- Ernst AM (1967) Mode of action of apomorphine and dexamphetamine on gnawing compulsion in rats. *Psychopharmacologia* 10:316-323.
- Ethier I, Beaudry G, St-Hilaire M, Milbrandt J, Rouillard C, Levesque D (2004a) The transcription factor NGFI-B (Nur77) and retinoids play a critical role in acute neuroleptic-induced extrapyramidal effect and striatal neuropeptide gene expression. *Neuropsychopharmacology* 29:335-346.
- Ethier I, Kagechika H, Shudo K, Rouillard C, Levesque D (2004b) Docosahexaenoic acid reduces haloperidol-induced dyskinesias in mice: involvement of Nur77 and retinoid receptors. *Biol Psychiatry* 56:522-526.
- Evans RM (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-895.
- Evans RM, Hollenberg SM (1988) Zinc fingers: guilt by association. *Cell* 52:1-3.
- Everitt BJ, Cardinal RN, Parkinson JA, Robbins TW (2003) Appetitive behavior: impact of amygdala-dependent mechanisms of emotional learning. *Ann N Y Acad Sci* 985:233-250.
- Everitt BJ, Dickinson A, Robbins TW (2001) The neuropsychological basis of addictive behaviour. *Brain Res Brain Res Rev* 36:129-138.

- Everitt BJ, Robbins TW (2005) Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* 8:1481-1489.
- Fahrner TJ, Carroll SL, Milbrandt J (1990) The NGFI-B protein, an inducible member of the thyroid/steroid receptor family, is rapidly modified posttranslationally. *Mol Cell Biol* 10:6454-6459.
- Fasano S, Bezard E, D'Antoni A, Francardo V, Indrigo M, Qin L, Dovero S, Cerovic M, Cenci MA, Brambilla R (2010) Inhibition of Ras-guanine nucleotide-releasing factor 1 (Ras-GRF1) signaling in the striatum reverts motor symptoms associated with L-dopa-induced dyskinesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:21824-21829.
- Ferguson SM, Robinson TE (2004) Amphetamine-evoked gene expression in striatopallidal neurons: regulation by corticostriatal afferents and the ERK/MAPK signaling cascade. *J Neurochem* 91:337-348.
- Ferre S, O'Connor WT, Snaprud P, Ungerstedt U, Fuxe K (1994) Antagonistic interaction between adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors in the ventral striopallidal system. Implications for the treatment of schizophrenia. *Neuroscience* 63:765-773.
- Ferre S, von Euler G, Johansson B, Fredholm BB, Fuxe K (1991) Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7238-7241.
- Ferrell JE, Jr. (1996) Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs. *Trends Biochem Sci* 21:460-466.
- Fienberg AA, Hiroi N, Mermelstein PG, Song W, Snyder GL, Nishi A, Chermay A, O'Callaghan JP, Miller DB, Cole DG, Corbett R, Haile CN, Cooper DC, Onn SP, Grace AA, Ouimet CC, White FJ, Hyman SE, Surmeier DJ, Girault J, Nestler EJ, Greengard P (1998) DARPP-32: regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. *Science* 281:838-842.
- Fiore RS, Bayer VE, Pelech SL, Posada J, Cooper JA, Baraban JM (1993) p42 mitogen-activated protein kinase in brain: prominent localization in neuronal cell bodies and dendrites. *Neuroscience* 55:463-472.
- Fisch TM, Prywes R, Roeder RG (1989) An AP1-binding site in the c-fos gene can mediate induction by epidermal growth factor and 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. *Mol Cell Biol* 9:1327-1331.
- Fisher TL, Blenis J (1996) Evidence for two catalytically active kinase domains in pp90rsk. *Mol Cell Biol* 16:1212-1219.
- Flajolet M, Wang, Z., Fetter, M., Shen, W., Nuangchamnong, N., Bendor, J., Wallach, I., Nairn, A. C., Surmeier, D. J., Greengard, P. (2008) FGF acts as a co-transmitter

- through adenosine A(2A) receptor to regulate synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 11:1402-1409.
- Flexner LB, Flexner JB, Delahaba G, Roberts RB (1965) Loss of Memory as Related to Inhibition of Cerebral Protein Synthesis. *Journal of Neurochemistry* 12:535-&.
- Forman BM, Umesono K, Chen J, Evans RM (1995) Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell* 81:541-550.
- Francardo V, Recchia A, Popovic N, Andersson D, Nissbrandt H, Cenci AM (2011) Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease* 42:327-340.
- French PJ, O'Connor V, Voss K, Stean T, Hunt SP, Bliss TV (2001) Seizure-induced gene expression in area CA1 of the mouse hippocampus. *Eur J Neurosci* 14:2037-2041.
- Frodin M, Gammeltoft S (1999) Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol Cell Endocrinol* 151:65-77.
- Fukui R, Svenningsson P, Matsuishi T, Higashi H, Nairn AC, Greengard P, Nishi A (2003) Effect of methylphenidate on dopamine/DARPP signalling in adult, but not young, mice. *J Neurochem* 87:1391-1401.
- Gerfen CR (1992) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Annu Rev Neurosci* 15:285-320.
- Gerfen CR (2000) Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways. *Trends Neurosci* 23:S64-70.
- Gerfen CR (2003) D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum animal model of Parkinson's disease. *Neuroscientist* 9:455-462.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Jr., Sibley DR (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250:1429-1432.
- Gerfen CR, McGinty JF, Young WS, 3rd (1991) Dopamine differentially regulates dynorphin, substance P, and enkephalin expression in striatal neurons: in situ hybridization histochemical analysis. *J Neurosci* 11:1016-1031.
- Gerfen CR, Miyachi S, Paletzki R, Brown P (2002) D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum results from a switch in the regulation of ERK1/2/MAP kinase. *J Neurosci* 22:5042-5054.
- Gerfen CR, Paletzki R, Worley P (2008) Differences between dorsal and ventral striatum in *Drd1a* dopamine receptor coupling of dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein-32 to activation of extracellular signal-regulated kinase. *J Neurosci* 28:7113-7120.

- Gerfen CR, Young WS, 3rd (1988) Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix compartments: an in situ hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study. *Brain Res* 460:161-167.
- Gerfen CRaW, C.J. (1996) The basal ganglia. In: *Handbook of chemical neuroanatomy*(In: Swanson LW, B. A., Hökfelt T, ed), pp 371-468 Amsterdam: Elsevier.
- Gerlach J (1991) New antipsychotics: classification, efficacy, and adverse effects. *Schizophr Bull* 17:289-309.
- Gerlai R (1996) Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype? *Trends Neurosci* 19:177-181.
- Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V (2006) Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 58:685-704.
- Gervais J, Soghomonian JJ, Richard D, Rouillard C (1999) Dopamine and serotonin interactions in the modulation of the expression of the immediate-early transcription factor, nerve growth factor-inducible B, in the striatum. *Neuroscience* 91:1045-1054.
- Giambalvo CT (2003) Differential effects of amphetamine transport vs. dopamine reverse transport on particulate PKC activity in striatal synaptoneurosomes. *Synapse* 49:125-133.
- Giambalvo CT (2004) Mechanisms underlying the effects of amphetamine on particulate PKC activity. *Synapse* 51:128-139.
- Giambalvo CT, Price LH (2003) Effects of fenfluramine and antidepressants on protein kinase C activity in rat cortical synaptoneurosomes. *Synapse* 50:212-222.
- Giambalvo CT, Wagner RL (1994) Activation of D1 and D2 dopamine receptors inhibits protein kinase C activity in striatal synaptoneurosomes. *J Neurochem* 63:169-176.
- Giguere V (1999) Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev* 20:689-725.
- Gilbert F, Morissette M, St-Hilaire M, Paquet B, Rouillard C, Di Paolo T, Levesque D (2006) Nur77 gene knockout alters dopamine neuron biochemical activity and dopamine turnover. *Biol Psychiatry* 60:538-547.
- Gines S, Hillion J, Torvinen M, Le Crom S, Casado V, Canela EI, Rondin S, Lew JY, Watson S, Zoli M, Agnati LF, Verniera P, Lluis C, Ferre S, Fuxe K, Franco R (2000) Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8606-8611.
- Girault JA, Valjent E, Caboche J, Herve D (2007) ERK2: a logical AND gate critical for drug-induced plasticity? *Curr Opin Pharmacol* 7:77-85.

- Giros B, Martres MP, Sokoloff P, Schwartz JC (1990) [Gene cloning of human dopaminergic D3 receptor and identification of its chromosome]. *C R Acad Sci III* 311:501-508.
- Giros B, Sokoloff P, Martres MP, Riou JF, Emorine LJ, Schwartz JC (1989) Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. *Nature* 342:923-926.
- Glick SD, Jerussi TP, Fleisher LN (1976) Turning in circles: the neuropharmacology of rotation. *Life Sci* 18:889-896.
- Gofflot F, Chartoire N, Vasseur L, Heikkinen S, Dembele D, Le Merrer J, Auwerx J (2007) Systematic gene expression mapping clusters nuclear receptors according to their function in the brain. *Cell* 131:405-418.
- Goldman PS, Tran VK, Goodman RH (1997) The multifunctional role of the co-activator CBP in transcriptional regulation. *Recent Prog Horm Res* 52:103-119; discussion 119-120.
- Gorelova NA, Yang CR (2000) Dopamine D1/D5 receptor activation modulates a persistent sodium current in rat prefrontal cortical neurons in vitro. *J Neurophysiol* 84:75-87.
- Grandy DK, Marchionni MA, Makam H, Stofko RE, Alfano M, Frothingham L, Fischer JB, Burke-Howie KJ, Bunzow JR, Server AC, et al. (1989) Cloning of the cDNA and gene for a human D2 dopamine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9762-9766.
- Grandy DK, Zhang YA, Bouvier C, Zhou QY, Johnson RA, Allen L, Buck K, Bunzow JR, Salon J, Civelli O (1991) Multiple human D5 dopamine receptor genes: a functional receptor and two pseudogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:9175-9179.
- Graybiel AM (1998) The basal ganglia and chunking of action repertoires. *Neurobiol Learn Mem* 70:119-136.
- Graybiel AM, Moratalla R, Robertson HA (1990) Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6912-6916.
- Greengard P, Allen PB, Nairn AC (1999) Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron* 23:435-447.
- Grewal SS, Horgan AM, York RD, Withers GS, Banker GA, Stork PJ (2000) Neuronal calcium activates a Rap1 and B-Raf signaling pathway via the cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 275:3722-3728.
- Guigoni C, Aubert I, Li Q, Gurevich VV, Benovic JL, Ferry S, Mach U, Stark H, Leriche L, Hakansson K, Bioulac BH, Gross CE, Sokoloff P, Fisone G, Gurevich EV, Bloch B, Bezard E (2005) Pathogenesis of levodopa-induced dyskinesia: focus on D1 and D3 dopamine receptors. *Parkinsonism Relat Disord* 11 Suppl 1:S25-29.

- Guigoni C, Doudnikoff E, Li Q, Bloch B, Bezard E (2007) Altered D(1) dopamine receptor trafficking in parkinsonian and dyskinetic non-human primates. *Neurobiol Dis* 26:452-463.
- Halazonetis TD, Georgopoulos K, Greenberg ME, Leder P (1988) c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell* 55:917-924.
- Hansson A, Serhan CN, Haeggstrom J, Ingelman-Sundberg M, Samuelsson B (1986) Activation of protein kinase C by lipoxin A and other eicosanoids. Intracellular action of oxygenation products of arachidonic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 134:1215-1222.
- Hasbi A, O'Dowd BF, George SR (2011) Dopamine D1-D2 receptor heteromer signaling pathway in the brain: emerging physiological relevance. *Molecular Brain* 4:26.
- Hatano N, Mori Y, Oh-hora M, Kosugi A, Fujikawa T, Nakai N, Niwa H, Miyazaki J, Hamaoka T, Ogata M (2003) Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development. *Genes Cells* 8:847-856.
- Hazel TG, Nathans D, Lau LF (1988) A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:8444-8448.
- Hedvat CV, Irving SG (1995) The isolation and characterization of MINOR, a novel mitogen-inducible nuclear orphan receptor. *Mol Endocrinol* 9:1692-1700.
- Henry B, Crossman AR, Brotchie JM (1999) Effect of repeated L-DOPA, bromocriptine, or lisuride administration on preproenkephalin-A and preproenkephalin-B mRNA levels in the striatum of the 6-hydroxydopamine-lesioned rat. *Exp Neurol* 155:204-220.
- Henry B, Duty S, Fox SH, Crossman AR, Brotchie JM (2003) Increased striatal preproenkephalin B expression is associated with dyskinesia in Parkinson's disease. *Exp Neurol* 183:458-468.
- Hersch SM, Ciliax BJ, Gutekunst CA, Rees HD, Heilman CJ, Yung KK, Bolam JP, Ince E, Yi H, Levey AI (1995) Electron microscopic analysis of D1 and D2 dopamine receptor proteins in the dorsal striatum and their synaptic relationships with motor corticostriatal afferents. *J Neurosci* 15:5222-5237.
- Hillion J, Canals M, Torvinen M, Casado V, Scott R, Terasmaa A, Hansson A, Watson S, Olah ME, Mallol J, Canela EI, Zoli M, Agnati LF, Ibanez CF, Lluis C, Franco R, Ferre S, Fuxe K (2002) Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *J Biol Chem* 277:18091-18097.
- Hinson RE, Poulos CX (1981) Sensitization to the behavioral effects of cocaine: modification by Pavlovian conditioning. *Pharmacol Biochem Behav* 15:559-562.

- Hoffman DC, Donovan H (1995) Catalepsy as a rodent model for detecting antipsychotic drugs with extrapyramidal side effect liability. *Psychopharmacology (Berl)* 120:128-133.
- Hokin MR, Hokin LE (1953) Enzyme secretion and the incorporation of P32 into phospholipides of pancreas slices. *J Biol Chem* 203:967-977.
- Holmes LJ, Wise RA (1985) Contralateral circling induced by tegmental morphine: anatomical localization, pharmacological specificity, and phenomenology. *Brain Res* 326:19-26.
- Hurley MJ, Jenner P (2006) What has been learnt from study of dopamine receptors in Parkinson's disease? *Pharmacol Ther* 111:715-728.
- Hyman SE (1996) Addiction to cocaine and amphetamine. *Neuron* 16:901-904.
- Hyman SE, Malenka RC (2001) Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci* 2:695-703.
- Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ (2006) Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 29:565-598.
- Impey S, McCorkle SR, Cha-Molstad H, Dwyer JM, Yochum GS, Boss JM, McWeeney S, Dunn JJ, Mandel G, Goodman RH (2004) Defining the CREB regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions. *Cell* 119:1041-1054.
- Impey S, Obrietan K, Storm DR (1999) Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity. *Neuron* 23:11-14.
- Inoue M, Kishimoto A, Takai Y, Nishizuka Y (1977) Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *J Biol Chem* 252:7610-7616.
- Ito R, Robbins TW, Everitt BJ (2004) Differential control over cocaine-seeking behavior by nucleus accumbens core and shell. *Nat Neurosci* 7:389-397.
- Jaber M, Cador M, Dumartin B, Normand E, Stinus L, Bloch B (1995) Acute and chronic amphetamine treatments differently regulate neuropeptide messenger RNA levels and Fos immunoreactivity in rat striatal neurons. *Neuroscience* 65:1041-1050.
- Jaffey P, Chan L-N L, Shao J, Schneider-Schalies J, Chan T-S (1992) Retinoic acid inhibition of serum-induced c-fos transcription in a fibrosarcoma cell line. *Cancer Research* 52:2384-2388.
- Janknecht R, Hunter T (1996) Versatile molecular glue. Transcriptional control. *Curr Biol* 6:951-954.
- Jenner P (2008) Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat Rev Neurosci* 9:665-677.

- Johansson B, Lindstrom K, Fredholm BB (1994) Differences in the regional and cellular localization of c-fos messenger RNA induced by amphetamine, cocaine and caffeine in the rat. *Neuroscience* 59:837-849.
- Jolles J, Zwiers H, Dekker A, Wirtz KW, Gispen WH (1981) Corticotropin-(1--24)-tetracosapeptide affects protein phosphorylation and polyphosphoinositide metabolism in rat brain. *Biochem J* 194:283-291.
- Jones S, Kornblum JL, Kauer JA (2000) Amphetamine blocks long-term synaptic depression in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 20:5575-5580.
- Kadkhodaei B, Ito T, Joodmardi E, Mattsson B, Rouillard C, Carta M, Muramatsu S, Sumi-Ichinose C, Nomura T, Metzger D, Chambon P, Lindqvist E, Larsson NG, Olson L, Bjorklund A, Ichinose H, Perlmann T (2009) Nurr1 is required for maintenance of maturing and adult midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* 29:15923-15932.
- Kalivas PW (1995) Interactions between dopamine and excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychostimulants. *Drug Alcohol Depend* 37:95-100.
- Kalivas PW, Stewart J (1991) Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res Brain Res Rev* 16:223-244.
- Kalivas PW, Volkow N, Seamans J (2005) Unmanageable motivation in addiction: a pathology in prefrontal-accumbens glutamate transmission. *Neuron* 45:647-650.
- Kandel ER (1976) Cellular basis of behavior: an introduction to behavior biology. In: W H Freeman & Co San Francisco, CA.
- Kandel ER (2001) The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294:1030-1038.
- Kandel ER, Pittenger C (1999) The past, the future and the biology of memory storage. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:2027-2052.
- Kane JM (1995) Tardive dyskinesia: epidemiological and clinical presentation In: *Psychopharmacology: the Fourth Generation of Progress*(Bloom FE, K. D., eds, ed), pp 1485-1495 New York: Raven.
- Kane JM, Carson WH, Saha AR, McQuade RD, Ingenito GG, Zimbroff DL, Ali MW (2002) Efficacy and safety of aripiprazole and haloperidol versus placebo in patients with schizophrenia and schizoaffective disorder. *J Clin Psychiatry* 63:763-771.
- Karin M (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 270:16483-16486.
- Katagiri Y, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ, Ozato K, Guroff G (2000) Modulation of retinoid signaling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B. *Nat Cell Biol* 2(7):435-40.

- Kawahara Y, Takai Y, Minakuchi R, Sano K, Nishizuka Y (1980) Phospholipid turnover as a possible transmembrane signal for protein phosphorylation during human platelet activation by thrombin. *Biochem Biophys Res Commun* 97:309-317.
- Kebabian JW, Calne DB (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277:93-96.
- Kelley AE, Lang CG, Gauthier AM (1988) Induction of oral stereotypy following amphetamine microinjection into a discrete subregion of the striatum. *Psychopharmacology (Berl)* 95:556-559.
- Kelly PH, Seviour PW, Iversen SD (1975) Amphetamine and apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and corpus striatum. *Brain Res* 94:507-522.
- Kelz MB, Chen J, Carlezon WA, Jr., Whisler K, Gilden L, Beckmann AM, Steffen C, Zhang YJ, Marotti L, Self DW, Tkatch T, Baranaukas G, Surmeier DJ, Neve RL, Duman RS, Picciotto MR, Nestler EJ (1999) Expression of the transcription factor deltaFosB in the brain controls sensitivity to cocaine. *Nature* 401:272-276.
- Kemp JM, Powell TP (1971) The connexions of the striatum and globus pallidus: synthesis and speculation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 262:441-457.
- Keyse SM (2000) Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol* 12:186-192.
- Kikkawa U, Kishimoto A, Nishizuka Y (1989) The protein kinase C family: heterogeneity and its implications. *Annu Rev Biochem* 58:31-44.
- Kikkawa U, Takai Y, Minakuchi R, Inohara S, Nishizuka Y (1982) Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase from rat brain. Subcellular distribution, purification, and properties. *J Biol Chem* 257:13341-13348.
- Kim DS, Palmiter RD, Cummins A, Gerfen CR (2006) Reversal of supersensitive striatal dopamine D1 receptor signaling and extracellular signal-regulated kinase activity in dopamine-deficient mice. *Neuroscience* 137:1381-1388.
- Kishimoto A, Takai Y, Mori T, Kikkawa U, Nishizuka Y (1980) Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J Biol Chem* 255:2273-2276.
- Kitai ST (1981) Anatomy and physiology of the neostriatum. *Adv Biochem Psychopharmacol* 30:1-21.
- Koide H, Ogita K, Kikkawa U, Nishizuka Y (1992) Isolation and characterization of the epsilon subspecies of protein kinase C from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1149-1153.
- Kolch W (2005) Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:827-837.

- Konradi C, Cole RL, Heckers S, Hyman SE (1994) Amphetamine regulates gene expression in rat striatum via transcription factor CREB. *J Neurosci* 14:5623-5634.
- Konradi C, Leveque JC, Hyman SE (1996) Amphetamine and dopamine-induced immediate early gene expression in striatal neurons depends on postsynaptic NMDA receptors and calcium. *J Neurosci* 16:4231-4239.
- Kornhauser JM, Greenberg ME (1997) A kinase to remember: dual roles for MAP kinase in long-term memory. *Neuron* 18:839-842.
- Kouzarides T, Ziff E (1988) The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature* 336:646-651.
- Kozak M (1980) Evaluation of the "scanning model" for initiation of protein synthesis in eucaryotes. *Cell* 22:7-8.
- Kozak M (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44:283-292.
- Kozak M (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 15:8125-8148.
- Krezel W, Dupe V, Mark M, Dierich A, Kastner P, Chambon P (1996) RXR gamma null mice are apparently normal and compound RXR alpha +/- /RXR beta - /- /RXR gamma - /- mutant mice are viable. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9010-9014.
- Krezel W, Ghyselinck N, Samad TA, Dupe V, Kastner P, Borrelli E, Chambon P (1998) Impaired locomotion and dopamine signaling in retinoid receptor mutant mice. *Science* 279:863-867.
- Krezel W, Kastner P, Chambon P (1999) Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system. *Neuroscience* 89:1291-1300.
- Kumar N, Wang H, Liu D, Collins S (2009) Liver X receptor is a regulator of orphan nuclear receptor NOR-1 gene transcription in adipocytes. *Int J Obes (Lond)* 33:519-524.
- Kuo JF, Andersson RG, Wise BC, Mackerlova L, Salomonsson I, Brackett NL, Katoh N, Shoji M, Wrenn RW (1980) Calcium-dependent protein kinase: widespread occurrence in various tissues and phyla of the animal kingdom and comparison of effects of phospholipid, calmodulin, and trifluoperazine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:7039-7043.
- Kurokawa R, DiRenzo J, Boehm M, Sugarman J, Gloss B, Rosenfeld MG, Heyman RA, Glass CK (1994) Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding. *Nature* 371:528-531.
- Labelle Y, Zucman J, Stenman G, Kindblom LG, Knight J, Turc-Carel C, Dockhorn-Dworniczak B, Mandahl N, Desmaze C, Peter M, et al. (1995) Oncogenic

- conversion of a novel orphan nuclear receptor by chromosome translocation. *Hum Mol Genet* 4:2219-2226.
- Langlois MC, Beaudry G, Zekki H, Rouillard C, Levesque D (2001) Impact of antipsychotic drug administration on the expression of nuclear receptors in the neocortex and striatum of the rat brain. *Neuroscience* 106:117-128.
- Lau LF, Nathans D (1987) Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: coordinate regulation with c-fos or c-myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:1182-1186.
- Law SW, Conneely OM, DeMayo FJ, O'Malley BW (1992) Identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1. *Mol Endocrinol* 6:2129-2135.
- Le Merrer J, Nogues X (2000) Cognitive neuropharmacology: new perspectives for the pharmacology of cognition. *Pharmacol Res* 41:503-514.
- Le Moine C, Normand E, Guitteny AF, Fouque B, Teoule R, Bloch B (1990) Dopamine receptor gene expression by enkephalin neurons in rat forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:230-234.
- Le W, Conneely OM, Zou L, He Y, Saucedo-Cardenas O, Jankovic J, Mosier DR, Appel SH (1999) Selective agenesis of mesencephalic dopaminergic neurons in Nurr1-deficient mice. *Exp Neurol* 159:451-458.
- Lee FJ, Xue S, Pei L, Vukusic B, Chery N, Wang Y, Wang YT, Niznik HB, Yu XM, Liu F (2002) Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell* 111:219-230.
- Lee SL, Wesselschmidt RL, Linette GP, Kanagawa O, Russell JH, Milbrandt J (1995) Unimpaired thymic and peripheral T cell death in mice lacking the nuclear receptor NGFI-B (Nur77). *Science* 269:532-535.
- Levesque D, Rouillard C (2007) Nur77 and retinoid X receptors: crucial factors in dopamine-related neuroadaptation. *Trends Neurosci* 30:22-30.
- Li SJ, Sivam SP, McGinty JF, Jiang HK, Douglass J, Calavetta L, Hong JS (1988) Regulation of the metabolism of striatal dynorphin by the dopaminergic system. *J Pharmacol Exp Ther* 246:403-408.
- Li W, Cui Y, Kushner SA, Brown RA, Jentsch JD, Frankland PW, Cannon TD, Silva AJ (2005) The HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin reverses the learning and attention deficits in a mouse model of neurofibromatosis type 1. *Curr Biol* 15:1961-1967.
- Li Y, Kauer JA (2004) Repeated exposure to amphetamine disrupts dopaminergic modulation of excitatory synaptic plasticity and neurotransmission in nucleus accumbens. *Synapse* 51:1-10.

- Liang NY, Rutledge CO (1982) Comparison of the release of [3H]dopamine from isolated corpus striatum by amphetamine, fenfluramine and unlabelled dopamine. *Biochem Pharmacol* 31:983-992.
- Lidsky TI, Yablonsky-Alter E, Zuck LG, Banerjee SP (1997) Antipsychotic drug effects on glutamatergic activity. *Brain Res* 764:46-52.
- Lieberman JA, Stroup TS, McEvoy JP, Swartz MS, Rosenheck RA, Perkins DO, Keefe RS, Davis SM, Davis CE, Lebowitz BD, Severe J, Hsiao JK (2005) Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N Engl J Med* 353:1209-1223.
- Lindenmayer JP, Nathan AM, Smith RC (2001) Hyperglycemia associated with the use of atypical antipsychotics. *J Clin Psychiatry* 62 Suppl 23:30-38.
- Liu F, Wan Q, Pristupa ZB, Yu XM, Wang YT, Niznik HB (2000) Direct protein-protein coupling enables cross-talk between dopamine D5 and gamma-aminobutyric acid A receptors. *Nature* 403:274-280.
- Liu JJ, Zeng HN, Zhang LR, Zhan YY, Chen Y, Wang Y, Wang J, Xiang SH, Liu WJ, Wang WJ, Chen HZ, Shen YM, Su WJ, Huang PQ, Zhang HK, Wu Q (2010) A unique pharmacophore for activation of the nuclear orphan receptor Nur77 in vivo and in vitro. *Cancer Res* 70:3628-3637.
- Liu JP (1996) Protein kinase C and its substrates. *Mol Cell Endocrinol* 116:1-29.
- Lu XY, Ghasemzadeh MB, Kalivas PW (1998) Expression of D1 receptor, D2 receptor, substance P and enkephalin messenger RNAs in the neurons projecting from the nucleus accumbens. *Neuroscience* 82:767-780.
- Maden M (2002) Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat Rev Neurosci* 3:843-853.
- Mages HW, Rilke O, Bravo R, Senger G, Kroczeck RA (1994) NOT, a human immediate-early response gene closely related to the steroid/thyroid hormone receptor NAK1/TR3. *Mol Endocrinol* 8:1583-1591.
- Maheux J, Ethier I, Rouillard C, Levesque D (2005) Induction patterns of transcription factors of the nur family (nurr1, nur77, and nor-1) by typical and atypical antipsychotics in the mouse brain: implication for their mechanism of action. *J Pharmacol Exp Ther* 313:460-473.
- Maheux J, Vuillier L, Mahfouz M, Rouillard C, Levesque D (2012) Modulation of haloperidol-induced patterns of the transcription factor Nur77 and Nor-1 expression by serotonergic and adrenergic drugs in the mouse brain. *Int J Neuropsychopharmacol* 15:509-521.
- Mahmoudi S, Samadi P, Gilbert F, Ouattara B, Morissette M, Gregoire L, Rouillard C, Di Paolo T, Levesque D (2009) Nur77 mRNA levels and L-Dopa-induced dyskinesias in MPTP monkeys treated with docosahexaenoic acid. *Neurobiol Dis* 36:213-222.

- Malkani S, Rosen JB (2000) Induction of NGFI-B mRNA following contextual fear conditioning and its blockade by diazepam. *Brain Res Mol Brain Res* 80:153-165.
- Mansuy IM, Shenolikar S (2006) Protein serine/threonine phosphatases in neuronal plasticity and disorders of learning and memory. *Trends Neurosci* 29:679-686.
- Marsden CD, Parkes JD (1977) Success and problems of long-term levodopa therapy in Parkinson's disease. *Lancet* 1:345-349.
- Marsden CD, Parkes, J. D. & Quinn, N. (1982) *Movement Disorders.* (Marsden, C. D. F., S., ed), pp 96-122 Butterworth London.
- Maruyama K, Tsukada T, Ohkura N, Bandoh S, Hosono T, Yamaguchi K (1998) The NGFI-B subfamily of the nuclear receptor superfamily (review). *Int J Oncol* 12:1237-1243.
- Mattson BJ, Bossert JM, Simmons DE, Nozaki N, Nagarkar D, Kreuter JD, Hope BT (2005) Cocaine-induced CREB phosphorylation in nucleus accumbens of cocaine-sensitized rats is enabled by enhanced activation of extracellular signal-related kinase, but not protein kinase A. *J Neurochem* 95:1481-1494.
- Maxwell MA, Muscat GE (2006) The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles. *Nucl Recept Signal* 4:e002.
- Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Ciamei A, Fasano S, Pakhotin P, Krezel W, Welzl H, Wolfer DP, Pages G, Valverde O, Marowsky A, Porrazzo A, Orban PC, Maldonado R, Ehrenguber MU, Cestari V, Lipp HP, Chapman PF, Pouyssegur J, Brambilla R (2002) Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron* 34:807-820.
- Melkersson KI, Hulting AL, Brismar KE (2000) Elevated levels of insulin, leptin, and blood lipids in olanzapine-treated patients with schizophrenia or related psychoses. *J Clin Psychiatry* 61:742-749.
- Meyer JM (2001) Novel antipsychotics and severe hyperlipidemia. *J Clin Psychopharmacol* 21:369-374.
- Michell RH (1975) Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim Biophys Acta* 415:81-47.
- Milbrandt J (1988) Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. *Neuron* 1:183-188.
- Minakuchi R, Takai Y, Yu B, Nishizuka Y (1981) Widespread occurrence of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase in mammalian tissues. *J Biochem* 89:1651-1654.

- Minty A, Kedes L (1986) Upstream regions of the human cardiac actin gene that modulate its transcription in muscle cells: presence of an evolutionarily conserved repeated motif. *Mol Cell Biol* 6:2125-2136.
- Misrahi M, Atger M, d'Auriol L, Loosfelt H, Meriel C, Fridlansky F, Guiochon-Mantel A, Galibert F, Milgrom E (1987) Complete amino acid sequence of the human progesterone receptor deduced from cloned cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 143:740-748.
- Miyamoto S, Duncan GE, Marx CE, Lieberman JA (2005) Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Mol Psychiatry* 10:79-104.
- Mogenson GJ, Jones DL, Yim CY (1980) From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol* 14:69-97.
- Monsma FJ, Jr., Mahan LC, McVittie LD, Gerfen CR, Sibley DR (1990) Molecular cloning and expression of a D1 dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6723-6727.
- Monsma FJ, Jr., McVittie LD, Gerfen CR, Mahan LC, Sibley DR (1989) Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature* 342:926-929.
- Moratalla R, Robertson HA, Graybiel AM (1992) Dynamic regulation of NGFI-A (zif268, egr1) gene expression in the striatum. *J Neurosci* 12:2609-2622.
- Moratalla R, Xu M, Tonegawa S, Graybiel AM (1996) Cellular responses to psychomotor stimulant and neuroleptic drugs are abnormal in mice lacking the D1 dopamine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14928-14933.
- Morozov A, Muzzio IA, Bourtchouladze R, Van-Strien N, Lapidus K, Yin D, Winder DG, Adams JP, Sweatt JD, Kandel ER (2003) Rap1 couples cAMP signaling to a distinct pool of p42/44MAPK regulating excitability, synaptic plasticity, learning, and memory. *Neuron* 39:309-325.
- Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319:774-776.
- Mount SM (1982) A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res* 10:459-472.
- Nakabeppu Y, Ryder K, Nathans D (1988) DNA binding activities of three murine Jun proteins: stimulation by Fos. *Cell* 55:907-915.
- Nakai A, Kartha S, Sakurai A, Toback FG, DeGroot LJ (1990) A human early response gene homologous to murine nur77 and rat NGFI-B, and related to the nuclear receptor superfamily. *Mol Endocrinol* 4:1438-1443.

- Napolitano M, Picconi B, Centonze D, Bernardi G, Calabresi P, Gulino A (2006) L-DOPA treatment of parkinsonian rats changes the expression of Src, Lyn and PKC kinases. *Neurosci Lett* 398:211-214.
- Narita M, Akai H, Nagumo Y, Sunagawa N, Hasebe K, Nagase H, Kita T, Hara C, Suzuki T (2004) Implications of protein kinase C in the nucleus accumbens in the development of sensitization to methamphetamine in rats. *Neuroscience* 127:941-948.
- Nekrasova T, Shive C, Gao Y, Kawamura K, Guardia R, Landreth G, Forsthuber TG (2005) ERK1-deficient mice show normal T cell effector function and are highly susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 175:2374-2380.
- Nestler EJ (2001a) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* 2:119-128.
- Nestler EJ (2001b) Molecular neurobiology of addiction. *Am J Addict* 10:201-217.
- Nguyen PV, Abel T, Kandel ER (1994) Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science* 265:1104-1107.
- Nguyen T, Bard J, Jin H, Taruscio D, Ward DC, Kennedy JL, Weinshank R, Seeman P, O'Dowd BF (1991a) Human dopamine D5 receptor pseudogenes. *Gene* 109:211-218.
- Nguyen T, Sunahara R, Marchese A, Van Tol HH, Seeman P, O'Dowd BF (1991b) Transcription of a human dopamine D5 pseudogene. *Biochem Biophys Res Commun* 181:16-21.
- Nguyen TV, Kosofsky BE, Birnbaum R, Cohen BM, Hyman SE (1992) Differential expression of c-fos and zif268 in rat striatum after haloperidol, clozapine, and amphetamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4270-4274.
- Nishimoto S, Nishida E (2006) MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. *EMBO Rep* 7:782-786.
- Nishizuka Y (1986) Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233:305-312.
- Nishizuka Y (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334:661-665.
- Nishizuka Y (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* 9:484-496.
- Norman C, Runswick M, Pollock R, Treisman R (1988) Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell* 55:989-1003.
- Novak G, Gallo A, Zai CC, Meltzer HY, Lieberman JA, Potkin SG, Voineskos AN, Remington G, Kennedy JL, Levesque D, Le Foll B (2010) Association of the

- orphan nuclear receptor NR4A1 with tardive dyskinesia. *Psychiatr Genet* 20:39-43.
- Ogita K, Miyamoto S, Yamaguchi K, Koide H, Fujisawa N, Kikkawa U, Sahara S, Fukami Y, Nishizuka Y (1992) Isolation and characterization of delta-subspecies of protein kinase C from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1592-1596.
- Oh JD, Geller AI, Zhang G, Chase TN (2003) Gene transfer of constitutively active protein kinase C into striatal neurons accelerates onset of levodopa-induced motor response alterations in parkinsonian rats. *Brain Res* 971:18-30.
- Ohara K, Haga K, Berstein G, Haga T, Ichiyama A (1988) The interaction between D-2 dopamine receptors and GTP-binding proteins. *Mol Pharmacol* 33:290-296.
- Ohkura N, Hijikuro M, Yamamoto A, Miki K (1994) Molecular cloning of a novel thyroid/steroid receptor superfamily gene from cultured rat neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 205:1959-1965.
- Ohkura N, Hosono T, Maruyama K, Tsukada T, Yamaguchi K (1999) An isoform of Nurr1 functions as a negative inhibitor of the NGFI-B family signaling. *Biochim Biophys Acta* 1444:69-79.
- Ohkura N, Ito M, Tsukada T, Sasaki K, Yamaguchi K, Miki K (1996) Structure, mapping and expression of a human NOR-1 gene, the third member of the Nur77/NGFI-B family. *Biochim Biophys Acta* 1308:205-214.
- Ohkura N, Ito M, Tsukada T, Sasaki K, Yamaguchi K, Miki K (1998) Alternative splicing generates isoforms of human neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) mRNA. *Gene* 211:79-85.
- Ohno Y, Okano M, Imaki J, Tatara A, Okumura T, Shimizu S (2010) Atypical antipsychotic properties of blonanserin, a novel dopamine D2 and 5-HT2A antagonist. *Pharmacol Biochem Behav.* 96(2):175-80.
- Okabe T, Takayanagi R, Imasaki K, Haji M, Nawata H, Watanabe T (1995) cDNA cloning of a NGFI-B/nur77-related transcription factor from an apoptotic human T cell line. *J Immunol* 154:3871-3879.
- Olive MF, Newton PM (2010) Protein kinase C isozymes as regulators of sensitivity to and self-administration of drugs of abuse-studies with genetically modified mice. *Behav Pharmacol* 21:493-499.
- Ono Y, Kikkawa U, Ogita K, Fujii T, Kurokawa T, Asaoka Y, Sekiguchi K, Ase K, Igarashi K, Nishizuka Y (1987) Expression and properties of two types of protein kinase C: alternative splicing from a single gene. *Science* 236:1116-1120.
- Ono Y, Kurokawa T, Fujii T, Kawahara K, Igarashi K, Kikkawa U, Ogita K, Nishizuka Y (1986) Two types of complementary DNAs of rat brain protein kinase C. Heterogeneity determined by alternative splicing. *FEBS Lett* 206:347-352.

- Orban PC, Chapman PF, Brambilla R (1999) Is the Ras-MAPK signalling pathway necessary for long-term memory formation? *Trends Neurosci* 22:38-44.
- Ortiz J, Harris HW, Guitart X, Terwilliger RZ, Haycock JW, Nestler EJ (1995) Extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs) and ERK kinase (MEK) in brain: regional distribution and regulation by chronic morphine. *J Neurosci* 15:1285-1297.
- Owens DG, Johnstone EC, Frith CD (1982) Spontaneous involuntary disorders of movement: their prevalence, severity, and distribution in chronic schizophrenics with and without treatment with neuroleptics. *Arch Gen Psychiatry* 39:452-461.
- Packard MG, Cahill L, McGaugh JL (1994) Amygdala modulation of hippocampal-dependent and caudate nucleus-dependent memory processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8477-8481.
- Packard MG, Knowlton BJ (2002) Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annu Rev Neurosci* 25:563-593.
- Pages G, Guerin S, Grall D, Bonino F, Smith A, Anjuere F, Auburger P, Pouyssegur J (1999) Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* 286:1374-1377.
- Parkinson J (1817) *An Essay on the Shaking Palsy*. (Jones, N., ed) London: Sherwood.
- Pascale A, Govoni S, Battaini F (1998) Age-related alteration of PKC, a key enzyme in memory processes: physiological and pathological examples. *Mol Neurobiol* 16:49-62.
- Paulson PE, Camp DM, Robinson TE (1991) Time course of transient behavioral depression and persistent behavioral sensitization in relation to regional brain monoamine concentrations during amphetamine withdrawal in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 103:480-492.
- Pena de Ortiz S, Jamieson GA, Jr. (1996) HZF-3, an immediate-early orphan receptor homologous to NURR1/NOT: induction upon membrane depolarization and seizures. *Brain Res Mol Brain Res* 38:1-13.
- Pena de Ortiz S, Maldonado-Vlaar CS, Carrasquillo Y (2000) Hippocampal expression of the orphan nuclear receptor gene hzf-3/nurr1 during spatial discrimination learning. *Neurobiol Learn Mem* 74:161-178.
- Pereira A, Fink G, Sundram S (2009) Clozapine-induced ERK1 and ERK2 signaling in prefrontal cortex is mediated by the EGF receptor. *J Mol Neurosci* 39:185-198.
- Perlmann T, Jansson L (1995) A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev* 9:769-782.
- Perreault ML, Hasbi A, Alijaniam M, O'Dowd BF, George SR (2010) Dopamine D1 and D2 receptor coexpression in medium spiny neurons: potential role for the dopamine

- D1-D2 receptor heterodimer in schizophrenia. Centre for Addiction and Mental Health University of Toronto.
- Persico AM, Schindler CW, O'Hara BF, Brannock MT, Uhl GR (1993) Brain transcription factor expression: effects of acute and chronic amphetamine and injection stress. *Brain Res Mol Brain Res* 20:91-100.
- Petropoulos I, Part D, Ochoa A, Zakin MM, Lamas E (1995) NOR-2 (neuron-derived orphan receptor), a brain zinc finger protein, is highly induced during liver regeneration. *FEBS Lett* 372:273-278.
- Picconi B, Centonze D, Hakansson K, Bernardi G, Greengard P, Fisone G, Cenci MA, Calabresi P (2003) Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat Neurosci* 6:501-506.
- Picconi B, Paille V, Ghiglieri V, Bagetta V, Barone I, Lindgren HS, Bernardi G, Angela Cenci M, Calabresi P (2008) l-DOPA dosage is critically involved in dyskinesia via loss of synaptic depotentiation. *Neurobiol Dis* 29:327-335.
- Picconi B, Pisani A, Barone I, Bonsi P, Centonze D, Bernardi G, Calabresi P (2005) Pathological synaptic plasticity in the striatum: implications for Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 26:779-783.
- Pijnenburg AJ, Honig WM, Van der Heyden JA, Van Rossum JM (1976) Effects of chemical stimulation of the mesolimbic dopamine system upon locomotor activity. *Eur J Pharmacol* 35:45-58.
- Pilla M, Perachon S, Sautel F, Garrido F, Mann A, Wermuth CG, Schwartz JC, Everitt BJ, Sokoloff P (1999) Selective inhibition of cocaine-seeking behaviour by a partial dopamine D3 receptor agonist. *Nature* 400:371-375.
- Ponnio T, Burton Q, Pereira FA, Wu DK, Conneely OM (2002) The nuclear receptor Nor-1 is essential for proliferation of the semicircular canals of the mouse inner ear. *Mol Cell Biol* 22:935-945.
- Ponnio T, Conneely OM (2004) nor-1 regulates hippocampal axon guidance, pyramidal cell survival, and seizure susceptibility. *Mol Cell Biol* 24:9070-9078.
- Pontieri FE, Tanda G, Di Chiara G (1995) Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:12304-12308.
- Powell CM, Johnston D, Sweatt JD (1994) Autonomously active protein kinase C in the maintenance phase of N-methyl-D-aspartate receptor-independent long term potentiation. *J Biol Chem* 269:27958-27963.
- Quinn N (1995) Drug treatment of Parkinson's disease. *BMJ* 310:575-579.

- Randrup A, Munkvad I (1965) Special antagonism of amphetamine-induced abnormal behaviour. Inhibition of stereotyped activity with increase of some normal activities. *Psychopharmacologia* 7:416-422.
- Rascol O, Brooks DJ, Korczyn AD, De Deyn PP, Clarke CE, Lang AE (2000) A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. 056 Study Group. *N Engl J Med* 342:1484-1491.
- Rauscher FJ, 3rd, Voulalas PJ, Franza BR, Jr., Curran T (1988) Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro. *Genes Dev* 2:1687-1699.
- Rebec GV, Bashore TR (1984) Critical issues in assessing the behavioral effects of amphetamine. *Neurosci Biobehav Rev* 8:153-159.
- Reynolds GP (1997) What is an atypical antipsychotic? *J Psychopharmacol* 11:195-199.
- Reynolds GP (2004) Receptor mechanisms in the treatment of schizophrenia. *J Psychopharmacol* 18:340-345.
- Rius J, Martinez-Gonzalez J, Crespo J, Badimon L (2004) Involvement of neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) in LDL-induced mitogenic stimulus in vascular smooth muscle cells: role of CREB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:697-702.
- Rivera VM, Miranti CK, Misra RP, Ginty DD, Chen RH, Blenis J, Greenberg ME (1993) A growth factor-induced kinase phosphorylates the serum response factor at a site that regulates its DNA-binding activity. *Mol Cell Biol* 13:6260-6273.
- Robertson GS, Matsumura H, Fibiger HC (1994) Induction patterns of Fos-like immunoreactivity in the forebrain as predictors of atypical antipsychotic activity. *J Pharmacol Exp Ther* 271:1058-1066.
- Robinson TE, Becker JB (1986) Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res* 396:157-198.
- Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Patel SC, Patel RC, Patel YC (2000) Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science* 288:154-157.
- Rogers S, Wells R, Rechsteiner M (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234:364-368.
- Rose-John S, Dietrich A, Marks F (1988) Molecular cloning of mouse protein kinase C (PKC) cDNA from Swiss 3T3 fibroblasts. *Gene* 74:465-471.
- Rouge-Pont F, Usiello A, Benoit-Marand M, Gonon F, Piazza PV, Borrelli E (2002) Changes in extracellular dopamine induced by morphine and cocaine: crucial control by D2 receptors. *J Neurosci* 22:3293-3301.

- Ruskin DN, Marshall JF (1994) Amphetamine- and cocaine-induced fos in the rat striatum depends on D2 dopamine receptor activation. *Synapse* 18:233-240.
- Ryseck RP, Macdonald-Bravo H, Mattei MG, Ruppert S, Bravo R (1989) Structure, mapping and expression of a growth factor inducible gene encoding a putative nuclear hormonal binding receptor. *EMBO J* 8:3327-3335.
- Saal D, Dong Y, Bonci A, Malenka RC (2003) Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. *Neuron* 37:577-582.
- Saba-El-Leil MK, Vella FD, Vernay B, Voisin L, Chen L, Labrecque N, Ang SL, Meloche S (2003) An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development. *EMBO Rep* 4:964-968.
- Sacchetti P, Dwornik H, Formstecher P, Rachez C, Lefebvre P (2002) Requirements for heterodimerization between the orphan nuclear receptor Nurr1 and retinoid X receptors. *J Biol Chem* 277:35088-35096.
- Sachdev PS (2000) The current status of tardive dyskinesia. *Aust N Z J Psychiatry* 34:355-369.
- Saga Y, Kobayashi M, Ohta H, Murai N, Nakai N, Oshima M, Taketo MM (1999) Impaired extrapyramidal function caused by the targeted disruption of retinoid X receptor RXRgamma1 isoform. *Genes Cells* 4:219-228.
- Sakurada K, Ohshima-Sakurada M, Palmer TD, Gage FH (1999) Nurr1, an orphan nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosine hydroxylase in neural progenitor cells derived from the adult brain. *Development* 126:4017-4026.
- Salzmann J, Marie-Claire C, Le Guen S, Roques BP, Noble F (2003) Importance of ERK activation in behavioral and biochemical effects induced by MDMA in mice. *Br J Pharmacol* 140:831-838.
- Samadi P, Bedard PJ, Rouillard C (2006a) Opioids and motor complications in Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci* 27:512-517.
- Samadi P, Gregoire L, Rouillard C, Bedard PJ, Di Paolo T, Levesque D (2006b) Docosahexaenoic acid reduces levodopa-induced dyskinesias in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine monkeys. *Ann Neurol* 59:282-288.
- Sano K, Takai Y, Yamanishi J, Nishizuka Y (1983) A role of calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase in human platelet activation. Comparison of thrombin and collagen actions. *J Biol Chem* 258:2010-2013.
- Santini E, Alcacer C, Cacciatore S, Heiman M, Herve D, Greengard P, Girault JA, Valjent E, Fisone G (2009) L-DOPA activates ERK signaling and phosphorylates histone H3 in the striatonigral medium spiny neurons of hemiparkinsonian mice. *J Neurochem* 108:621-633.

- Santini E, Valjent E, Fisone G (2008) Parkinson's disease: levodopa-induced dyskinesia and signal transduction. *FEBS J* 275:1392-1399.
- Santini E, Valjent E, Usiello A, Carta M, Borgkvist A, Girault JA, Herve D, Greengard P, Fisone G (2007) Critical involvement of cAMP/DARPP-32 and extracellular signal-regulated protein kinase signaling in L-DOPA-induced dyskinesia. *J Neurosci* 27:6995-7005.
- Sassone-Corsi P, Ransone LJ, Lamph WW, Verma IM (1988) Direct interaction between fos and jun nuclear oncoproteins: role of the 'leucine zipper' domain. *Nature* 336:692-695.
- Saucedo-Cardenas O, Kardon R, Ediger TR, Lydon JP, Conneely OM (1997) Cloning and structural organization of the gene encoding the murine nuclear receptor transcription factor, NURR1. *Gene* 187:135-139.
- Saucedo-Cardenas O, Quintana-Hau JD, Le WD, Smidt MP, Cox JJ, De Mayo F, Burbach JP, Conneely OM (1998) Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4013-4018.
- Scarselli M, Novi F, Schallmach E, Lin R, Baragli A, Colzi A, Griffon N, Corsini GU, Sokoloff P, Levenson R, Vogel Z, Maggio R (2001) D2/D3 dopamine receptor heterodimers exhibit unique functional properties. *J Biol Chem* 276:30308-30314.
- Scearce LM, Laz TM, Hazel TG, Lau LF, Taub R (1993) RNR-1, a nuclear receptor in the NGFI-B/Nur77 family that is rapidly induced in regenerating liver. *J Biol Chem* 268:8855-8861.
- Schmitt JM, Stork PJ (2000) beta 2-adrenergic receptor activates extracellular signal-regulated kinases (ERKs) via the small G protein rap1 and the serine/threonine kinase B-Raf. *J Biol Chem* 275:25342-25350.
- Schmitz Y, Schmauss C, Sulzer D (2002) Altered dopamine release and uptake kinetics in mice lacking D2 receptors. *J Neurosci* 22:8002-8009.
- Schuster S, Nadjar A, Guo JT, Li Q, Ittrich C, Hengerer B, Bezard E (2008) The 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor lovastatin reduces severity of L-DOPA-induced abnormal involuntary movements in experimental Parkinson's disease. *J Neurosci* 28:4311-4316.
- Seeman P, Van Tol HH (1994) Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 15:264-270.
- Seiden LS, Sabol KE, Ricaurte GA (1993) Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33:639-677.
- Selcher JC, Weeber EJ, Varga AW, Sweatt JD, Swank M (2002) Protein kinase signal transduction cascades in mammalian associative conditioning. *Neuroscientist* 8:122-131.

- Senogles SE, Benovic JL, Amlaiky N, Unson C, Milligan G, Vinitzky R, Spiegel AM, Caron MG (1987) The D2-dopamine receptor of anterior pituitary is functionally associated with a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide binding protein. *J Biol Chem* 262:4860-4867.
- Sernyak MJ, Leslie DL, Alarcon RD, Losonczy MF, Rosenheck R (2002) Association of diabetes mellitus with use of atypical neuroleptics in the treatment of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 159:561-566.
- Sgambato V, Pages C, Rogard M, Besson MJ, Caboche J (1998) Extracellular signal-regulated kinase (ERK) controls immediate early gene induction on corticostriatal stimulation. *J Neurosci* 18:8814-8825.
- Shalizi A, Gaudilliere B, Yuan Z, Stegmuller J, Shirogane T, Ge Q, Tan Y, Schulman B, Harper JW, Bonni A (2006) A calcium-regulated MEF2 sumoylation switch controls postsynaptic differentiation. *Science* 311:1012-1017.
- Shaw G, Kamen R (1986) A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46:659-667.
- Shen W, Flajolet M, Greengard P, Surmeier DJ (2008) Dichotomous dopaminergic control of striatal synaptic plasticity. *Science* 321:848-851.
- Sheng M, Dougan ST, McFadden G, Greenberg ME (1988) Calcium and growth factor pathways of c-fos transcriptional activation require distinct upstream regulatory sequences. *Mol Cell Biol* 8:2787-2796.
- Shepherd JD, Rumbaugh G, Wu J, Chowdhury S, Plath N, Kuhl D, Haganir RL, Worley PF (2006) Arc/Arg3.1 mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors. *Neuron* 52:475-484.
- Shi X, McGinty JF (2006) Extracellular signal-regulated mitogen-activated protein kinase inhibitors decrease amphetamine-induced behavior and neuropeptide gene expression in the striatum. *Neuroscience* 138:1289-1298.
- Shi X, McGinty JF (2007) Repeated amphetamine treatment increases phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase, protein kinase B, and cyclase response element-binding protein in the rat striatum. *J Neurochem* 103:706-713.
- Sibley DR, Monsma FJ, Jr., Shen Y (1993) Molecular neurobiology of dopaminergic receptors. *Int Rev Neurobiol* 35:391-415.
- Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S (1998) CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 21:127-148.
- Simonson MS (1994) Anti-AP-1 activity of all-trans retinoic acid in glomerular mesangial cells. *267(5Pt2):F805-15*.
- Simpson CS, Morris BJ (1995) Induction of c-fos and zif/268 gene expression in rat striatal neurons, following stimulation of D1-like dopamine receptors, involves protein kinase A and protein kinase C. *Neuroscience* 68:97-106.

- Smith Y, Bennett BD, Bolam JP, Parent A, Sadikot AF (1994) Synaptic relationships between dopaminergic afferents and cortical or thalamic input in the sensorimotor territory of the striatum in monkey. *J Comp Neurol* 344:1-19.
- Smith Y, Raju DV, Pare JF, Sidibe M (2004) The thalamostriatal system: a highly specific network of the basal ganglia circuitry. *Trends Neurosci* 27:520-527.
- Snyder SH (1973) Amphetamine psychosis: a "model" schizophrenia mediated by catecholamines. *Am J Psychiatry* 130:61-67.
- Snyder SH, Banerjee SP, Yamamura HI, Greenberg D (1974) Drugs, neurotransmitters, and schizophrenia. *Science* 184:1243-1253.
- Snyder SH, Supattapone S, Danoff S, Worley PF, Baraban JM (1988) The inositol trisphosphate receptor: a potpourri of second-messenger regulation. *Cell Mol Neurobiol* 8:1-5.
- Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML, Schwartz JC (1990) Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* 347:146-151.
- Sokoloff P, Martres MP, Giros B, Bouthenet ML, Schwartz JC (1992) The third dopamine receptor (D3) as a novel target for antipsychotics. *Biochem Pharmacol* 43:659-666.
- Spano PF, Govoni S, Trabucchi M (1978) Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system. *Adv Biochem Psychopharmacol* 19:155-165.
- St-Hilaire M, Bourhis E, Levesque D, Rouillard C (2006) Impaired behavioural and molecular adaptations to dopamine denervation and repeated L-DOPA treatment in Nur77-knockout mice. *Eur J Neurosci* 24:795-805.
- St-Hilaire M, Landry E, Levesque D, Rouillard C (2003) Denervation and repeated L-DOPA induce a coordinate expression of the transcription factor NGFI-B in striatal projection pathways in hemi-parkinsonian rats. *Neurobiol Dis* 14:98-109.
- St-Hilaire M, Landry E, Levesque D, Rouillard C (2005) Denervation and repeated L-DOPA induce complex regulatory changes in neurochemical phenotypes of striatal neurons: implication of a dopamine D1-dependent mechanism. *Neurobiol Dis* 20:450-460.
- Stoessl AJ, Polanski E, Frydryszak H (1993) The opiate antagonist naloxone suppresses a rodent model of tardive dyskinesia. *Mov Disord* 8:445-452.
- Stoof JC, Kebabian JW (1981) Opposing roles for D-1 and D-2 dopamine receptors in efflux of cyclic AMP from rat neostriatum. *Nature* 294:366-368.
- Strader CD, Sigal IS, Dixon RA (1989) Structural basis of beta-adrenergic receptor function. *FASEB J* 3:1825-1832.

- Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, Schulz I (1983) Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* 306:67-69.
- Sunahara RK, Guan HC, O'Dowd BF, Seeman P, Laurier LG, Ng G, George SR, Torchia J, Van Tol HH, Niznik HB (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature* 350:614-619.
- Sunahara RK, Niznik HB, Weiner DM, Stormann TM, Brann MR, Kennedy JL, Gelernter JE, Rozmahel R, Yang YL, Israel Y, et al. (1990) Human dopamine D1 receptor encoded by an intronless gene on chromosome 5. *Nature* 347:80-83.
- Surmeier DJ, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W (2007) D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci* 30:228-235.
- Surmeier DJ, Eberwine J, Wilson CJ, Cao Y, Stefani A, Kitai ST (1992) Dopamine receptor subtypes colocalize in rat striatonigral neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10178-10182.
- Surmeier DJ, Plotkin J, Shen W (2009) Dopamine and synaptic plasticity in dorsal striatal circuits controlling action selection. *Curr Opin Neurobiol* 19:621-628.
- Surmeier DJ, Song WJ, Yan Z (1996) Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *J Neurosci* 16:6579-6591.
- Sweatt JD (2004) Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* 14:311-317.
- Szechtman H, Ornstein K, Teitelbaum P, Golani I (1982) Snout contact fixation, climbing and gnawing during apomorphine stereotypy in rats from two substrains. *Eur J Pharmacol* 80:385-392.
- Takai Y, Kishimoto A, Inoue M, Nishizuka Y (1977) Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *J Biol Chem* 252:7603-7609.
- Takai Y, Kishimoto A, Kikkawa U, Mori T, Nishizuka Y (1979) Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. *Biochem Biophys Res Commun* 91:1218-1224.
- Takeshita A, Yasuda H, Ishida M, Ochiai K (2002) 1 α 25(OH)2D3 interferes with retinoic acid-induced inhibition of c-fos gene expression for AP-1 formation in osteoblastic cells. *J Oral Sci* 44(1): 27-34.
- Tamim MK, Samadi P, Morissette M, Gregoire L, Ouattara B, Levesque D, Rouillard C, Di Paolo T (2010) Effect of non-dopaminergic drug treatment on Levodopa induced dyskinesias in MPTP monkeys: common implication of striatal neuropeptides. *Neuropharmacology* 58:286-296.

- Tan A, Moratalla R, Lyford GL, Worley P, Graybiel AM (2000) The activity-regulated cytoskeletal-associated protein arc is expressed in different striosome-matrix patterns following exposure to amphetamine and cocaine. *J Neurochem* 74(5):2074-8.
- Tanaka C, Saito N (1992) Localization of subspecies of protein kinase C in the mammalian central nervous system. *Neurochem Int* 21:499-512.
- Thibault D, Kortleven C, Fasano C, Dal Bo G, Trudeau LE (2010) [Recent discoveries on the function and plasticity of central dopamine pathways]. *Med Sci (Paris)* 26:165-170.
- Thomas GM, Huganir RL (2004) MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5:173-183.
- Tian X, Kai L, Hockberger PE, Wokosin DL, Surmeier DJ (2010) MEF-2 regulates activity-dependent spine loss in striatopallidal medium spiny neurons. *Mol Cell Neurosci* 44:94-108.
- Treisman R (1986) Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors. *Cell* 46:567-574.
- Treisman R (1996) Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol* 8:205-215.
- Tremblay ME, Saint-Pierre M, Bourhis E, Levesque D, Rouillard C, Cicchetti F (2006) Neuroprotective effects of cystamine in aged parkinsonian mice. *Neurobiol Aging* 27:862-870.
- Trujillo KA, Day R, Akil H (1990) Regulation of striatonigral prodynorphin peptides by dopaminergic agents. *Brain Res* 518:244-256.
- Turgeon SM, Pollack AE, Schusheim L, Fink JS (1996) Effects of selective adenosine A1 and A2a agonists on amphetamine-induced locomotion and c-Fos in striatum and nucleus accumbens. *Brain Res* 707:75-80.
- Turrone P, Remington G, Norega JN (2002) The vacuous chewing movement (VCM) model of tardive dyskinesia revisited: is there a relationship to dopamine D(2) receptor occupancy? *Neurosci Biobehav Rev* 26:361-380.
- Ungerstedt U (1971a) Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand Suppl* 367:69-93.
- Ungerstedt U (1971b) Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behaviour. *Acta Physiol Scand Suppl* 367:49-68.
- Usiello A, Baik JH, Rouge-Pont F, Picetti R, Dierich A, LeMeur M, Piazza PV, Borrelli E (2000) Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature* 408:199-203.

- Uslaner J, Badiani A, Norton CS, Day HE, Watson SJ, Akil H, Robinson TE (2001) Amphetamine and cocaine induce different patterns of c-fos mRNA expression in the striatum and subthalamic nucleus depending on environmental context. *Eur J Neurosci* 13:1977-1983.
- Uslaner JM, Norton CS, Watson SJ, Akil H, Robinson TE (2003) Amphetamine-induced c-fos mRNA expression in the caudate-putamen and subthalamic nucleus: interactions between dose, environment, and neuronal phenotype. *J Neurochem* 85:105-114.
- Valjent E, Caboche J, Vanhoutte P (2001) Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase induced gene regulation in brain: a molecular substrate for learning and memory? *Mol Neurobiol* 23:83-99.
- Valjent E, Corbille AG, Bertran-Gonzalez J, Herve D, Girault JA (2006a) Inhibition of ERK pathway or protein synthesis during reexposure to drugs of abuse erases previously learned place preference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2932-2937.
- Valjent E, Corvol JC, Pages C, Besson MJ, Maldonado R, Caboche J (2000) Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. *J Neurosci* 20:8701-8709.
- Valjent E, Corvol JC, Trzaskos JM, Girault JA, Herve D (2006b) Role of the ERK pathway in psychostimulant-induced locomotor sensitization. *BMC Neurosci* 7:20.
- Valjent E, Pascoli V, Svenningsson P, Paul S, Enslen H, Corvol JC, Stipanovich A, Caboche J, Lombroso PJ, Nairn AC, Greengard P, Herve D, Girault JA (2005) Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:491-496.
- Van der Zee EA, Douma BR (1997) Historical review of research on protein kinase C in learning and memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 21:379-406.
- Van Kampen JM, Stoessl AJ (2000) Effects of oligonucleotide antisense to dopamine D(1A) receptor messenger RNA in a rodent model of levodopa-induced dyskinesia. *Neuroscience* 98:61-67.
- Van Tol HH, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB, Civelli O (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350:610-614.
- Van Tol HH, Wu CM, Guan HC, Ohara K, Bunzow JR, Civelli O, Kennedy J, Seeman P, Niznik HB, Jovanovic V (1992) Multiple dopamine D4 receptor variants in the human population. *Nature* 358:149-152.
- Vanderschuren LJ, Di Ciano P, Everitt BJ (2005) Involvement of the dorsal striatum in cue-controlled cocaine seeking. *J Neurosci* 25:8665-8670.

- Varnum BC, Lim RW, Kujubu DA, Luner SJ, Kaufman SE, Greenberger JS, Gasson JC, Herschman HR (1989) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tetradecanoyl phorbol acetate induce a distinct, restricted subset of primary-response TIS genes in both proliferating and terminally differentiated myeloid cells. *Mol Cell Biol* 9:3580-3583.
- Verhagen Metman L, Del Dotto P, van den Munckhof P, Fang J, Mouradian MM, Chase TN (1998) Amantadine as treatment for dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. *Neurology* 50:1323-1326.
- von Herten LS, Giese KP (2005) Memory reconsolidation engages only a subset of immediate-early genes induced during consolidation. *J Neurosci* 25:1935-1942.
- Voorn P, Docter GJ, Jongen-Relo AL, Jonker AJ (1994) Rostrocaudal subregional differences in the response of enkephalin, dynorphin and substance P synthesis in rat nucleus accumbens to dopamine depletion. *Eur J Neurosci* 6:486-496.
- Vossler MR, Yao H, York RD, Pan MG, Rim CS, Stork PJ (1997) cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell* 89:73-82.
- Voulalas PJ, Holtzclaw L, Wolstenholme J, Russell JT, Hyman SE (2005) Metabotropic glutamate receptors and dopamine receptors cooperate to enhance extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in striatal neurons. *J Neurosci* 25:3763-3773.
- Wang JQ, McGinty JF (1995) Alterations in striatal zif/268, preprodynorphin and preproenkephalin mRNA expression induced by repeated amphetamine administration in rats. *Brain Res* 673:262-274.
- Wang JQ, Smith AJ, McGinty JF (1995) A single injection of amphetamine or methamphetamine induces dynamic alterations in c-fos, zif/268 and preprodynorphin messenger RNA expression in rat forebrain. *Neuroscience* 68:83-95.
- Wang Z, Benoit G, Liu J, Prasad S, Aarnisalo P, Liu X, Xu H, Walker NP, Perlmann T (2003) Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* 423:555-560.
- Watson MA, Milbrandt J (1989) The NGFI-B gene, a transcriptionally inducible member of the steroid receptor gene superfamily: genomic structure and expression in rat brain after seizure induction. *Mol Cell Biol* 9:4213-4219.
- Way KJ, Chou E, King GL (2000) Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends Pharmacol Sci* 21:181-187.
- Weinshank RL, Adham N, Macchi M, Olsen MA, Branchek TA, Hartig PR (1991) Molecular cloning and characterization of a high affinity dopamine receptor (D1 beta) and its pseudogene. *J Biol Chem* 266:22427-22435.

- Werme M, Ringholm A, Olson L, Brene S (2000) Differential patterns of induction of NGFI-B, Nor1 and c-fos mRNAs in striatal subregions by haloperidol and clozapine. *Brain Res* 863:112-119.
- Westin JE, Andersson M, Lundblad M, Cenci MA (2001) Persistent changes in striatal gene expression induced by long-term L-DOPA treatment in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 14:1171-1176.
- Westin JE, Vercammen L, Strome EM, Konradi C, Cenci MA (2007) Spatiotemporal pattern of striatal ERK1/2 phosphorylation in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia and the role of dopamine D1 receptors. *Biol Psychiatry* 62:800-810.
- White FJ, Wang RY (1983) Comparison of the effects of chronic haloperidol treatment on A9 and A10 dopamine neurons in the rat. *Life Sci* 32:983-993.
- White FJ, Wang RY (1984) Electrophysiological evidence for A10 dopamine autoreceptor subsensitivity following chronic D-amphetamine treatment. *Brain Res* 309:283-292.
- Williams GT, Lau LF (1993) Activation of the inducible orphan receptor gene nur77 by serum growth factors: dissociation of immediate-early and delayed-early responses. *Mol Cell Biol* 13:6124-6136.
- Wilson TE, Fahrner TJ, Johnston M, Milbrandt J (1991) Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science* 252:1296-1300.
- Wilson TE, Paulsen RE, Padgett KA, Milbrandt J (1992) Participation of non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors. *Science* 256:107-110.
- Wise RA, Bozarth MA (1987) A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev* 94:469-492.
- Wise RA, Holmes LJ (1986) Circling from unilateral VTA morphine: direction is controlled by environmental stimuli. *Brain Res Bull* 16:267-269.
- Wise RA, Yokel RA, Hansson PA, Gerber GJ (1977) Concurrent intracranial self-stimulation and amphetamine self-administration in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 7:459-461.
- Wolf ME, Sun X, Mangiavacchi S, Chao SZ (2004) Psychomotor stimulants and neuronal plasticity. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:61-79.
- Worley PF, Baraban JM, De Souza EB, Snyder SH (1986a) Mapping second messenger systems in the brain: differential localizations of adenylate cyclase and protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4053-4057.
- Worley PF, Baraban JM, Snyder SH (1986b) Heterogeneous localization of protein kinase C in rat brain: autoradiographic analysis of phorbol ester receptor binding. *J Neurosci* 6:199-207.

- Woronicz JD, Lina A, Calnan BJ, Szychowski S, Cheng L, Winoto A (1995) Regulation of the Nur77 orphan steroid receptor in activation-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 15:6364-6376.
- Xing J, Ginty DD, Greenberg ME (1996) Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* 273:959-963.
- Xu Y, Sun S, Cao X (2003) Effect of levodopa chronic administration on behavioral changes and fos expression in basal ganglia in rat model of PD. *J Huazhong Univ. Sci. Technolog Med Sci* 23(3):258-62.
- Yamamoto KR (1985) Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu Rev Genet* 19:209-252.
- Yan Z, Feng J, Fienberg AA, Greengard P (1999) D(2) dopamine receptors induce mitogen-activated protein kinase and cAMP response element-binding protein phosphorylation in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11607-11612.
- Yanahashi S, Hashimoto K, Hattori K, Yuasa S, Iyo M (2004) Role of NMDA receptor subtypes in the induction of catalepsy and increase in Fos protein expression after administration of haloperidol. *Brain Research* 1011(1):84-93.
- Yao Y, Li W, Wu J, Germann UA, Su MS, Kuida K, Boucher DM (2003) Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12759-12764.
- Youn HD, Sun L, Prywes R, Liu JO (1999) Apoptosis of T cells mediated by Ca²⁺-induced release of the transcription factor MEF2. *Science* 286:790-793.
- Yung KK, Bolam JP, Smith AD, Hersch SM, Ciliax BJ, Levey AI (1995) Immunocytochemical localization of D1 and D2 dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: light and electron microscopy. *Neuroscience* 65:709-730.
- Zetterstrom RH, Lindqvist E, Mata de Urquiza A, Tomac A, Eriksson U, Perlmann T, Olson L (1999) Role of retinoids in the CNS: differential expression of retinoid binding proteins and receptors and evidence for presence of retinoic acid. *Eur J Neurosci* 11:407-416.
- Zetterstrom RH, Solomin L, Jansson L, Hoffer BJ, Olson L, Perlmann T (1997) Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* 276:248-250.
- Zetterstrom RH, Solomin L, Mitsiadis T, Olson L, Perlmann T (1996a) Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1. *Mol Endocrinol* 10:1656-1666.
- Zetterstrom RH, Williams R, Perlmann T, Olson L (1996b) Cellular expression of the immediate early transcription factors Nurr1 and NGFI-B suggests a gene

regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res Mol Brain Res* 41:111-120.

Zhai H, Li Y, Wang X, Lu L (2008) Drug-induced alterations in the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signalling pathway: implications for reinforcement and reinstatement. *Cell Mol Neurobiol* 28:157-172.

Zhan Y, Du X, Chen H, Liu J, Zhao B, Huang D, Li G, Xu Q, Zhang M, Weimer BC, Chen D, Cheng Z, Zhang L, Li Q, Li S, Zheng Z, Song S, Huang Y, Ye Z, Su W, Lin SC, Shen Y, Wu Q (2008) Cytosporone B is an agonist for nuclear orphan receptor Nur77. *Nat Chem Biol* 4:548-556.

Zhang L, Lou D, Jiao H, Zhang D, Wang X, Xia Y, Zhang J, Xu M (2004) Cocaine-induced intracellular signaling and gene expression are oppositely regulated by the dopamine D1 and D3 receptors. *J Neurosci* 24:3344-3354.

Zheng CF, Guan KL (1993) Cloning and characterization of two distinct human extracellular signal-regulated kinase activator kinases, MEK1 and MEK2. *J Biol Chem* 268:11435-11439.

Zhou QY, Grandy DK, Thambi L, Kushner JA, Van Tol HH, Cone R, Pribnow D, Salon J, Bunzow JR, Civelli O (1990) Cloning and expression of human and rat D1 dopamine receptors. *Nature* 347:76-80.

Annexes

Annexe 1

Apprentissage, mémoire, plasticité synaptique et Long Term Potentialisation (LTP) / Long Term Depotentialisation (LTD)

1. Apprentissage et mémorisation

Le Dr Charles R. Gerfen parle d'apprentissage anormal du mouvement dans les LIDs et suggère une forme de LTP erronée. Pour les drogues d'abus, les Drs Éric J. Nestler, Steven E. Hyman et Robert C. Malenka parlent de mémoire associative et nous citent en exemple les mécanismes de LTP/LTD. Or, selon le Dr Éric R. Kandel, un des pionniers de l'étude des mécanismes moléculaire de la mémorisation : « Learning is the acquisition of new information about the world, and memory is the retention of that information over time » (Kandel and Pittenger, 1999). Dès 1976, ses travaux, ont permis de démontrer que l'apprentissage nécessitait des changements dans la force de connections synaptiques près-existantes et que c'est la répétition du stimulus qui permet de convertir la mémoire à court terme en mémoire à long terme (Kandel, 1976) (Kandel and Pittenger, 1999) (Kandel, 2001). Le stockage de la mémoire à long terme nécessite la synthèse de nouvelles protéines (Flexner et al., 1965) (Agranoff, 1976) et la croissance de nouvelles connections synaptiques (Bailey and Kandel, 1993) (Kandel and Pittenger, 1999). Si l'on se réfère aux synapses sérotoninergiques, la sérotonine activerait les récepteurs 5-HT qui induiraient la voie de l'AMPC, la PKA et de la PKC à court terme et le transfert à long terme se fait suite à l'activation de la PKA et des MAPK kinases (NDR : les ERKs) qui en allant au noyau vont activer CREB qui lui même déclenche la transcription de tout un jeux de gènes d'induction précoce (Kandel and Pittenger, 1999) (figure n°1).

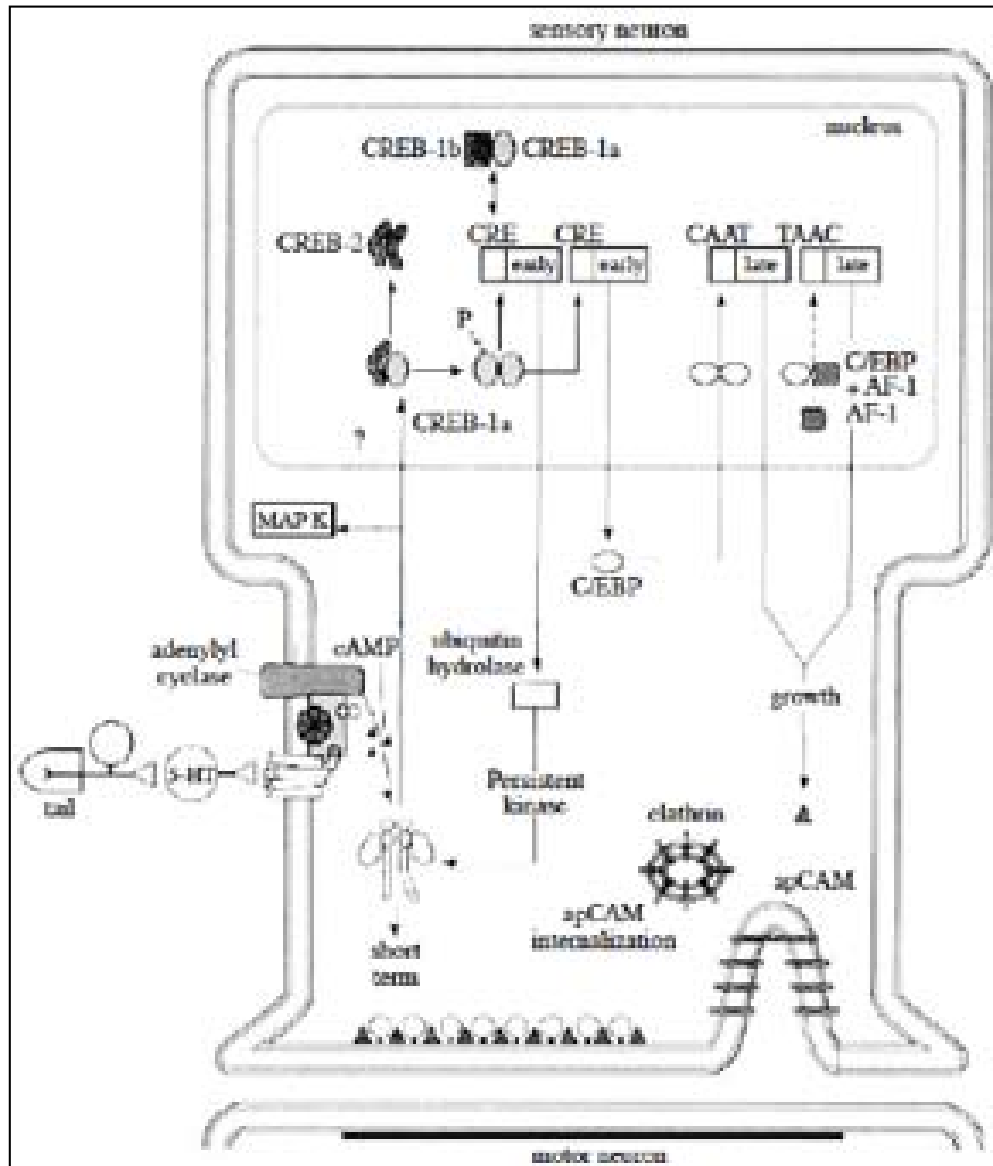


Figure n°1 : Plusieurs cascades moléculaires sont impliquées à la fois dans la facilitation à court terme et dans la facilitation à long terme aux synapses neuronales des motoneurones sensoriels chez *Aplysia* (Kandel and Pittenger, 1999).

2. Plasticité synaptique et facilitation synaptique

En fait, l'activation de CREB envoie des protéines dans toutes les terminaisons synaptiques mais seule les synapses marquées par une répétition de sérotonine peuvent utiliser ces protéines de façon productive pour de la plasticité synaptique à long terme créant de la mémoire à long terme (Casadio et al., 1999) (Kandel, 2001). De plus, cette

facilitation synaptique, engendrée par les propriétés de plasticité synaptiques des synapses à court terme ou directement pour du long terme et qui se produit dans les neurones près-synaptiques (figure n°1) trouvent un écho dans le neurone post-synaptique *via* un phénomène appelé cette fois-ci Long Term Potentialisation (Kandel, 2001).

3. Long Term Potentialisation (LTP) et Long Term Depotentialisation (LTD)

C'est en 1972 que les Drs Terje Lomo et Tim Bliss découvrent qu'une potentialisation à long terme post-synaptique (LTP) est dépendante d'une certaine forme de plasticité près-synaptique lorsqu'ils observent que le LTP induit post-synaptiquement par l'activation des récepteurs ionotropiques glutamatergiques NMDA (*les récepteurs NMDA sont des acteurs connus de la plasticité près-synaptique avec non seulement une augmentation du nombre de ces récepteurs dans la membrane près-synaptique mais aussi le type de sous-unités qui les composent*) est inhibé par le blocage pharmacologique de ces récepteurs qui non seulement interfèrent avec le LTP mais aussi bloquent le stockage de la mémoire (Bliss and Gardner-Medwin, 1973) (Morris et al., 1986). Le corolaire scientifique actuel contient beaucoup d'évidences associant le mécanisme de LTP à une augmentation persistante de la force des connections synaptiques qui est qualifiée aussi de plasticité synaptique associé au phénomène de mémorisation (Bliss and Gardner-Medwin, 1973) (Bliss and Lomo, 1973) (Atkins et al., 1998) (Orban et al., 1999) (Impey et al., 1999) (Hyman et al., 2006)...

3. 1. Long Term Potentialisation LTP

Le LTP possède plusieurs phases (Nguyen et al., 1994). Une phase précoce avec des modifications covalentes de protéines prés-existantes renforçant les conections déjà établies. Une phase tardive qui nécessite des stimulations électriques répétées, active l'AMPC, la PKA, les MAPK kinases, CREB, et est sensible aux inhibiteurs de synthèse protéique et d'ARNm et conduit à la genèse de nouvelles connections synaptiques (Kandel, 2001) (Kandel and Pittenger, 1999).

3. 2. Long Term Depotentialisation LTD

L'opposé du LTP dans le cerveau est le LTD qui se fait *via* les mêmes mécanismes réverses dans le striatum (Surmeier et al., 2009). Le LTP et le LTD peuvent se voir dans beaucoup de voies synaptiques différentes par des paradigmes d'induction et des mécanismes biochimiques différents (Powell et al., 1994).

4. Apprentissage, mémorisation, plasticité synaptique et LTP au sein du striatum

Un volet de la recherche concernant le LTP a consisté en son étude *via* son expression comportementale par le biais de tests d'apprentissage et de mémorisation. Il a ainsi pu être démontré qu'en plus de la CaMKII et de la PKC, la cascade des ERK1/2 MAPKs était critique dans ces processus d'apprentissage et de mémorisation (Kornhauser and Greenberg, 1997) (Silva et al., 1998) (Impey et al., 1999) de même que dans la plasticité synaptique (English and Sweatt, 1996) (English and Sweatt, 1997). La phosphorylation de ERK est nécessaire à l'expression et au maintien de la plasticité synaptique dans beaucoup de régions du cerveau (Sweatt, 2004) (Braithwaite et al., 2006). De plus, au sein du noyau accumbens, il a été démontré une relation quantitative entre l'activité de ERK et l'induction du LTP (Mazzucchelli et al., 2002).

Remarque : Dans le striatum dorsal, le LTP nécessite l'activation des récepteurs NMDA mais aussi celle des récepteurs dopaminergiques de type D1, et une augmentation du LTP est observée lorsque les récepteurs D2 sont inhibés (Calabresi et al., 2000a). Ceci contredit un peu le Dr Charles R. Gerfen lorsqu'il parle, suite à un marquage des ERKs, de plasticité synaptique spécifique des D2 dans le striatum qui est altérée puis « transférée » aux D1 lors de la dénervation dopaminergique dans la maladie de Parkinson (Gerfen, 2000). Cependant les dernières découvertes du Dr D. James Surmeier permettraient de réconcilier les hypothèses du Dr Charles R. Gerfen qui localise le LTP dit normal dans les neurones D2 et celles du Dr Paolo Calabresi qui indique une indispensabilité des récepteurs de type D1 dans le LTP striatal qui est NMDAR dépendant. En effet, grâce à la technique de « perforated patch recording » qui

permet de préserver la capacité du milieu intracellulaire de contrôler ses mécanismes biochimiques le Dr D James Surmeier à trouvé que l'induction du LTP aux synapses glutamatergiques était dépendante des récepteurs D1 seulement dans les neurones épineux moyens striataux nigraux (voie D1) mais pas dans les neurones striataux pallidiaux (voie D2) (Shen et al., 2008) (Flajolet, 2008) (Surmeier et al., 2009). Dans les neurones pallidiaux (voie D2) le LTP nécessiterait l'activation des récepteurs adénosine A_{2A} qui sont couplés positivement à l'adénylate cyclase et à la PKA tout comme les D1 (Surmeier et al., 2009) (figure n°2). Ainsi, la même cascade de signalisation PKA puis ERK est activée dans la voie D1 par les récepteurs D1 et dans la voie D2 par les récepteurs A_{2A} pour le même phénomène d'apprentissage c'est pour quoi, selon moi, il est facile de faire l'amalgame récepteurs D2 dans les neurones de la voie D2 qui activent la voie des ERK alors qu'il s'agit peut être du récepteur A_{2A} et qu'ainsi une non activation de ERK via les D2 ne localise pas forcément le LTP devenu subitement présent que dans les D1 tout en sachant que l'on parle toujours du même phénomène, du LTP qui est activé et présent dans ces deux populations neuronales mais dont la finalité devient pathologique selon le contexte cellulaire et environnemental (une hyper sensibilité du D1 sera toujours responsable d'une activation pathologique de ces kinases). De plus, le paradigme moléculaire du LTP/LTD tend à être recadré puisque le Dr D James Surmeier contredit aussi l'implication des récepteurs D1/D5 dans le LTD du striatum dorsal mais aussi dans le LTP (Surmeier et al., 2009)...!

5. Apprentissage, mémorisation, plasticité synaptique, LTP et les NR4As

L'hippocampe est la région du cerveau la plus étudiée pour les mécanismes de mémorisation et de LTP/LTD. Il y a été démontré que Nor-1 et Nurr1 étaient impliqués dans les processus d'apprentissage ou de mémorisation (Ponnio and Conneely, 2004) (Pena de Ortiz et al., 2000) (Colon-Cesario et al., 2006). Nur77 est induit dans l'aire CA1 des neurones de l'hippocampe pour la phase de consolidation de la mémoire (von Herten and Giese, 2005). Suite à une reproduction expérimentale de LTP en CA1 de l'hippocampe, Nur77 est surexprimé de façon significative et constante parmi 9000 gènes (French et al., 2001). De plus, en ce qui concerne l'apprentissage, l'ARNm de

Nur77 est induit dans la partie dorsale du noyau latéral de l'amygdale et dans le néocortex 30 min après le choc de peur conditionnée. 24h00 après, Nur77 est toujours sur exprimé dans le néocortex sans toute fois être induit dans l'hippocampe (Malkani and Rosen, 2000) ce qui suggère un rôle ponctuel structure spécifique ou un rôle à plus long terme pour quelques structures comme dans le cas du néocortex pour Nur77.

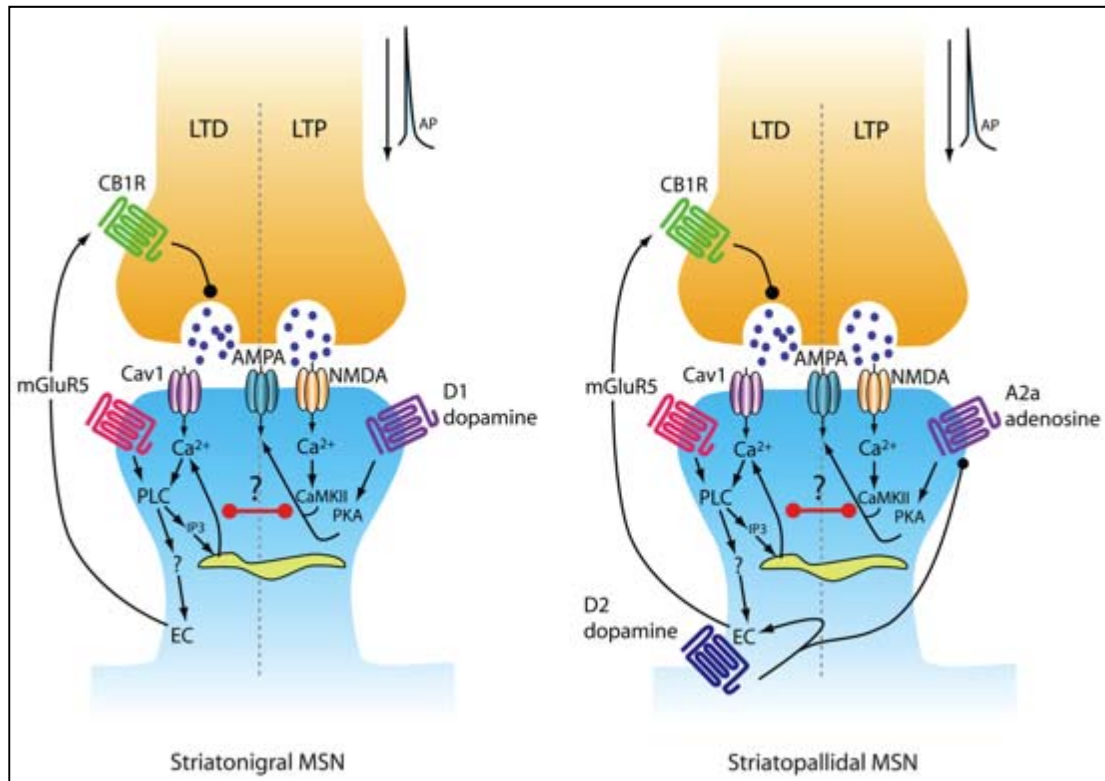


Figure n°2 : Spike-timing-dependent plasticity (STDP) représentation schématique des mécanismes d'induction de la plasticité STDP dans les neurones striataux de la voie D1 (striatonigraux) et de la voie D2 (striatopallidaux). Les terminaisons pré-synaptiques glutamatergiques sont représentées en orange et les épines post-synaptiques en bleu. Les flèches noires représentent une régulation positive et les cercles noirs une régulation négative. Les cercles mauves dans la fente synaptique corticostriatale représentent le glutamate (Surmeier et al., 2009).

Annexe 2

RESEARCH HIGHLIGHTS NATURE

www.nature.com/clinicalpractice/neuro

SEPTEMBER 2006 VOL 2 NO 9 NATURE CLINICAL PRACTICE NEUROLOGY 467

Cystamine is neuroprotective in Huntington's and Parkinson's diseases. Cystamine, a transglutaminase inhibitor, has been demonstrated in two separate studies to have neuroprotective effects in Huntington's disease (HD) and Parkinson's disease. In the first study cysteamine, a reduced form of cystamine, increased levels of the neuronal survival factor brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the brains of HD mice to produce a neuroprotective effect, and also increased serum levels of BDNF in mouse and primate models of HD. In the second study, pretreatment with low doses of cystamine increased levels of four dopaminergic-related markers in aged mice administered the toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), which causes parkinsonian symptoms. Borrell-Pagès et al. showed that cystamine and cysteamine promoted secretion of BDNF, the transport of which is weakened in HD but which is crucial for survival of the striatal neurons targeted by this disorder. Cystamine produced this effect by increasing heat-shock DnaJ-containing protein 1b (HSJ1b) transcripts (which stimulate BDNF secretion) and also by inhibiting transglutaminase (which negatively affects BDNF sorting). HSJ1b inhibited polyQ huntingtin-induced neuronal death in vitro and, in a nematode model of HD, rescued neuronal dysfunction. In addition, cysteamine increased BDNF levels in the brains of HD mice. Data indicated that BDNF levels in blood, which are low in mouse and primate models of HD but were increased by cysteamine injection, could be a useful biomarker of disease progression, and might also be used to test the effects of neuroprotective agents that alter BDNF levels. The effect of cysteamine on BDNF release was transient, but repeat treatments showed continued efficacy, suggesting that cysteamine could be effectively administered repeatedly at short intervals to treat patients with HD. Building on their previous

research into the effects of cystamine in R6/2 transgenic Huntington mice, Cicchetti's group tested different regimens of cystamine in 16-month-old mice with MPTP-induced parkinsonism. A low (10 mg/kg) dose of cystamine beginning 2 days before and continuing during MPTP lesioning reversed the effects of MPTP; there were major differences in cystamine-treated mice compared with MPTP-treated mice, the former having significantly increased tyrosine hydroxylase-positive striatal fiber levels ($P < 0.01$), tyrosine hydroxylase-immunoreactive cell density ($P < 0.01$), substantia nigra Nurr1 messenger RNA levels ($P < 0.001$) and density of substantia nigra cells expressing the dopamine transporter ($P < 0.001$). Cystamine was not as effective at a higher 50 mg/kg dose. The authors acknowledge that more-specific data on the mechanisms of cystamine neuroprotection in MPTP-treated mice are needed, but the results show promise for low-dose cystamine pretreatment in aged parkinsonian mice, and therefore potential in the treatment of Parkinson's disease.

Original articles :

Borrell-Pagès M et al. (2006) Cystamine and cysteamine increase brain levels of BDNF in Huntington disease via HsJ1b and transglutaminase. *J Clin Invest* 116: 1410–1424

Tremblay M-È et al. (2006) Neuroprotective effects of cystamine in aged parkinsonian mice. *Neurobiol Aging* 27: 862–870