

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2010

Thèse n°1754

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement

Le 30 novembre 2010

Par

Amandine Berthet

Née le 22 septembre 1982 à Séoul

**Relations entre les dyskinésies L-dopa induites et le récepteur D1
de la dopamine dans les neurones striataux :
Etude expérimentale et perspectives en thérapeutique**

Membres du Jury

M. S. Oliet	Président
M. B. Giros	Rapporteur
M. A. Nieoullon	Rapporteur
M. P. Vanhoutte	Examinateur
Mme. I. Sagot	Examinateur
M. L. Groc	Membre invité
M. B. Bloch	Directeur de thèse

A mes Parents

A Cyril

REMERCIEMENTS

J'adresse mes sincères remerciements au Professeur Bertrand Bloch, mon directeur de thèse, pour m'avoir accordée sa confiance et son soutien permanent depuis le début de ce projet. Je le remercie profondément pour l'intérêt qu'il a toujours porté à mon travail, pour son apport scientifique, ses qualités pédagogiques, sa rigueur, sa disponibilité, ses qualités humaines, ses conseils prodigués tout au long de ces années fructueuses et pour m'avoir initiée à la Neuroscience. Qu'il soit assuré de mon estime et de ma sincère reconnaissance.

Je remercie également le Dr. Erwan Bézard pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et m'avoir permis de travailler et de m'épanouir dans les meilleures conditions scientifiques et humaines. Pendant ses quatre années, il a su me guider avec patience dans mon projet scientifique avec un grand souci de précision. Je le remercie de m'avoir accordée sa confiance et de m'avoir permis d'être indépendante dans mon travail. Merci d'avoir été présent tout au long de ses années, de m'avoir supportée, de m'avoir épaulée dans les moments de doutes et de coups de blues et d'avoir su raviver mon envie de faire de la recherche. Je pense (en tout cas j'espère...) être bien armée pour la suite. Je lui suis particulièrement reconnaissante et j'espère que nous aurons le plaisir de travailler à nouveau ensemble dans les années à venir.

Je tiens à remercier le Dr Stéphane Oliet d'avoir bien voulu juger ce travail et suis reconnaissante du grand honneur qu'il me fait en acceptant de présider cette thèse. Mes remerciements vont également au Professeur André Niouillon et au Dr Bruno Giros pour avoir accepté la lourde tâche d'être les rapporteurs de ce travail.

Je remercie profondément le Dr Peter Vanhoutte et le Dr Isabelle Sagot pour avoir consenti à juger cette thèse. Je vous exprime ici toute ma gratitude pour l'intérêt que vous avez consenti à porter à ce travail. Je tiens également à remercier le Dr Laurent Groc pour sa collaboration très enrichissante, pour sa rigueur scientifique, pour sa disponibilité et pour avoir accepté d'évaluer ce travail et de siéger à ce jury de thèse.

Je remercie le conseil régional d'Aquitaine pour le soutien financier au cours de ces trois années.

Je tiens également à remercier tous les membres présents et passés de l'équipe « PSP » :

- Merci à Grégory, pour sa collaboration dans nos nombreux projets périlleux (le gavage, le SKF...), pour son aide constante, pour m'avoir supportée, pour sa disponibilité, ses petits cafés pendant ces longues journées d'opérations, ses fraises Tagada, sa bonne humeur...
- Merci à Sandra pour ses conseils en histologie, nos petits cappuccinos du matin, sa bonne humeur, nos petits moments de détentes et nos petits moments de « craquages » (sacs, fringues...).
- Merci à Quentin, mon « coloc » de bureau, pour nos missions de « petits reporters » pendant les congrès, pour tous les bons moments passés. Ce qui s'est passé à Washington et à Chicago reste à Washington et à Chicago !!!
- Merci à Audrey, toujours présente pour écouter et remonter le moral, pour nos trajets le matin et le soir dans les embouteillages, pour nos potins...
- Merci à Mathieu, le squatteur de notre bureau, pour ses conseils en informatique et ses déguisements d'inspecteur Gadget.
- Merci à Pof, dit « Pofinou », pour ses précieux conseils, ses chocolatines du matin, ses petits brownies, nos débriefs des matchs des girondins.
- Merci à Evelyne, ma « maman du labo », pour m'avoir initiée aux joies de la microscopie électronique, pour sa patience, sa minutie, sa gentillesse, sa disponibilité.
- Merci à Benjamin, dit « Jésus », le nouveau venu au sein du laboratoire. Je suis très contente de t'avoir rencontré et je te remercie pour tes conseils « d'anciens » et pour m'avoir épaulée dans les moments de doutes et surtout pour tes petits morceaux de cookies.
- Merci à Gisèle, pour ses recommandations pertinentes et pour son oeil orthographique.
- Merci à Marie-Laure T., pour son aide pour la culture, pour son dynamisme et son caractère.
- Merci à Alain, pour son aide précieuse et sa gentillesse tout au long de ces quatre années.
- Merci à Nathalie, originaire de la ville pour sa précieuse aide logistique, ses bonbons à la violette et ses cassoulets...enfin, j'attends toujours !
- Merci à Marie-Laure MN., Imad, Wassi, François, Carita, Michel, Sandrine, Carita, Loïc, Pedro, Nicolas, Claude et Anne Vital, Marie-Hélène et tous ceux que j'ai oublié de nommer...

Merci également à l'ensemble de l'UMR 5227

- aux habitants de la « rotule » toujours présents mais aussi les anciens : Laura, Jonathan (dit Superman), Stéphanie, Philippe, Claire, Sylvia, Bérangère, Steeve, François...
- à Elizabeth pour son aide administrative.
- aux habitants de Perrens : Anne, Stéphane, Nicolas, Stéphanie...

Je remercie ma famille et surtout ma Maman et mon Papa pour m'avoir toujours fait confiance et pour tant d'autres choses...

Merci à mon Mimi, tout simplement pour avoir été présent à mes côtés, dans les bons moments comme dans les moins bons, pour ton soutien, pour ta patience et ta bonne humeur surtout dans cette dernière ligne droite.

Merci aux copains et aux copines, pour m'ont permis de déconnecter du labo, pour nos longues soirées Poker...

Résumés

RESUME

Mes travaux de thèse concernent le rôle du récepteur D1 de la dopamine dans les dyskinésies L-dopa induites, effets secondaires extrêmement handicapants du traitement de la maladie de Parkinson. En condition de dénervation striatale mimant l'environnement de la maladie de Parkinson, le traitement chronique par la L-dopa entraîne des altérations majeures du trafic intraneuronal et de la signalisation du récepteur D1 de la dopamine dans les principaux neurones cibles de la dopamine, les neurones épineux de taille moyenne du striatum. Il existe en particulier une hypersensibilisation des récepteurs D1 dans les neurones striataux, avec une abondance accrue à la membrane plasmique et une diminution du niveau d'expression de la protéine GRK6 (Protéine kinase des Récepteurs Couplés aux Protéines G 6), un des acteurs clefs des phénomènes de désensibilisation, en relation directe avec l'apparition des dyskinésies.

C'est dans ce contexte que se situe mon travail de thèse qui a eu pour objectif de mettre à profit et/ou de développer différents modèles expérimentaux et outils « *in vivo* » et « *in vitro* ». Nous avons associé des techniques d'imagerie cellulaire et tissulaire à des approches comportementales, afin d'explorer certains des événements cellulaires et moléculaires à l'échelle du neurone striatal et des réseaux neuronaux, reliant le niveau d'expression du récepteur D1, sa compartimentation cellulaire, son trafic intraneuronal et les dyskinésies ou des conditions pharmacologiques équivalentes.

Nous avons confirmé dans le modèle du rat lésé unilatéralement à la 6-OHDA, traité par la L-dopa et développant des mouvements anormaux analogues aux dyskinésies chez l'homme, que le récepteur D1 est anormalement abondant à la membrane plasmique des neurones du striatum, alors qu'il devrait être internalisé après stimulation par son ligand naturel, la dopamine. Nous avons mis en évidence que les mécanismes d'internalisation après stimulation par un agoniste restent néanmoins fonctionnels. Après administration de l'agoniste D1, chez les animaux dyskinétiques, l'abondance des récepteurs D1 augmente dans les compartiments notamment impliqués dans les mécanismes d'internalisation et de transport (vésicules) et de dégradation (corps multivésiculaires). Nous avons apporté une explication possible à cette abondance anormale et à ce défaut d'internalisation, en montrant qu'ils pourraient être dus à une hétérodimérisation entre les récepteurs D1 et D3. La co-activation des récepteurs D1 et D3 par la L-dopa favoriserait l'ancrage du récepteur D1 à la membrane plasmique des neurones striataux.

Dans ce cadre, l'abord de l'étude de l'implication du protéasome dans la régulation de l'expression du récepteur D1 de la dopamine nous a semblé particulièrement important, sur la base des premières études soulignant l'implication de ce système catalytique dans le contrôle de l'activité et du métabolisme des récepteurs aux neurotransmetteurs. Nous avons révélé pour la première fois des liens entre l'activité catalytique du protéasome et la dynamique intraneuronale du récepteur D1 et plus particulièrement nous avons montré que son activité chymotrypsine-like est réduite de façon spécifique dans le striatum d'animaux dyskinétiques, comme une conséquence directe d'une déplétion en dopamine associée à une hyperstimulation dopaminergique.

Nous avons testé en situation expérimentale une stratégie « thérapeutique » nouvelle en restaurant le mécanisme de désensibilisation homologue du récepteur D1 de la dopamine, par correction du déficit de la kinase GRK6 par transfert du gène correspondant *via* l'injection intrastriatale d'un vecteur lentiviral. Nous avons montré que cette approche permet de réduire considérablement la sévérité des dyskinésies dans les modèles rat et primate non-humain, analogues des dyskinésies chez l'homme et qu'elle restaure les effets thérapeutiques de la L-dopa. Ces effets sont la conséquence de la restauration des mécanismes de désensibilisation homologue : la surexpression de GRK6 entraîne l'internalisation spécifique des récepteurs D1.

L'ensemble de nos résultats s'inscrit dans une démarche de recherche translationnelle menée depuis plusieurs années au laboratoire allant de la cellule au patient, avec pour but de transposer la compréhension des données expérimentales concernant les anomalies de l'expression du récepteur D1 de la dopamine en stratégies thérapeutiques dans les dyskinésies L-dopa induites. Nos investigations montrent qu'il est possible d'agir sur l'expression du récepteur D1 à la membrane plasmique des neurones striataux de manière indirecte, en manipulant trois co-activateurs de son métabolisme, pour espérer réduire « *in fine* » la sévérité des dyskinésies.

Mots clés : Dyskinésies L-dopa induites ; Neurones épineux de taille moyenne du striatum ; Récepteur D1 de la dopamine ; Récepteur D3 de la dopamine ; Désensibilisation homologue ; GRK6 ; Protéasome.

ABSTRACT

In my thesis work, I studied the role of dopamine D1 receptor in L-dopa induced dyskinesia, a debilitating complication of Parkinson's disease's treatment. In condition of striatal denervation, that mimics the Parkinson's disease environment, chronic treatment with L-dopa leads to major alterations of intraneuronal trafficking and dopamine D1 receptor signaling in the major target of dopamine neurons, the striatal medium spiny neurons. In particular, there is a D1 receptor hypersensitivity in striatal neurons, with an increased abundance of D1 receptor at the plasma membrane and a decreased level of GRK6 protein expression, a key actor in desensitization mechanism, directly related with the apparition of dyskinesia.

In this context, I used different *in vitro* and *in vivo* experimental models and tools. I have associated cell and tissue imaging techniques and behavioural approaches in order to explore cellular and molecular events in striatal neuron and neuronal networks, linking the D1 receptor expression level, its cellular compartmentalization, its intraneuronal trafficking and the dyskinesia behaviour or equivalent pharmacological conditions.

We confirmed in the rat analog of L-dopa-induced dyskinesia, i.e., the L-dopa-induced abnormal involuntary movements in unilaterally 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-lesioned animals, that D1 receptor is abnormally abundant in the plasma membrane of neurons in the striatum, whereas it should be internalized after stimulation by its natural ligand, the dopamine. We showed that nevertheless the internalization mechanisms after agonist stimulation remains functional. After D1 agonist administration in dyskinetic animals, D1 receptor abundance increases in the cytoplasmic compartments involved in the internalization and transport (vesicles) and degradation (multivesicular bodies) mechanisms. Based on D3 receptor antagonist experiment, we propose that this abnormal abundance and this lack of internalization could be due to heterodimerization between the D1 and D3 receptors. D1 and D3 receptors co-activation by L-dopa might anchor D1 receptor at the plasma membrane of striatal neurons.

In this context, analysis of proteasome involvement in the regulation of dopamine D1 receptor expression seemed particularly important, on the basis of the first studies underlying proteasome involvement in the activity and metabolism of neurotransmitter receptors. We demonstrated for the first time links between the proteasomal catalytic activity and D1 receptor intraneuronal dynamics and more particularly we showed that the proteasome chymotrypsin-like activity is reduced specifically in the striatum of dyskinetic animals, as a direct consequence of dopamine depletion associated with dopaminergic hyperstimulation.

We tested in experimental condition, a new "therapeutic" strategy in order to restore the dopamine D1 receptor homologous desensitization mechanism, correcting the GRK6 kinase deficit by gene transfer through the intrastriatal injection of a lentiviral vector. We showed that this approach reduces significantly the dyskinesia severity in rat and non-human primate models and restores the L-dopa therapeutic effects. These effects are a consequence of the homologous desensitization mechanisms restoration : indeed GRK6 overexpression provokes specific D1 receptor internalization.

Our results are part of a translational research conducted over several years in the laboratory from cell to patient, in order to translate our increased understanding of D1 receptor function abnormalities into therapeutic strategies for L-dopa induced dyskinesia. Our investigations show that it is possible to act on D1 receptor expression at the plasma membrane of striatal neurons via various routes, all resulting into diminished dyskinesia severity.

Keywords: L-dopa induced dyskinesia; medium spiny neurons in the striatum, D1 dopamine receptor, D3 dopamine receptor, homologous desensitization, GRK6; Proteasome.

Sommaire

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	1
RESUME	6
ABSTRACT	8
SOMMAIRE	11
LISTE DE PUBLICATIONS	15
PARTICIPATION AUX CONGRES	16
PRESENTATIONS ORALES	16
POSTERS SELECTIONNES	16
TABLE DES ILLUSTRATIONS	18
TABLEAUX	18
LISTE DES ABRÉVIATIONS	19
AVANT PROPOS	21
I) INTRODUCTION	27
I.A.) LA MALADIE DE PARKINSON	27
I.A.1) <i>Symptomatologie</i>	27
I.A.1.a) Troubles moteurs	27
I.A.1.b) Troubles non moteurs	28
I.A.2) <i>Anatomo-pathologie</i>	29
I.A.2.a) Les corps de Lewy	30
I.A.2.b) Perte des neurones dopaminergiques de la substance noire	33
I.A.2.c) Déplétion de la dopamine striatale	35
I.A.2.d) Autres altérations	36
I.A.3) <i>Rappels sur l'organisation anatomo-fonctionnelles des ganglions de la base</i>	36
I.A.3.a) Etat normal	37
I.A.3.b) Etat parkinsonien	40
I.A.4) <i>Etiologie de la maladie de Parkinson</i>	41
I.A.4.a) Facteurs génétiques	41
I.A.4.b) Facteurs environnementaux	43
I.A.5) <i>Traitements de la maladie de Parkinson</i>	45
I.A.5.a) Traitements pharmacologiques	46
I.A.5.a.i) L-dihydroxyphenylalanine (L-dopa) et associés	46
I.A.5.a.ii) Autres traitements pharmacologiques	47
I.A.5.b) Traitement neurochirurgical : la stimulation cérébrale à haute fréquence	48
I.B.) LES DYSKINESIES L-DOPA INDUITES ET LES RECEPTEURS DOPAMINERGIQUES	50
I.B.1) <i>Effets secondaires des traitements de la maladie de Parkinson</i>	50
I.B.1.a) Complications motrices	50

I.B.1.a.i)	Fluctuations motrices	50
I.B.1.a.ii)	Les dyskinésies	51
I.B.1.b)	Effets non moteurs.....	53
I.B.1.c)	Les traitements antidyskinétiques.....	54
<i>I.B.2) Les récepteurs dopaminergiques dans les ganglions de la base</i>		55
I.B.2.a)	Généralités.....	55
I.B.2.a.i)	Voie de synthèse de la dopamine	55
I.B.2.a.ii)	Voies dopaminergiques	57
I.B.2.b)	Rappels sur les caractéristiques et la structure des récepteurs de la dopamine	58
I.B.2.c)	Voies de signalisation.....	60
I.B.2.d)	Distribution des récepteurs dopaminergiques dans les ganglions de la base	63
I.B.2.d.i)	Récepteur D1	64
I.B.2.d.ii)	Récepteur D2	64
I.B.2.d.iii)	Récepteur D3	65
I.B.2.d.iv)	Récepteur D4	66
I.B.2.d.v)	Récepteur D5	66
I.B.2.e)	Trafic, internalisation et désensibilisation du récepteur D1 de la dopamine.....	67
I.B.2.e.i)	Biosynthèse et adressage des récepteurs	67
I.B.2.e.ii)	Stimulation, internalisation et désensibilisation du récepteur D1 de la dopamine.....	70
<i>I.B.3) Altérations de la cascade de signalisation médiée par le récepteur D1 de la dopamine dans les dyskinésies L-dopa induites</i>		75
I.B.3.a)	Le récepteur D1 de la dopamine	75
I.B.3.b)	La protéine Go et la protéine DARPP-32.....	76
I.B.3.c)	Les protéines GRKs.....	76
I.B.3.d)	Le récepteur D3 de la dopamine	77
<i>I.B.4) Modèles animaux de la maladie de Parkinson et des dyskinésies L-dopa induites</i>		77
I.B.4.a)	Lésions induites par la 6-hydroxydopamine	81
I.B.4.a.i)	La toxicité de la 6-OHDA	81
I.B.4.a.ii)	Chez le rat	81
I.B.4.a.iii)	Chez la souris	84
I.B.4.b)	Lésions induites par le MPTP.....	84
I.B.4.b.i)	Chez la souris	84
I.B.4.b.ii)	Chez le rat	85
I.B.4.b.iii)	Chez le primate non-humain	85
<i>I.C.) SYSTEME UBIQUITINE-PROTEASOME ET MALADIES NEURODEGENERATIVES</i>		87
<i>I.C.1) Struture du protéasome 26S.....</i>		88
I.C.1.a)	Le protéasome 20S	90
I.C.1.b)	Le complexe régulateur 19S.....	92
I.C.1.c)	L'activateur 11S	93
I.C.1.d)	L'immunoprotéasome	94
I.C.1.d.i)	Réponse immunitaire	94
I.C.1.d.ii)	Vieillissement.....	94
<i>I.C.2) Système ubiquitine-protéasome.....</i>		95

I.C.3) <i>Rôle du système ubiquitine-protéasome dans le contrôle des activités neuronales et les mécanismes de neurodégénérescence.....</i>	99
I.C.3.a) Système ubiquitine-protéasome et contrôles des activités neuronales	99
I.C.3.a.i) Adressage membranaire et dégradation des récepteurs aux neurotransmetteurs	99
I.C.3.a.ii) Plasticité synaptique.....	100
I.C.3.a.iii) Activité électrique	102
I.C.3.a.iv) Contrôle de la localisation intraneuronale du système ubiquitine-protéasome et de son activité par l'environnement en neurotransmetteurs.....	102
I.C.3.b) Pathologie du système nerveux et système ubiquitine-protéasome et physiopathologie	103
I.C.3.c) Protéasome et dégénérescence des neurones dopaminergique	104
II) RESULTATS	109
II.A.) ARTICLE 1 : L'ANALYSE PHARMACOLOGIQUE REVELE DES ALTERATIONS DE LA DISTRIBUTION NEURONALE DU RECEPTEUR D1 DE LA DOPAMINE DANS UN MODELE RAT ANALOGUE DES DYSKINESIES L-DOPA INDUITES.....	109
II.A.1) <i>Résumé</i>	109
II.A.2) <i>Article 1</i>	112
II.B.) ARTICLE 2 : L'ALTERATION DE L'ACTIVITE DU PROTEASOME MEDIEE PAR LE RECEPTEUR D1 DE LA DOPAMINE DANS LES NEURONES EPINEUX DE TAILLE MOYENNE CONTRIBUE AUX DYSKINESIES L-DOPA INDUITES	121
II.B.1) <i>Résumé</i>	121
II.B.2) <i>Article 2</i>	124
II.C.) ARTICLE 3 : LA SUREXPRESSION DE GRK6 PAR UN VECTEUR LENTIVIRAL AMELIORE LES DYSKINESIES L-DOPA INDUITES DANS LES MODELES EXPERIMENTAUX DE LA MALADIE DE PARKINSON	152
II.C.1) <i>Résumé</i>	152
II.C.2) <i>Article 3</i>	155
III) DISCUSSION	189
III.A.) SYNTHESE GENERALE DES RESULTATS.....	189
III.B.) TRANSDUCTION, MECANISME DE DESENSIBILISATION DU RECEPTEUR D1, PROTEASOME ET DYSKINESIES L-DOPA INDUITES COMME CIBLES THERAPEUTIQUES	192
III.B.1) <i>Signification physiopathologique</i>	192
III.B.2) <i>Intérêts potentiels en thérapeutique, outils et contraintes</i>	194
III.B.2.a) Interaction entre les récepteurs D1 et D3 de la dopamine	194
III.B.2.b) Stimulation de l'activité catalytique du protéasome	194
III.B.2.c) Surexpression de GRK6	196
III.B.2.d) Autres cibles.....	197
III.C.) AUTRES CIBLES THERAPEUTIQUES POTENTIELLES DANS LES NEURONES STRIATAUX : GLUTAMATE/PSD95.....	198
IV) CONCLUSION GENERALE	205
V) PUBLICATIONS ANNEXES.....	208

V.A.)	ARTICLE ANNEXE 1	208
V.B.)	ARTICLE ANNEXE 2	218
V.C.)	ARTICLE ANNEXE 3	246
V.D.)	ARTICLE ANNEXE 4	252
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES		259

LISTE DE PUBLICATIONS

Revues à comité de lecture

- **Berthet A**, Bezard E, Porras G, Fasano S, Barroso-Chinea P, Thiolat ML, Nosten M, Baufreton J, Li Q, Bloch B and Martin-Negrier ML. Dopamine D1 receptor-mediated alteration of proteasome activity in medium spiny neurons contributes to L-dopa-induced dyskinesia. soumis.
- Porras G*, **Berthet A***, Dehay B, Li Q, Normand E, Dovero S, Martinez A, Boue-Grabot E, Doudnikoff E, Mulle C, Bloch B, Choquet D, Groc, L, Bezard E. Disrupting D1R-NMDAR interaction through PSD-95 improves L-dopa-induced dyskinesia. en préparation. (*: égale contribution)
- Krawczyk M, Georges F, Sharma R, Mason X, **Berthet A**, Bezard E and Dumont E. Double-dissociation of the catecholaminergic modulation of synaptic transmission in the oval bed nucleus of the stria terminalis. sous presse. *Journal of Neurophysiology* 2010 Nov 3.
- Ahmed MR, **Berthet A**, Bychkov E, Li Q, Porras G, Bioulac BH, Bloch B, Kook S, Aubert I, Dovero S, Doudnikoff E, Gurevich VV, Gurevich EV1, and Bezard E. Lentivirally-mediated overexpression of GRK6 alleviates L-dopa-induced dyskinesia in experimental Parkinson's disease. *Sci Transl Med*. 2010 Apr 21;2(28):28ra28
- **Berthet A**, Bezard E. Dopamine receptors and L-dopa-induced dyskinesia. *Parkinsonism and Related Disorders* 15S (2009) S1–S5.
- **Berthet A**, Porras G, Doudnikoff E, Stark H, Cador M, Bezard E and. Bloch B. Pharmacological analysis demonstrates dramatic alteration of D1 dopamine receptor neuronal distribution in the rat analog of L-dopa-induced dyskinesia. *Journal of Neuroscience* (2009) 29:4829-4835.
- Schuster S, Doudnikoff E, Rylander D, **Berthet A**, Aubert I, Ittrich C, Bloch B, Cenci MA, Surmeier DJ, Hengerer B, Bezard E. Antagonizing L-type Ca²⁺ channel reduces development of abnormal involuntary movement in the rat model of L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia. *Biol Psychiatry*. 2009 Mar 15;65(6):518-26.

Article didactique

- **Berthet A** et Bézard E. GRK6, une nouvelle piste thérapeutique pour diminuer les dyskinésies L-dopa induites. Médecine / Sciences, Volume 26, n°10, Octobre 2010, Pages 14-17

PARTICIPATION AUX CONGRES

- 7th Forum of European Neuroscience, *Amsterdam July 3-7th 2010.*
- 2nd Symposium, Synaptic adaptation & NMDA receptor: old story, fresh look! *Bordeaux, 3rd September 2009.*
- 39th Annual Meeting Society for Neuroscience, *Chicago, October 17-21th 2009.*
- 9^e Colloque de la Société des Neurosciences, *Bordeaux, May 26-29th 2009.*
- 38th Annual Meeting Society for Neuroscience, *Washington, November 15-19th 2008.*
- New Frontiers in Neurophotonics, 1st Franco-Canadian symposium, *Bordeaux, October 20-23th 2008.*
- 1st Meeting Européen de la Synapse, *Bordeaux, March 26-28th 2008.*

PRESENTATIONS ORALES

- Abnormal subcellular localization of dopamine and glutamate receptors in L-dopa-induced dyskinesia: evidences and path to therapy. 2nd Symposium, Synaptic adaptation & NMDA receptor: old story, fresh look! *Bordeaux, September 3rd 2009.*
- Altération de la distribution des récepteurs D1 à la dopamine dans les dyskinésies induites par la L-dopa. *Journée de l'UMR5227, Bordeaux, May 15th 2009.*
- Altération de la distribution des récepteurs D1 à la dopamine dans les dyskinésies induites par la L-dopa. *Journée de l'école doctorale, Arcachon, April 8th 2009.*

POSTERS SELECTIONNES

- Porras G, **Berthet A**, Dovero S, Normand E, Aubert I, Doudnikoff E, Martinez A, Mulle C and Bezard E. Lentiviral-mediated silencing of PSD-95 diminishes L-dopa-induced dyskinesia in the 6-OHDA rat model. *40th Annual Meeting Society for Neuroscience, San Diego, November 13-17th 2010.*
- **Berthet A**, Bezard E, Porras G, Li Q, Nosten M, Bloch B and Martin-Negrier ML. Dramatic alteration of proteasome activity in striatal neurons in L-dopa-induced dyskinesia. *40th Annual Meeting Society for Neuroscience, San Diego, November 13-17th 2010.*
- **Berthet A**, Porras G, Li Q, Martin-Negrier ML, Thiolat ML, Bezard E and Bloch B. Dramatic alteration of proteasome activity in L-dopa-induced dyskinesia. *7th Forum of European Neuroscience, Amsterdam July 3-7th 2010.*

- **Berthet A**, Porras G, Doudnikoff E, Bezard E and Bloch B. D₁ dopamine receptor distribution in substantia nigra in a rat analog of L-dopa-induced dyskinesia. 39th Annual Meeting Society Society for Neuroscience, *Chicago, October 17-21th 2009*. P 144
- Ahmed MR, **Berthet A**, Porras G, Bychkov E, Li Q, Bioulac B, Bloch B, Kook S, Aubert I, Dovero S, Doudnikoff E, Gurevich VV, Gurevich EV and Bezard E. Lentivirally-mediated overexpression of GRK6 alleviates L-dopa-induced dyskinesia in experimental Parkinson's disease. *13th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Paris, Jun 7-11th 2009*. Abs 100.
- Berthet A, Porras G, Doudnikoff E, Stark H, Cador M, Bezard E and Bloch B. Pharmacological analysis demonstrates dramatic alteration of D₁ dopamine receptor neuronal distribution in the rat analog of L-dopa-induced dyskinesia. *9^{ème} Colloque de la Société des Neurosciences, Bordeaux, May 26-29th 2009*. Abs. 009-82, p 113.
- **Berthet A**, Porras G, Doudnikoff E, Bezard E and Bloch B. Trafficking of D₁ dopamine receptors in a rat model of Parkinson disease: absence of internalization in L-dopa induced dyskinesia. *38th Annual Meeting Society Society for Neuroscience, November 15-19th 2008, Washington*. 141.17/R11.
- **Berthet A**, Porras G, Doudnikoff E, Bezard E et Bloch B. Défaut d'internalisation des récepteurs D₁ à la dopamine dans les dyskinésies induites par la L-dopa. *Journée de l'école doctorale, Arcachon, April 16th 2008*.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

<u>Figure 1 : Les corps de Lewy (d'après Lang 1990 et Dauer 2003).</u>	30
<u>Figure 2. Progression graduelle schématique du processus neuropathologique de la maladie de Parkinson, d'après la théorie de Braak (Braak et al., 2002).</u>	33
<u>Figure 3 : Neuropathologie de la maladie de Parkinson (d'après Dauer and Przedborski, 2003).</u>	34
<u>Figure 4: Schéma simplifié d'organisation des ganglions de la base, adapté de DeLong (1990).</u>	38
<u>Figure 5. Représentation schématique du métabolisme du MPTP et de la voie intracellulaire du MPP+ suite à une administration systémique (d'après Dauer and Przedborski, 2003).</u>	44
<u>Figure 6 : Cinétique et effet d'une prise de L-dopa.</u>	52
<u>Figure 7 : Représentation schématique de la synapse dopaminergique.</u>	56
<u>Figure 8 : Représentation schématique des quatre voies dopaminergiques.</u>	58
<u>Figure 9 : Représentation schématique de la structure des récepteurs D1-like et D2-like à la dopamine.</u>	59
<u>Figure 10 : Cycle d'activation des protéines G.</u>	61
<u>Figure 11 : Cascade de signalisation du récepteur D1 de la dopamine.</u>	62
<u>Figure 12 : Distribution des récepteurs D1, D2 et D3 à la dopamine au sein des ganglions de la base chez le primate non-humain.</u>	63
<u>Figure 13 : Biosynthèse et adressage à la membrane des récepteurs aux neurotransmetteurs dans les neurones.</u> 69	69
<u>Figure 14 : Modèle du trafic intraneuronal des récepteurs couplés aux protéines G après stimulation.</u>	71
<u>Figure 15 : Représentation schématique du mécanisme de désensibilisation homologue du récepteur D1 de la dopamine (Guigoni and Bezard, 2009).</u>	73
<u>Figure 16 : Mécanismes impliqués dans la toxicité de la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) et du 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), d'après Lambeng 2002.</u>	80
<u>Figure 17 : Diagramme schématique du système ubiquitine-protéasome.</u>	89
<u>Figure 18 : Le protéasome 26S.</u>	90
<u>Figure 19 : Structure du protéasome 20S.</u>	91
<u>Figure 20 : Représentation du protéasome 19S, d'après (Hanna and Finley, 2007).</u>	92
<u>Figure 21 : Le système ubiquitine/protéasome et les types de fixation de l'ubiquitine.</u>	95
<u>Figure 22 : Intervention du système ubiquitine/protéasome dans le métabolisme intraneuronal des récepteurs (Mukhopadhyay and Riezman, 2007)</u>	98
<u>Figure 23 : Illustration schématique de l'hétérodimérisation des récepteurs D1 et D3 de la dopamine dans les neurones striataux. (Fiorentini et al., 2010)</u>	190
<u>Figure 24 : Représentation schématique de la synapse glutamatergique et de l'interaction D1/PSD95/NMDA.</u> 200	200

TABLEAUX

<u>Tableau 1 : Génétique de la maladie de Parkinson</u>	42
<u>Tableau 2 : Différents modèles animaux utilisés pour étudier la maladie de Parkinson.</u>	78
<u>Tableau 3 : Les différents modèles de rats traités par la 6-OHDA.</u>	83

LISTE DES ABRÉVIATIONS

6-OHDA	6-hydroxydopamine
AMPA	Acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique
DA	Dopamine
G α _{olf}	Olfactory type G-protein α subunit
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GRK6	Protéine kinase des Récepteurs Couplés aux Protéines G
L-dopa	Lévo-dopa ou L-dihydroxyphenylalanine
MPTP	1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MVBs	Corps multivésicliaires
NMDA	N-méthyl-D-Aspartate
PSD95	Postsynaptic density 95
RCPG	Récepteur Couplé aux Protéines G

Avant propos

AVANT PROPOS

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative caractérisée par la perte progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta*. Actuellement, le traitement pharmacologique de référence de la maladie est toujours basé sur l'administration de la L-dopa, le précurseur direct de la dopamine, capable de traverser la barrière hémato-encéphalique contrairement à la dopamine. Cependant, après quelques années, ce traitement présente des limites et la majorité des patients traités développe des effets secondaires handicapants, qui sont principalement des mouvements involontaires anormaux, les dyskinésies L-dopa induites (Cotzias et al., 1969).

Le travail expérimental de cette thèse s'inscrit dans la thématique menée au sein de l'équipe de recherche « Physiopathologie des syndromes parkinsoniens », dirigée par Erwan Bézard et Bertrand Bloch, qui étudie les bases cellulaires et moléculaires des mécanismes à l'origine des altérations du mouvement de la maladie de Parkinson et en particulier des dyskinésies L-dopa induites. Ces travaux expérimentaux sont menés sur la base d'investigations physiopathologiques dans des modèles cellulaires et animaux ainsi que chez l'homme, afin d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles.

Ces dernières années, différents travaux expérimentaux de notre équipe menés principalement dans le modèle primate non-humain, ont mis en évidence que le traitement chronique par la L-dopa, en condition de dénervation striatale mimant l'environnement de la maladie de Parkinson, entraîne des altérations majeures du trafic intraneuronal et de la signalisation du récepteur D1 de la dopamine dans les principaux neurones cibles de la dopamine, les neurones épineux de taille moyenne du striatum (Aubert et al., 2005; Guigoni et al., 2007). Il existe en particulier une hypersensibilisation de ces récepteurs dans des neurones striataux en relation directe avec l'apparition des dyskinésies (Aubert et al., 2005) et une diminution du niveau d'expression de la protéine GRK6 (Protéine kinase des Récepteurs Couplés aux Protéines G 6), un des acteurs clefs des phénomènes de désensibilisation (Bezard et al., 2005). Dans ce contexte, des études d'imagerie cellulaire en microscope électronique menées dans le modèle primate non –humain parkinsonien, analogue des dyskinésies L-dopa induites, révèlent un recrutement massif anormal du récepteur D1 de la dopamine à la membrane plasmique des neurones striataux et des anomalies du trafic intraneuronal de ces récepteurs

suggérant une perturbation des phénomènes d'endocytose après stimulation par la L-dopa (Guigoni et al., 2007).

Néanmoins, bien que ce modèle primate non-humain analogue des dyskinésies soit depuis de nombreuses années le modèle de référence de la maladie de Parkinson et des dyskinésies sur un plan clinique (Bezard et al., 2001a), il reste cependant insuffisant à lui seul pour explorer les mécanismes moléculaires qui contribuent à l'histoire naturelle de la maladie et entre autres aux développements des dyskinésies. Malgré les résultats obtenus ces dernières années par notre équipe et par d'autres groupes, les mécanismes qui conduisent à leur apparition et à leur aggravation sous traitement par la L-dopa sont toujours à ce jour mal compris. Ceci justifie une exploration approfondie des anomalies conduisant à ces troubles du mouvement particulièrement invalidants afin de les comprendre, les traiter et idéalement les prévenir ou maîtriser leur apparition.

C'est dans ce contexte que se situe mon travail de thèse qui a eu pour objectif d'explorer et d'influencer dans différents modèles expérimentaux certains des événements cellulaires et moléculaires liant les dyskinésies L-dopa induites et la production du récepteur D1, sa compartimentation cellulaire et son trafic intraneuronal dans les neurones striataux. Nous avons cherché à mettre à profit et/ou développer différents modèles expérimentaux et outils « *in vivo* » et « *in vitro* », en particulier des techniques d'imagerie cellulaire et tissulaire associées à des approches comportementales, afin de décrire ces modifications à l'échelle du neurone striatal et des réseaux neuronaux en relation avec la survenue de dyskinésies ou dans des conditions pharmacologiques équivalentes. Nous avons étudié ces modifications en analysant et/ou en modifiant l'activité d'acteurs moléculaires intervenant dans la biologie cellulaire du récepteur D1 en particulier le protéasome et la protéine GRK6. Ces investigations ont été menées en recherchant et en quantifiant en parallèle les dyskinésies ou les troubles équivalents par des analyses comportementales appropriées.

Dans la plupart des travaux que nous avons menés, nous avons détecté le récepteur D1 par immunohistochimie quantitative selon différentes modalités en microscopie optique et électronique pour en déterminer son abondance et sa localisation dans différents compartiments des neurones (dont la membrane plasmique) afin de rendre compte de sa dynamique intraneuronale. Ces investigations ont été menées sur des neurones isolés (cultures primaires de neurones striataux), et dans différents modèles chez l'animal entier, la souris, le rat et le primate non-humain. Nous avons couplé ces analyses avec l'étude biochimique et

anatomique de l'expression du protéasome (souris / rat / primate non-humain) et la surexpression de la protéine GRK6 (rat / primate non-humain).

Notre travail publié faisant l'objet de cette thèse comporte trois volets complémentaires :

1) L'étude des anomalies du trafic intraneuronal du récepteur D1 de la dopamine dans des conditions expérimentales qui miment chez le rat l'histoire naturelle de la maladie de Parkinson et les dyskinésies L-dopa induites.

Nous avons voulu mettre à profit le modèle rongeur pour approfondir les données partielles obtenues précédemment dans le modèle primate non-humain, analogue des dyskinésies (Guigoni et al., 2007). Nous avons ainsi confirmé que le récepteur D1 de la dopamine est aussi anormalement recruté à la membrane plasmique des neurones striataux lors des dyskinésies dans le modèle rat. Cependant, les mécanismes d'internalisation du récepteur restent fonctionnels, comme le montrent les expériences de stimulation par agoniste. Nous proposons sur la base de nos résultats qu'une explication possible de cet ancrage exagéré à la membrane peut être la participation du récepteur D3 à la dopamine (surexprimé de manière ectopique dans le striatum dorsal des animaux dyskinétiques), *via* son hétérodimérisation avec le récepteur D1.

2) L'étude des relations dans le striatum entre l'activité du protéasome et le comportement du récepteur D1 de la dopamine dans différents modèles approchant les conditions de l'apparition des dyskinésies chez le rat, la souris et chez le primate non-humain.

Il est apparu depuis quelques années que l'activité du protéasome est un élément important modulant l'expression de différents récepteurs aux neurotransmetteurs dans des conditions normales et pathologiques (Patrick et al., 2003; Guo and Wang, 2007). Dans ce cadre, l'absence de données dans le champ de la maladie de Parkinson et des dyskinésies nous a conduits à initier cette recherche. Nous avons ainsi mis en évidence une diminution de l'activité catalytique du protéasome au cours des dyskinésies qui pourrait contribuer à la régulation de la densité des récepteurs D1 et à son recrutement anormal à la membrane plasmique des neurones striataux.

3) L'étude des conséquences de la surexpression de la protéine GRK6 via l'injection d'un vecteur lentiviral dans le striatum sur la sévérité des dyskinésies.

Nous avons cherché de possibles pistes thérapeutiques pour diminuer la localisation du récepteur D1 de la dopamine à la membrane plasmique. Pour cela, sur les bases des précédents travaux menés au sein du laboratoire, nous avons choisi d'intervenir sur le mécanisme de désensibilisation homologue du récepteur D1, en ciblant la protéine GRK6, une kinase permettant la phosphorylation du récepteur, dont le niveau d'expression est réduit au cours des dyskinésies (Bezard et al., 2005). La stratégie appliquée a été d'induire une surexpression de GRK6 par transfection lentivirale à la fois dans les modèles rat et primate non-humain analogues des dyskinésies. Nous avons ensuite mesuré l'effet de cette surexpression sur la sévérité des dyskinésies ainsi que sur la localisation du récepteur D1 de la dopamine. La surexpression de GRK 6 permet de diminuer spectaculairement la sévérité des dyskinésies et d'internaliser le récepteur D1 après stimulation par son ligand naturel, la dopamine.

Notre mémoire de thèse est divisé en trois parties :

Dans l'introduction nous avons cherché à replacer les objectifs de nos investigations dans le contexte des connaissances actuelles sur la maladie de Parkinson, l'expression et la régulation des récepteurs dopaminergiques, les dyskinésies L-dopa induites et le fonctionnement du protéasome dans le système nerveux central.

La section résultats concerne les trois articles publiés ou soumis que nous présentons replacés dans le contexte de cette thèse.

Dans la discussion, nous avons cherché à tirer les enseignements de nos investigations en particulier dans une perspective de compréhension de la physiopathologie de ces dyskinésies L-dopa induites et de la manipulation de l'expression des récepteurs D1 à la dopamine et des acteurs moléculaires associés dans des perspectives thérapeutiques.

Introduction

I) Introduction

I.A.) La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson avec une prévalence de 2 pour 1000 habitants dans la population générale, s’élargissant à 2% au-delà de 65 ans, est la maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d’Alzheimer (de Rijk et al., 1997). En Europe, elle atteint autant les hommes que les femmes. Elle débute en moyenne entre 55 et 65 ans, mais peut survenir à tout âge. En France, c’est la seconde cause de handicap moteur chez le sujet âgé après les accidents vasculaires cérébraux. Cette prévalence tend encore à s’accroître compte tenu du vieillissement démographique de la population, et confère par conséquent à cette affection un poids socio-économique important.

I.A.1) Symptomatologie

I.A.1.a) Troubles moteurs

La maladie de Parkinson est une pathologie neurodégénérative, décrite pour la première fois en 1817, par James Parkinson (Parkinson, 1817), comme une « paralysie agitante ». D’un point de vue clinique, les troubles moteurs de cette maladie sont souvent qualifiés de symptômes cardinaux, qui regroupent les quatre manifestations les plus courantes et les plus handicapantes décrites chez les patients parkinsoniens.

L'**akinésie** et la **bradykinésie** correspondent respectivement à la raréfaction/privation du mouvement et à la lenteur de son exécution (Wilson, 1925). En d’autres termes, il s’agit d’un ralentissement dans l’initiation du mouvement avec l’apparition d’un délai significatif entre la volonté de réaliser le mouvement et son exécution (hésitation au démarrage). La bradykinésie peut considérablement nuire à la qualité de vie des patients parkinsoniens, en demandant beaucoup plus de temps pour effectuer les tâches quotidiennes comme s’habiller ou manger. Un patient parkinsonien a du mal à se mouvoir, il avance à petits pas ou piétine, le balancement des bras lors de la marche disparaît.

La **rigidité** est assimilée à une exagération du tonus musculaire (hypertonie musculaire généralisée). Elle est continue et homogène. La commande volontaire descendante trouve le muscle dans un état de préparation anormal et nécessite la mise en route de mécanismes

compensatoires pour surmonter les contraintes physiques additionnelles. La rigidité concerne la quasi-totalité des muscles avec une prédominance du versant fléchisseur sur le versant extenseur (Delwaide et al., 1986).

Le **tremblement de repos** constitue le symptôme le plus caractéristique de la maladie, même s'il est absent dans 20% des cas environ. C'est un tremblement lent et régulier qui survient au repos. Il commence généralement de façon unilatérale et prédomine au niveau des extrémités supérieures avec un pic de fréquence de 4 à 6 hertz (Stanley-Jones, 1956).

L'**instabilité posturale** est une manifestation plus tardive dans l'évolution de la maladie. Elle se manifeste par des troubles de l'équilibre pouvant entraîner des chutes de plus en plus fréquentes, et par conséquent constitue le symptôme le plus incommodant et handicapant (Bloem, 1992).

Ces manifestations cliniques se combinent entre elles selon les patients. Ces symptômes sont variables dans le temps. Ils sont influencés par les émotions, le stress, les stimuli visuels et auditifs.

Le diagnostic de la maladie de Parkinson repose sur des critères d'évaluation clinique identifiés par un syndrome parkinsonien lui-même défini par la présence d'une bradykinésie associée au minimum à l'un des symptômes suivants : tremblements de repos, rigidité et instabilité posturale (Quinn, 1997).

I.A.1.b) Troubles non moteurs

La maladie de Parkinson a longtemps été définie comme une pathologie exclusivement motrice, mais elle apparaît aujourd'hui comme une maladie beaucoup plus complexe. En effet, les patients parkinsoniens peuvent également présenter d'autres symptômes non négligeables qualifiés de « non-moteurs », qui sont des manifestations moins prononcées mais qui affectent grandement la qualité de vie des patients, en particulier pour sa vie professionnelle et sociale ainsi que pour son entourage, et compliquent sa prise en charge.

Les **perturbations sensorielles** regroupent des troubles olfactifs (dans 80% des cas), visuels avec des difficultés dans la discrimination visuelle de contraste et des couleurs, des vertiges et des évanouissements attribuables à une hypotension orthostatique (échec pour ajuster la tension artérielle en réponse aux changements de la position de corps) (Bonuccelli et al., 2003). Dans plus de 40% des cas, les patients parkinsoniens sont sujets à des douleurs chroniques se manifestant par des douleurs musculo-squelettiques, des douleurs neuropathiques, des douleurs liées à de l'hypertonie ou des dystonies, des douleurs centrales et des akathisies (Ford, 2010).

Les **perturbations cognitives et de l'humeur** se traduisent par une rigidité mentale et une inflexibilité (syndrome frontal) (Cools et al., 2001), des pertes de mémoire, une diminution des capacités d'apprentissage, des temps de réaction ralenti. Les troubles cognitifs peuvent être modérés, mais lors de la phase plus tardive de la maladie ils évoluent vers une démence chez approximativement 20-40% des patients. Parfois, ces démences peuvent être accompagnées de psychoses, se traduisant généralement par des hallucinations visuelles (Goetz and Stebbins, 1995). Les troubles thymiques se manifestent par une dépression qui affecte environ 50% des malades, de l'anxiété et une apathie.

Les **perturbations du système nerveux autonome** peuvent être des troubles gastro-intestinaux (constipation et dysphagie dans 50% des cas, nausées, amaigrissement), vésico-sphinctériens (incontinence), des troubles sexuels et des troubles cutanés caractérisés par la dermite séborrhéique.

Les **perturbations du sommeil** sont des troubles handicapants et très fréquents avec une prévalence comprise entre 66 et 96% des patients (Kales et al., 1971; Lees et al., 1988; Larsen, 2003), et qui présentent une dérégulation des cycles veille/sommeil. Ces troubles du sommeil se traduisent par des insomnies (insomnies d'endormissement et fragmentation du sommeil), des parasomnies (apnées du sommeil et cauchemars), de la somnolence diurne, et d'une réduction du sommeil paradoxal.

I.A.2) Anatomo-pathologie

Le diagnostic de la maladie de Parkinson est avant tout clinique mais comme pour de nombreuses pathologies neurodégénératives, ce diagnostic n'est apporté avec certitude

qu'après examen anatomo-pathologique. En effet, elle est caractérisée par une perte neuronale touchant principalement la substance noire *pars compacta* conduisant à une dépigmentation et s'accompagnant de la présence d'inclusions neuronales cytoplasmiques appelées corps de Lewy.

I.A.2.a) Les corps de Lewy

La maladie de Parkinson, d'un point de vue neuropathologique, fait partie des synucléinopathies. Ce groupe de maladies extrapyramidales, incluant les atrophies multisystématisées et la démence à corps de Lewy entre autres, est caractérisé par la présence anormale d'agrégats d' α -synucléine, formant des inclusions neuronales éosinophiles cytoplasmiques caractéristiques : les **corps de Lewy** (Spillantini et al., 1998; Dauer and Przedborski, 2003) (Figure 1).

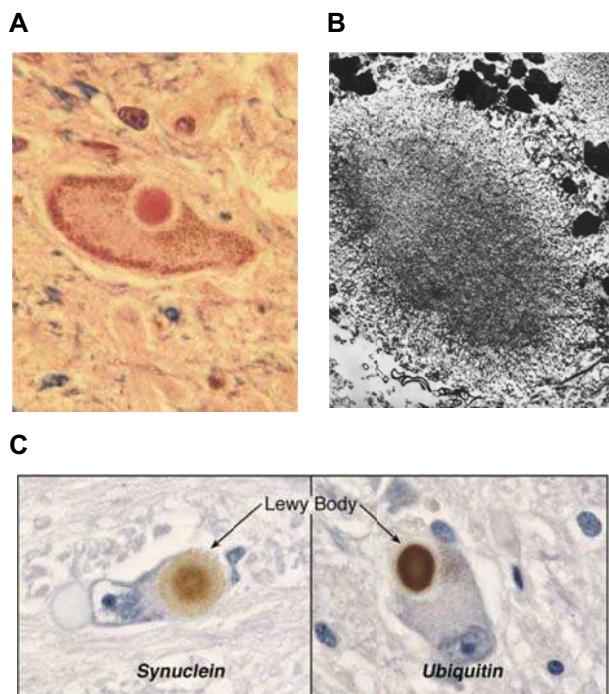


Figure 1 : Les corps de Lewy (d'après Lang 1990 et Dauer 2003).

- (A) Les corps de Lewy sont des inclusions éosinophiles qui contiennent de l' α -synucléine.
- (B) L'observation ultrastructurale montre qu'ils sont constitués d'un cœur dense et granulaire et d'une couronne d'aspect filamenteux.
- (C) Marquage immunohistochimique des inclusions neuronales appelées corps de Lewy dans un neurone dopaminergique. L'illustration de gauche présente une immunoréactivité ciblant l' α -synucléine et révélant un corps de Lewy (flèche noire). L'illustration à droite caractérise une immunoréactivité ciblant l'ubiquitine, révélant également la présence d'un corps de Lewy.

Ces inclusions sont sphériques, de 5 à 25 µm de diamètre environ et présentent un cœur dense et un halo périphérique plus clair (Goedert et al., 1998; Lang and Lozano, 1998). L'observation ultrastructurale des corps de Lewy révèle une structure granuleuse et filamenteuse du cœur de l'inclusion et un aspect filamenteux, radiaire de la couronne périphérique (Goedert et al., 1998). Il est difficile de déterminer si la présence des corps de Lewy est le reflet et la conséquence d'une souffrance cellulaire ou s'ils participent au processus dégénératif (Agid, 1991; Agid et al., 1993; Langston, 1996; Lebouvier et al., 2009). En plus des agrégats de synucléine, on y trouve des neurofilaments et de la tubuline (composant principal des microtubules), ce qui suggère une altération du cytosquelette (Goldman et al., 1983; Gibb et al., 1991; Uitti and Calne, 1993).

La présence d' α -synucléine dans les corps de Lewy est très intéressante car certaines formes génétiques de la maladie de Parkinson sont dues à des mutations du gène codant pour cette protéine (Polymeropoulos et al., 1997) (cf ci-dessous). De plus, la présence d'ubiquitine suggère que des défauts de dégradation ou d'agrégation de protéines pourraient contribuer au processus pathologique (Leroy et al., 1998).

Dans la maladie de Parkinson, les corps de Lewy sont présents dans les neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* (Gibb et al., 1991; Agid et al., 1993) mais ils sont aussi retrouvés dans tout le reste du cerveau (Halliday et al., 1990b; Jellinger, 1991).

Les études anatomo-pathologiques effectués par Braak ont également contribué à mettre en évidence le caractère diffus intracérébral des lésions de la maladie de Parkinson (Braak et al., 2003). Cependant, leurs interprétations doivent être nuancées, car elles relèvent seulement la distribution des corps de Lewy à différents stades évolutifs de la maladie et non l'évolution du processus neurogénératif.

La théorie de Braak identifie **six stades évolutifs** de la maladie de Parkinson durant lesquels l'extension du processus neurodégénératif s'opère de manière lente et progressive en corrélation avec l'évolution des signes cliniques et confère aux symptômes non moteurs un rôle de signes précoces ou de marqueurs précliniques de la maladie (Figure 2) :

- Les deux premiers stades, pouvant s'étaler sur plusieurs décennies, correspondent aux phases précliniques ou prémotrices de la maladie (Figure 2A).

Le **premier stade** se caractériserait par l'atteinte du bulbe olfactif et du noyau dorsal du nerf vague (X^o paire de nerfs crâniens). Les conséquences seraient le dysfonctionnement de l'olfaction et ainsi que l'apparition de nombreux signes non moteurs de la maladie, comme l'hypotension et certains troubles du rythme cardiaque, les anomalies de la voix et de la déglutition, la constipation ou une fatigue chronique anormale.

Le **deuxième stade** présenterait une progression du processus neuropathologique dans la partie inférieure du tronc cérébral et d'autres aires (extension de l'atteinte du nerf vague, noyau pédonculopontin, locus coeruleus, noyau subcoeruleus, noyau du raphé). Les symptômes les plus caractéristiques de cette phase seraient des troubles psychopathologiques : troubles de l'attention, de la mémoire, du sommeil et de l'état de veille (trouble du comportement en sommeil paradoxal, somnolence diurne excessive), de l'affectivité ainsi que de la régulation adaptative ou stress.

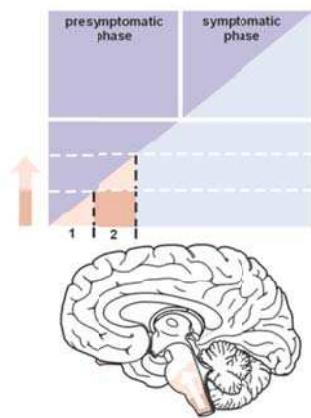
- Les stades 3 et 4 marqueraient la transition entre les stades précliniques et cliniques de la maladie (Figure 2B).

Le **troisième stade** correspondrait à l'atteinte et à la destruction neuronale plus importante de zones sous-jacentes (amygdale, ganglion de Meynert, substance noire *pars compacta*). Les atteintes de l'amygdale et du ganglion de Meynert seraient à l'origine de dysfonctionnements des réponses du système nerveux végétatif, des mécanismes de la douleur et des mécanismes émotionnels. Ce serait à ce niveau, lorsque le processus neurodégénératif atteindrait la substance noire et les autres structures sous-corticales, que l'aggravation des atteintes entraînerait des symptômes plus nets faisant passer la personne atteinte du stade moteur préclinique au stade de la symptomatologie motrice pour finalement être cliniquement diagnostiquée.

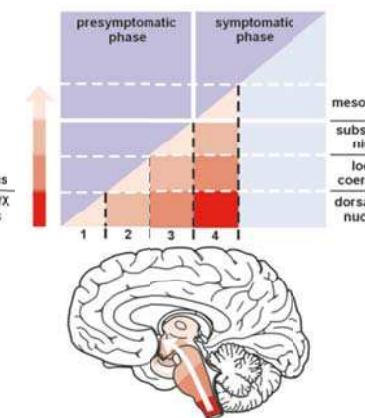
Le **quatrième stade** se caractériserait par l'atteinte des structures néo-corticales et limbiques entraînant l'émergence de symptômes neuropsychiatriques.

- Les **stades 5 et 6**, phases tardives de la maladie, correspondent à l'atteinte du néocortex qui expliquerait les désordres cognitifs (Figure 2C). Ces deux derniers stades seraient corrélés avec une extension maximale des processus neuro-dégénératifs et la présence de corps de Lewy. L'atteinte du système autonome, limbique et somato-moteur serait majeure.

A. Stades 1 et 2



B. Stades 3 et 4



C. Stades 5 et 6

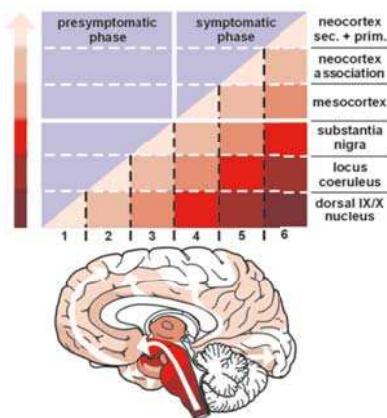


Figure 2. Progression graduelle schématique du processus neuropathologique de la maladie de Parkinson, d'après la théorie de Braak (Braak et al., 2002).

Code couleur : plus le rouge est foncé, plus la proportion de corps de Lewy est importante. Ces diagrammes représentent l'extension du processus neuropathologique en terme de sévérité (axe des abscisses): (A) pendant la phase « préclinique » (stades 1 et 2), les corps de Lewy sont retrouvés au niveau du bulbe olfactif, du système nerveux digestif, du complexe coeruleus/subcoeruleus (B) la phase « clinique » (stades 3 et 4), atteinte de la substance noire et (C) la phase « tardive » (stades 5 et 6) où les corps de Lewy sont présents au niveau du cortex cérébral.

Actuellement la théorie de Braak est toujours discutée et reste à confirmer. La principale critique de cette étude est qu'il est impossible de savoir si les patients classés dans les stades précliniques auraient développé par la suite une maladie de Parkinson.

I.A.2.b) Perte des neurones dopaminergiques de la substance noire

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative du système central, principalement caractérisée par une destruction progressive et massive des neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* de manière bilatérale (Hassler, 1938). Les neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* contiennent un pigment brunâtre, la neuromélanine. Ainsi leur perte explique la dépigmentation caractéristique de la substance noire observée à l'examen macroscopique. La dégénérescence de ces neurones

provoque une diminution des taux de dopamine au niveau du striatum, à la source des perturbations du fonctionnement des ganglions de la base. On considère que les symptômes moteurs de la maladie apparaissent lorsque la perte cellulaire au sein de la substance noire *pars compacta* est d'au moins de 50% et que la perte de dopamine au sein du striatum dépasse 75% (Riederer and Wuketich, 1976; Scherman et al., 1989; Damier et al., 1999).

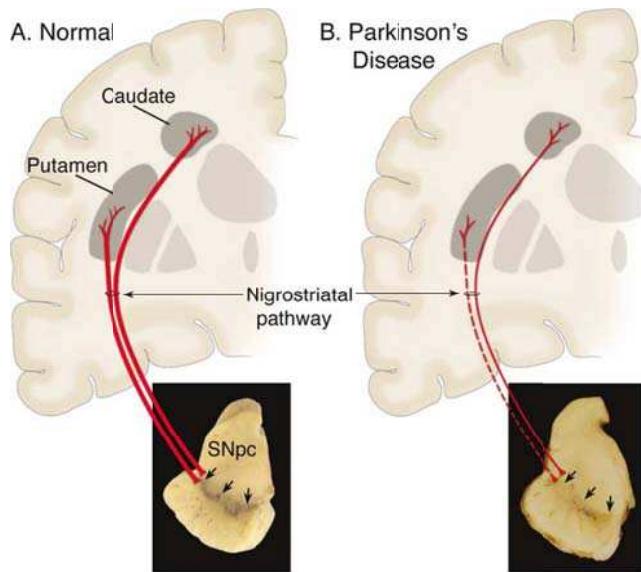


Figure 3 : Neuropathologie de la maladie de Parkinson (d'après Dauer and Przedborski, 2003).

(A) Représentation schématique de la voie nigrostriée en situation normale (en rouge). Elle est composée de neurones dopaminergiques dont les corps cellulaires sont localisés au sein de la substance noire *pars compacta* (SNpc, voir les flèches noires). Ces neurones projettent (lignes rouges pleines) au niveau de la structure d'entrée des ganglions de la base, le striatum constitué du putamen et du noyau caudé. Cette illustration représente la pigmentation normale de la substance noire *pars compacta* produite par la neuromélanine.

(B) Représentation schématique de la voie nigrostriée en situation parkinsonienne (en rouge). Dans la maladie de Parkinson, la voie nigrostriée dégénère et entraîne une perte massive des neurones dopaminergiques qui se projettent vers le putamen (ligne rouge pointillée) et une perte moins importante des neurones qui se projettent vers le noyau caudé (ligne rouge pleine). Cette illustration représente la dépigmentation en neuromélanine au niveau de la substance noire *pars compacta* due à la perte des neurones dopaminergiques.

La perte des neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée qui se projettent vers les parties « motrices » dorsolatérales du striatum est beaucoup plus massive que celle de ceux qui se projettent sur les zones plus « cognitives » ventrales (Hirsch et al., 1988) (Figure 3).

Au cours de la maladie de Parkinson, toutes les voies dopaminergiques cérébrales partant du mésencéphale sont affectées. Bien que la voie nigrostriée reste la plus atteinte, les voies méso-

limbique et méso-corticale (Javoy-Agid and Agid, 1980; Scatton et al., 1982) qui peuvent jouer un rôle dans la genèse des troubles cognitifs et de l'akinésie sont aussi touchées.

Par ailleurs, la dégénérescence neuronale n'est jamais totale, même dans la substance noire *pars compacta*, la structure la plus vulnérable, mais différents travaux suggèrent que le processus neurodégénératif est continu. La vitesse de la perte neuronale est difficile à évaluer, de même que la durée de la phase présymptomatique qui peut varier selon les auteurs de 3 à 5 ans (Fearnley and Lees, 1991; Morrish et al., 1996). Le processus neurodégénératif semble d'autant plus rapide que l'âge du début de la maladie est précoce (Scherman et al., 1989; Agid, 1991; Lang and Lozano, 1998).

I.A.2.c) Déplétion de la dopamine striatale

A la fin des années 1950, Carlsson démontre que l'hypokinésie provoquée chez des souris par la réserpine, qui diminue les concentrations striatales en dopamine, est corrigée par un traitement par la L-dopa (Carlsson et al., 1957; Carlsson et al., 1958). Ces données pousseront Ehringer et Hornykiewicz à effectuer un dosage post mortem des taux de dopamine dans le cerveau de patients parkinsoniens akinétiques (Ehringer and Hornykiewicz, 1960). Ils démontrèrent ainsi une sévère déplétion en dopamine dans le striatum. Quelques années plus tard, l'équipe de Dalsthrom et Fuxe et Andén et collaborateurs montrent que la dopamine était présente dans les terminaisons striatales des neurones de la substance noire *pars compacta* (Anden et al., 1964; Dahlstrom and Fuxe, 1964) et que les neurones à dopamine de la substance noire *pars compacta* projettent leurs axones vers le striatum. Ceci permit de faire le lien entre mort des neurones de la substance noire *pars compacta* et déplétion striatale en dopamine.

La diminution de la concentration en dopamine dans le striatum entraîne des perturbations du fonctionnement des ganglions de la base. Dans les cas les plus avancés de la maladie de Parkinson, la déplétion striatale peut atteindre 95% dans le putamen et de 50 à 80% dans le noyau caudé.

I.A.2.d) Autres altérations

La maladie de Parkinson apparaît comme une affection neurodégénérative diffuse. À la perte du système dopaminergique nigrostrié qui constitue la principale anomalie observée, s'ajoutent des altérations d'autres systèmes neuronaux. En effet, il a été observé :

- une **perte des neurones noradrénergiques** du locus coeruleus (environ 50%) (Cash et al., 1987).
- une **perte des neurones sérotoninergiques** du raphé (environ 40%) (Halliday et al., 1990a). La perte des neurones du locus coeruleus et du raphé s'accompagne d'une diminution des taux de noradrénaline et de sérotonine dans de nombreuses régions du télencéphale, expliquant en partie les troubles dépressifs et thymiques chez certains patients (Agid et al., 1990).
- une **perte des neurones cholinergiques** du noyau basal de Meynert (environ 40%) qui pourrait contribuer à une détérioration intellectuelle parfois observée au cours de la maladie, et du noyau pédonculonéopontin qui pourrait entraîner des troubles moteurs axiaux, posturaux et de la marche (Jellinger, 1991).

I.A.3) Rappels sur l'organisation anatomo-fonctionnelles des ganglions de la base

Les ganglions de la base sont impliqués dans l'orchestration harmonieuse du contrôle de la motricité, de la mémorisation et du traitement des processus cognitifs et de la régulation de l'humeur (système limbique) (Middleton and Strick, 2000). Néanmoins, les fonctions des ganglions de la base sont complexes et encore largement méconnues. Ils forment un ensemble de structures sous-corticales, qui s'inscrivent dans le contrôle extrapyramidal de la motricité. Les ganglions de la base contribuent à réguler les mouvements : leur rôle est de réaliser (phase de préparation) et de contrôler (phase d'exécution) une succession d'actions motrices planifiées (volontaires).

Les ganglions de la base ne fonctionnent pas de manière autonome, mais en relation avec d'autres structures du système nerveux central et constituent avec le cortex cérébral et le thalamus un circuit sensori-moteur « cortico-striato-thalamo-cortical » en boucle qui joue un

rôle fondamental dans la régulation du mouvement volontaire et dont le fonctionnement est modulé entre autres par les afférences dopaminergiques issues de la substance noire *pars compacta* (Parent and Hazrati, 1995a, b). Les informations en provenance des aires frontales, préfrontales et pariétales du cortex, traversent les ganglions de la base et retournent à l'aire motrice *via* le thalamus.

Au cours de ces deux dernières décennies, les connaissances acquises sur l'anatomie et les propriétés physiologiques des ganglions de la base ont permis d'élaborer un certain nombre de modèles d'organisation anatomo-fonctionnelle de ce système. Un modèle de fonctionnement normal et pathologique a été initialement élaboré par Alexander et Crutcher en 1986 avec leur modèle des voies striatales directes et indirectes, puis a été repris par Albin et coll (1989) et par DeLong (1990) dans un cadre pathologique pour expliquer l'akinésie parkinsonienne et les syndromes dyskinétiques par un déséquilibre entre ces deux voies. Actuellement, malgré de nombreuses critiques, ce modèle d'organisation fonctionnelle reste le plus utilisé.

I.A.3.a) Etat normal

La figure 4A (DeLong, 1990) décrit les principaux éléments du fonctionnement des ganglions de la base en situation normale. La « structure d'entrée » principale de l'information est le **striatum dorsal** formé de deux noyaux séparés par la capsule interne, le **noyau caudé** et le **putamen** (à noter que chez le rongeur, les deux territoires sont réunies en une seule structure, appelée néostriatum ou striatum). Le striatum reçoit massivement toutes les projections glutamatergiques corticales excitatrices. Le striatum dorsal se projette sur la substance noire, essentiellement au niveau de la *pars reticulata* (SNpr) ainsi que sur les deux segments externe et interne du **globus pallidus dorsal** (à noter que chez le primate non-humain, le globus pallidus externe correspond chez le rongeur au globus pallidus et le globus pallidus interne au noyau entopédonculaire). Ces projections sont dues aux deux populations neuronales efférentes productrices de GABA (Acide γ -aminobutyrique) qui représentent 95% des neurones striataux, les neurones épineux de taille moyenne (MSNs, medium spiny neurons) (Alexander and Crutcher, 1990).

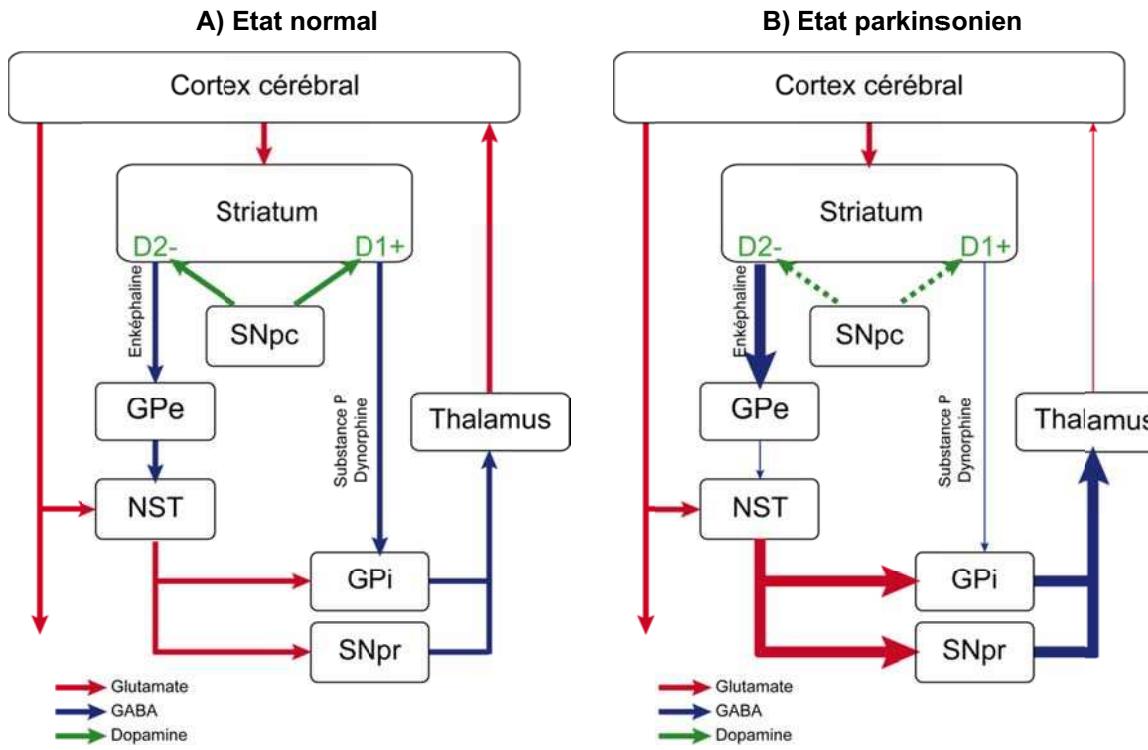


Figure 4: Schéma simplifié d'organisation des ganglions de la base, adapté de DeLong (1990).

(A) Etat normal.

(B) Etat parkinsonien.

GPe (globus pallidus externe) ; GPi (globus pallidus interne) ; NST (noyau sous thalamique) ; SNpc (substance noire *pars compacta*) ; SNpr (substance noire *pars reticulata*).

- **La voie « directe »,** a pour origine les neurones épineux exprimant avec le GABA deux neuropeptides, la substance P et la dynorphine (Bolam and Smith, 1990) et portant à leur surface des récepteurs dopaminergiques de type D1 (Alexander and Crutcher, 1990), couplés positivement à l'adénylate cyclase. Elle projette sur deux « structures de sortie » des ganglions de la base, le globus pallidus interne et la substance noire *pars reticulata*, qui à leur tour projettent sur le cortex moteur via le noyau ventral latéral du thalamus. Par ses projections directes, le striatum inhibe l'activité tonique des neurones GABAergiques de ces structures, générant une désinhibition des réseaux thalamiques et donc facilitant le mouvement.

- **La voie « indirecte »,** est composée des neurones à GABA producteurs d'enképhalines (Gerfen et al., 1990) qui portent à leur surface des récepteurs dopaminergiques de type D2 (Alexander and Crutcher, 1990), couplés négativement à l'adénylate cyclase. Elle implique

deux structures de « relais » entre le striatum et les structures de sortie. Les neurones striataux projettant sur le noyau sous-thalamique *via* le globus pallidus externe. Le noyau sous-thalamique, l'un des plus petits noyaux des ganglions de la base et la seule structure glutamatergique des ganglions de la base, projette sur le globus pallidus interne et sur la substance noire *pars reticulata*, les structures de sortie, qui eux-mêmes projettent sur le noyau ventral latéral du thalamus. En inhibant les neurones GABAergiques du globus pallidus externe, les neurones striataux-pallidaux désinhibent les neurones glutamatergiques du noyau sous-thalamique, renforçant par là même l'activité inhibitrice que les structures de sortie des ganglions de la base exercent sur leurs cibles et donc inhibant les mouvements volontaires.

Ces deux voies sont soumises à des voies de rétrocontrôle, dont la principale est **la voie dopaminergique nigrostriée**. Grâce à la mise au point des méthodes d'histofluorescence par Falk et ses collaborateurs, Fuxe et Dahlström ont pu décrire, dans les années 1960, la voie nigrostriée qui relie la substance noire au striatum (Dahlstrom and Fuxe, 1964). La substance noire est composée de deux parties : la substance noire *pars compacta* (SNpc) contenant essentiellement des somas de neurones à dopamine et la substance noire *pars reticulata* (SNpr) contenant majoritairement des fibres.

La dopamine agit sur deux types de neurones au sein du striatum :

- **Les neurones efférents** : les neurones épineux de taille moyenne, appelés ainsi en raison de la taille moyenne de leur soma (entre 10 et 20µm de diamètre) et de leur arborisation dendritique très développée portant de nombreuses épines sessiles et pédonculées, constituant les voies directes et indirectes nigrostriées (Bolam and Smith, 1990).
- **Les interneurones** dont les terminaisons nerveuses sont situées dans le striatum, représentent 5% des neurones striataux. Ils sont quelquefois plus volumineux et leurs dendrites sont lisses (neurones « aspiny » ou non épineux). Les interneurones striataux sont d'au moins quatre types différents : les interneurones contenant l'acétylcholine et les interneurones de type GABA contenant la parvalbumine, les interneurones produisant à la fois de la somatostatine et du neuropeptide Y et les interneurones contenant de la calrétinine (DiFiglia et al., 1976; Bennett and Bolam, 1994b, a; Kawaguchi et al., 1995).

On considère à ce jour que l'activation de la voie directe faciliterait les mouvements en désinhibant les neurones thalamo-corticaux, alors que l'activation de la voie indirecte inhiberait les mouvements volontaires en renforçant l'effet inhibiteur de la voie thalamo-

corticale : une balance harmonieuse entre la voie directe (activatrice) et la voie indirecte (frénatrice) serait essentielle à la modulation du mouvement et permettrait l'organisation de signaux cohérents dans les voies de sortie du système. En situation normale, l'équilibre entre les deux voies est assuré grâce au contrôle dopaminergique de la voie nigrostriée issue de la substance noire *pars compacta*. Ainsi, la perte des neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* entraîne un déséquilibre important entre les voies directe/indirecte et par conséquent est la source des troubles neurologiques liés à la perturbation des régulations extrapyramidales.

Au delà de cette fonction majeure, les différentes activités des ganglions de la base sont encore mal comprises et dépassent le cadre de cette thèse. Les ganglions de la base sont aussi impliqués dans l'apprentissage associatif (motivation et récompense), la planification, la mémoire de travail, et l'émotion (Middleton and Strick, 2000; Hikosaka et al., 2002; Pasupathy and Miller, 2005; Yin and Knowlton, 2006).

I.A.3.b) Etat parkinsonien

Dans la maladie de Parkinson, la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* entraîne des perturbations majeures du contrôle dopaminergique au niveau du striatum (Albin et al., 1989; DeLong, 1990). La figure 4B (DeLong, 1990) décrit le schéma du fonctionnement des ganglions de la base en situation pathologique chez les patients parkinsoniens.

On considère que cette dénervation dopaminergique nigrostriée a deux conséquences sur les neurones striataux efférents :

- **Sur la voie directe** : une diminution de l'inhibition du striatum sur le globus pallidus interne et sur la substance noire *pars reticulata* et donc une augmentation de leur inhibition sur le thalamus. Cette hypoactivation des neurones portant les récepteurs D1 de la voie directe a un effet inhibiteur sur le mouvement.
- **Sur la voie indirecte** : une augmentation de l'inhibition du striatum sur le globus pallidus externe, lui-même inhibant le noyau sous-thalamique qui active le globus pallidus interne et la substance noire *pars compacta*. Il en résulte une hyperactivité des neurones glutamatergiques du noyau sous-thalamique. Par conséquent, l'activation plus importante du globus pallidus externe et de la substance noire *pars reticulata* va d'autant plus inhiber le thalamus. Cette

hyperactivation des neurones portant les récepteurs D2 de la voie indirecte a aussi pour résultat une inhibition de la motricité.

En résumé, en situation « parkinsonienne », la perte de l’innervation dopaminergique serait responsable d’une diminution de réactivité des neurones de la voie directe et d’une désinhibition de la voie indirecte. Ainsi dans la maladie de Parkinson, la dénervation dopaminergique provoquerait un déséquilibre en faveur de la voie indirecte et par conséquent une inhibition de l’initiation des mouvements ou akinésie.

I.A.4) Etiologie de la maladie de Parkinson

Les causes de la mort des neurones dans la maladie de Parkinson ainsi que les mécanismes impliqués restent encore mal compris. De nombreuses hypothèses ont été avancées puis récusées : vieillissement accéléré, infection virale ou bactérienne, mécanismes (auto)-immuns. D’autres hypothèses proposent qu’un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale et un stress oxydatif (dont une des conséquences est une production de radicaux libres), jouent un rôle dans la mort neuronale dans la maladie (Schapira et al., 1990; Zhou et al., 2008; Tsang and Chung, 2009).

On considère actuellement que la mort des neurones dopaminergiques est d’origine multifactorielle avec des paramètres agissant éventuellement en synergie. En effet, la maladie de Parkinson peut avoir des causes diverses : une prédisposition génétique et des mutations, l’exposition à certaines toxines ou à des facteurs présents dans l’environnement et peut être même des risques encore inconnus. Ainsi, cette maladie pourrait être due à une prédisposition génétique rendant une personne moins résistante aux toxines extérieures.

I.A.4.a) Facteurs génétiques

La maladie de Parkinson est dans la plupart des cas une maladie sporadique. Néanmoins, depuis longtemps, l’existence de facteurs de susceptibilité génétique est envisagée. Dans 10% des cas, la notion d’un antécédent familial est retrouvée. Pour un patient malade avec un antécédent familial, le risque d’avoir des parents au premier degré atteint de la maladie est d’environ 20%. En effet, chez ces familles qui sont peu nombreuses, des mutations différentes d’une famille à une autre ont été retrouvées sur certains gènes.

Tableau 1 : Génétique de la maladie de Parkinson

TYPE	Chromosome	Gène	Transmission	Clinique	Fonction
Park 1	ch 4q21-23	α -synucléine	AD	Rare	Dans corps de Lewy
Park 2	ch 6q25	Parkine	AR	Fréquent, juvénile	Complexe ubiquitine - protéasome
Park 3	ch 2p13	?	AD	Rare	?
Park 4				idem Park 1	
Park 5	ch 4p14	UCH-L1	AD	Rare	Agrégation protéique
Park 6	ch 1p35-p36	PINK1	AR	Rare	Mitochondrie
Park 7	ch 1p36	DJ 1	AR	Rare	Détoxification des radicaux libres
Park 8	ch 12p11.2-q13.1	LRRK2	AD	Fréquent	Dans corps de Lewy
Park 9	ch 1p36	ATP13A2	AR	Atypique	Lysosome
Park 10	ch 1p32	?	AR	Atypique, début tardif	?
Park 11	ch 2q36-37	GIGYF2	AD		Signalisation de l'insuline
Park 12	ch Xq	?	?	?	?
Park 13	ch 2p13	Omi/HTRA2	?	?	Sérine-protéase
Park 14	ch 22q13.1	PLA2G6	AR	juvénile	?
Park 15	ch 22q12-q13	FBXO7	AR	?	?

AD : autosomique dominant ; AR : autosomique récessif

LRRK2 = leucine rich repeat kinase 2; PINK1 = PTEN-induced putative kinase 1

UCH-L1 = ubiquitin carboxy-terminal hydrolase

GIGYF2 = GRB10-interacting GYF protein 2

PLA2G6 = group VI phospholipase A2; GBA, b glucocerebrosidase.

Les formes familiales de la maladie de Parkinson les plus connues ont diverses origines :

- Mutation du gène de l' α -synucléine.

Des mutations localisées sur le gène de l' α -synucléine codant pour une protéine synaptique (Polymeropoulos et al., 1996; Polymeropoulos et al., 1997; Singleton et al., 2003; Farrer et al., 2004; Ki et al., 2007) (Park 1 et Park 4) sont associées à un syndrome parkinsonien à début précoce et à progression rapide. L' α -synucléine mutée ou produite en excès s'agrège en fibrilles anormales insolubles pour former les corps de Lewy et agit par un mécanisme de gain de fonction toxique.

- Dysfonctionnement du système ubiquitine-protéasome.

Dans la maladie de Parkinson, l'implication du système ubiquitine/protéasome a émergé après l'identification de différentes mutations localisées sur le gène de la parkine (Park 2) (Kitada et al., 1998) qui code pour l'enzyme E3 ubiquitine-ligase (Shimura et al., 2000) et sur le gène de l'ubiquitine carboxy-terminale hydrolase (UCH-L1) (Park 5) (Leroy et al., 1998), par perte de fonction des mécanismes de dégradation des protéines cellulaires.

- Dysfonctionnement mitochondrial.

Il apparaît que la mitochondrie joue probablement un rôle important dans les mécanismes de neurotoxicité : l'activité du complexe I de la mitochondrie est réduite chez les patients parkinsoniens (Schapira et al., 1990). Plusieurs gènes associés à des formes familiales sont impliqués dans le fonctionnement de la mitochondrie dont le gène pink1 (PTEN-induced putative kinase 1) (Park 6) qui code pour une protéine kinase mitochondriale (Valente et al., 2004).

I.A.4.b) Facteurs environnementaux

Le meilleur exemple pour étayer l'hypothèse d'une étiologie toxique environnementale de la maladie est le MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tetrahydropyridine). Cette neurotoxine a été découverte en 1982, lorsque de jeunes adultes toxicomanes californiens ont développé une maladie de Parkinson typique et sévère quelques jours seulement après s'être injectés en intraveineuse un agent hallucinogène (anologue de la méthéridine), dérivé de l'héroïne et identifié sous le nom de MPTP (Langston et al., 1983). Les symptômes étaient corrigés par la L-dopa et l'étude anatomo-pathologique a révélé une perte quasi exclusive des neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* (Langston et al., 1983; Langston et al., 1984).

Le MPTP lui-même n'est pas toxique, mais comme tout composé lipophile (Markey et al., 1984), il peut traverser la barrière hémato-encéphalique (Figure 5). Ce n'est qu'à ce moment là qu'il est métabolisé en une substance toxique active, le MPP⁺ (1-méthyl-4-phenylpyridinium), par la monoamine oxydase B (MAOB) au niveau des cellules gliales ou monoaminergiques. Le MPP⁺ est alors relargué dans l'espace extracellulaire et importé dans les neurones dopaminergiques du fait de sa haute affinité pour le transporteur de la dopamine (DAT) (Javitch et al., 1985; Mayer et al., 1986). Le MPP⁺ peut alors (i) se lier avec le

transporteur vésiculaire de monoamines 2 (VMAT2) et être séquestré dans des vésicules synaptiques (Liu et al., 1992), (ii) s'accumuler au niveau des mitochondries et bloquer le complexe I de la chaîne respiratoire (Ramsay and Singer, 1986), (ii) interagir avec des enzymes cytosoliques, spécifiquement porteuses de charges négatives (Klaidman et al., 1993). L'ensemble de ces perturbations aboutit à la formation de radicaux libres (reactive oxygen species ou ROS) (Cohen, 1984), des molécules toxiques conduisant à une diminution de la production d'ATP et ultérieurement à la mort cellulaire (Figure 5).

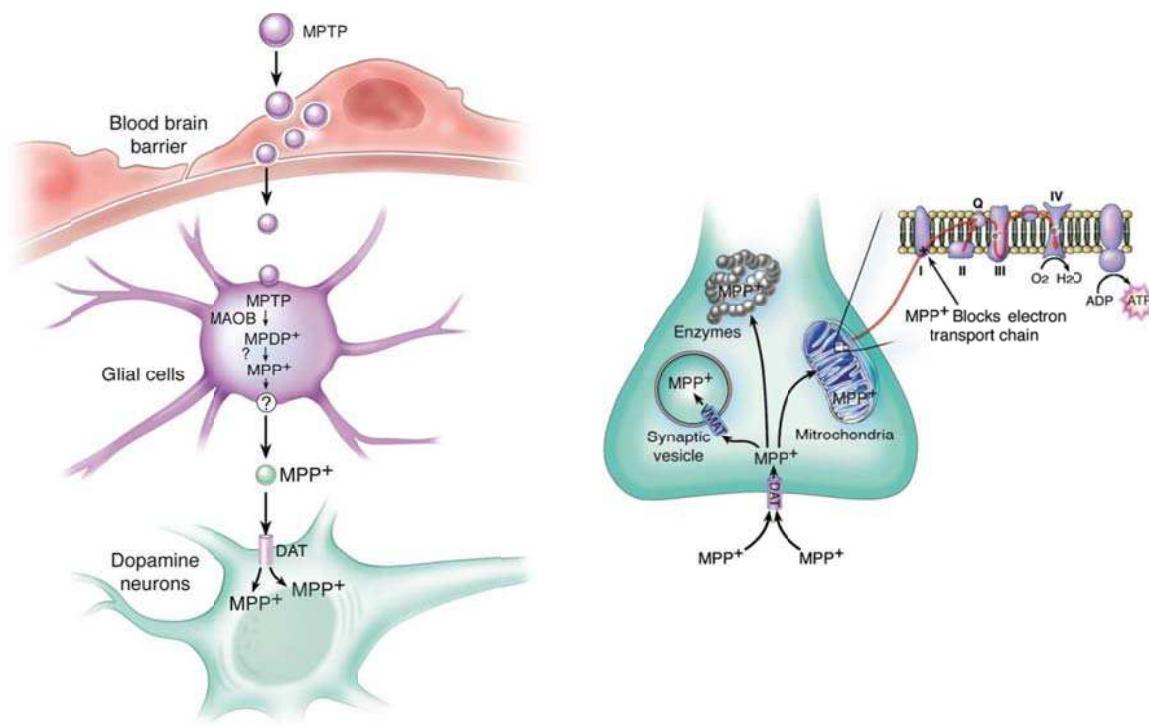


Figure 5. Représentation schématique du métabolisme du MPTP et de la voie intracellulaire du MPP⁺ suite à une administration systémique (d'après Dauer and Przedborski, 2003).

Par la suite, des études épidémiologiques ont été menées pour étayer l'hypothèse d'étiologies toxiques environnementales. Elles ont montré une plus grande prévalence de la maladie de Parkinson dans des pays fortement industrialisés, et plus précisément en milieu rural, caractérisée par une exposition importante à des pesticides (Semchuk et al., 1992; Tanner, 1992; Le Couteur et al., 1999), tels le paraquat, structurellement similaire au MPP⁺, qui est un herbicide largement utilisé et la roténone qui est également un poison mitochondrial utilisé comme insecticide et pesticide (Hatcher et al., 2008).

D'autres hypothèses d'étiologies toxiques environnementales ont été reportés : l'exposition professionnelle chronique à certains métaux comme le manganèse, pendant plus de 20 ans pourraient être un facteur risque de voir se développer un syndrome parkinsonien (Migliore and Coppede, 2009) ; la consommation de certains fruits exotiques sous forme de fruit ou d'infusion de leurs feuilles, tels que le corossol ou « pomme cannelle » présent en Guadeloupe (Caparros-Lefebvre and Elbaz, 1999; Lannuzel et al., 2006) et la noix de cycade présent dans de l'île de Guam (Cox and Sacks, 2002), provoquent un syndrome parkinsonien. Les symptômes régressent à l'arrêt de la consommation.

Cependant, jusqu'à présent, aucune toxine spécifique de type MPTP ou même aucun produit chimique fabriqué industriellement n'a été démontré comme susceptible de provoquer une maladie de Parkinson sporadique, ce qui limite la portée de ces résultats épidémiologiques.

I.A.5) Traitements de la maladie de Parkinson

Il n'existe jusqu'à présent aucun traitement curatif ni préventif agissant sur le processus de neurodégénérescence de la maladie (Goetz et al., 2005). Les traitements actuellement à disposition tentent de maîtriser et d'atténuer les troubles moteurs de la maladie.

Tout d'abord, il existe les **approches pharmacologiques** visant (i) à rétablir les niveaux de dopamine circulant avec la dopa thérapie, (ii) à stimuler directement les récepteurs dopaminergiques avec l'utilisation d'agonistes dopaminergiques et (iii) à potentialiser leurs effets en inhibant la dégradation de la dopamine résiduelle avec des inhibiteurs enzymatiques. Les stratégies thérapeutiques envisagées dépendent de la forme clinique du patient et du stade évolutif de la maladie. Il existe par ailleurs une **approche neurochirurgicale** qui consiste à stimuler intracérébralement à haute fréquence le noyau sous thalamique. D'autres traitements sont actuellement en cours d'expérimentation comme la thérapie cellulaire visant à remplacer le système dopaminergique déficient ou même le développement de traitement afin de freiner ou d'arrêter le processus neurodégénératif.

I.A.5.a) Traitements pharmacologiques

I.A.5.a.i) *L-dihydroxyphenylalanine (L-dopa) et associés*

Dans les années 1960, la découverte de la **lévo-dopa (L-dopa)** a révolutionné le traitement de la maladie de Parkinson (Carlsson et al., 1958; Birkmayer and Hornykiewicz, 1961; Cotzias et al., 1969; Rascol et al., 2000) : une administration par voie orale de la L-dopa se révélait avoir des effets spectaculaires à court terme et à long terme sur la symptomatologie parkinsonienne.

Actuellement, le traitement par la L-dopa est toujours le traitement de référence de la maladie de Parkinson. La L-dopa est le précurseur direct de la dopamine, capable de traverser la barrière hémato-encéphalique, contrairement à la dopamine. La L-dopa pénétrant dans le système nerveux central est métabolisée en dopamine dans les terminaisons restantes des neurones à dopamine, dans les neurones sérotoninergiques, dans l'endothélium des capillaires cérébraux riches en DOPA décarboxylase, dans les cellules gliales (Schwarting and Huston, 1996; Carta et al., 2007; Navailles et al., 2010).

Initialement utilisée seule, La L-dopa, administrée par voie orale, est actuellement toujours associée à un inhibiteur de la dopa décarboxylase (bensérazide ou carbidopa) qui ne franchit pas la barrière hémato-encéphalique, car elle peut être décarboxylée en périphérie et entraîner hypotension artérielle, nausées, vomissements. Cette association permet de réduire considérablement les doses de L-dopa et d'améliorer la tolérance au traitement.

Cependant, même si l'efficacité de ce traitement demeure incontestable, particulièrement durant les premiers stades de la maladie, de nombreuses complications qui peuvent être invalidantes surviennent inévitablement, ce qui rend difficile et complexe la L-dopa thérapie à long terme. Généralement, le traitement par la L-dopa comporte trois phases (Rascol et al., 2000) :

- La période dite de « **lune de miel** », pendant les premiers stades du traitement.

Juste après le diagnostic de la maladie, le traitement reposant sur la L-dopa est instauré. Les symptômes disparaissent et les patients retrouvent une qualité de vie quasiment normale. La durée de cette période varie entre 3 et 6 ans. L'évolution de la maladie est discrète et bien contrôlée par des ajustements thérapeutiques.

- Les périodes de **fluctuations et complications motrices**.

Ces périodes sont variables dans ses formes et ses délais selon les patients ou d'une maladie de Parkinson à l'autre. Ces fluctuations imprévisibles des performances motrices apparaissent chez 60% des patients après environ six ans de traitement et chez 90% des cas après 10 ans. (cf ci-dessous)

- **La perte d'efficacité de la L-dopa.**

La dernière période, qui est la plus handicapante, correspond à la perte quasi-totale de l'efficacité du traitement à la L-dopa, ce qui conduit à l'apparition de signes non L-dopa sensibles. L'efficacité thérapeutique de la L-dopa s'estompe avec la progression de la maladie.

La L-dopa reste le traitement de référence le plus efficace à ce jour, mais au vu de ses nombreux effets négatifs, un débat sur d'éventuels effets délétères de la L-dopa a vu le jour et a poussé à retarder le plus possible le début de la prise de L-dopa.

I.A.5.a.ii) Autres traitements pharmacologiques

Historiquement, le premier traitement pharmacologique **anticholinergique** avant l'avènement de la L-dopa a été introduit dès 1867 par Charcot qui avait observé l'effet bénéfique de la prise d'atropine, extrait de la belladone dans la maladie de Parkinson, en particulier sur la rigidité et les tremblements (Fahn, 1998). Mais à cette époque, le mécanisme et le niveau d'action des anticholinergiques étaient totalement inconnus. L'utilisation de traitement anticholinergique vise à réduire l'hyperactivité cholinergique striatale, consécutive à la perte de l'influence inhibitrice dopaminergique exercée par le substantia nigra. Les dérivés synthétiques de l'atropine (trihexyphénidyle, bipéridène, tropatépine), mieux tolérés sont apparus dans les années cinquante et ont constitué la base du traitement pharmacologique de la maladie de Parkinson avant la découverte de la L-dopa. Actuellement, leur utilisation est de moins en moins fréquente car de nombreux effets indésirables sont liés à ce traitement comme sécheresse buccale, troubles de l'accommodation, rétention urinaire, constipation, glaucome, troubles mnésiques, confusion et hallucinations. Cependant, ils restent intéressants à utiliser en association à la L-dopa, pour les formes de la maladie où les tremblements sont prédominants.

De nouveaux traitements sont apparus qui remplacent la L-dopa ou prolongent son effet thérapeutique :

- l'utilisation d'**agonistes des récepteurs dopaminergiques** (ropinirole, apomorphine...) pour les stimuler directement. Ils sont prescrits en première intention, au début de la maladie. Néanmoins, ces traitements en monothérapie sont moins efficaces que la L-dopa : le dosage administré est relativement faible en raison des effets secondaires importants. Pour cela, il est nécessaire de les associer à la L-dopa.
- l'utilisation d'**inhibiteurs de la dégradation enzymatique de la L-dopa** pour prolonger son effet thérapeutique : des inhibiteurs de la catéchol-O-méthyl-transférase (entacapone) (Myllyla et al., 2001; Poewe et al., 2002; Brooks and Sagar, 2003; Fenelon et al., 2003) ou des inhibiteurs de la monoamine oxydase B (sélégiline, rasagiline) (Parkinson-Study-Group, 2002; Shoulson et al., 2002).

I.A.5.b) Traitement neurochirurgical : la stimulation cérébrale à haute fréquence

Les limites des traitements pharmacologiques de la maladie de Parkinson à long terme et les progrès de la recherche durant les vingt dernières années expliquent le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques comme la neurostimulation du noyau sous-thalamique qui permet de bloquer son hyperactivité.

Dans la maladie de Parkinson, la perte des neurones à dopamine entraîne une hyperactivité des neurones glutamatergiques du noyau sous-thalamique tant au niveau électrophysiologique (Bergman et al., 1994; Kreiss et al., 1997) que métabolique (Mitchell et al., 1985a; Vila et al., 1996). Sur la base de ces travaux, il a été ainsi proposé qu'une inhibition de l'hyperactivité neuronale du noyau sous-thalamique pourrait être un traitement symptomatique efficace.

Partant de cette hypothèse, au début des années 1990, différentes études (Bergman et al., 1990; Aziz et al., 1991) ont montré l'efficacité de la lésion du noyau sous-thalamique réalisée dans des modèles primates non-humains de la maladie de Parkinson. Cette lésion induit effectivement une amélioration des troubles moteurs de type parkinsonien, mais avec une apparition de mouvements involontaires des membres contralatéraux à cette lésion. Ces approches lésionnelles invasives entraînaient des effets indésirables importants de manière irréversible, ce qui écartait toute application thérapeutique aux patients parkinsoniens.

Afin d'éviter l'apparition des effets secondaires, une nouvelle approche a été mise au point en 1993 chez le singe parkinsonien, la stimulation à haute fréquence (Benazzouz et al., 1993) qui provoque un blocage de l'activité électrique du noyau sous-thalamique. Sur la base de ces travaux, cette stratégie a été transférée à l'homme (Pollak et al., 1993; Limousin et al., 1998). La stimulation à haute fréquence s'effectue à l'aide d'électrodes implantées bilatéralement dans les noyaux sous-thalamique, et connectées à un stimulateur avec un voltage réglable placé dans la région sous-claviculaire, permettant d'augmenter l'inhibition avec la progression de la maladie. L'inhibition de l'hyperactivité du noyau sous-thalamique provoque la levée du tonus inhibiteur exagéré exercé sur le thalamus et par conséquent, induit une activation des aires motrices corticales à l'origine du mouvement.

Cette approche est réversible et améliore spectaculairement les symptômes moteurs majeurs de la maladie de Parkinson, sans fluctuation (Benazzouz et al., 1996), rendant leur autonomie aux patients dans leurs activités quotidiennes (Limousin et al., 1995; Limousin et al., 1998). Une étude, portée sur 49 malades opérés et suivis pendant cinq ans, a montré que la stimulation à haute fréquence du noyau sous-thalamique induit une amélioration des tremblements de repos (75%), de la rigidité (71%) et de l'akinésie (49%) (Krack et al., 2003), en absence de tout traitement pharmacologique associé. De plus, cette chirurgie, vivement conseillée aujourd'hui permet de réduire considérablement la médication antiparkinsonienne (d'environ 50% à 80% de la dose journalière), voire même permet l'arrêt total des prises chez certains patients (Vingerhoets et al., 2002). Ainsi, *via* la diminution de la dopathérapie, il est possible de réduire les dyskinésies chez les patients (Russmann et al., 2004).

Le noyau sous-thalamique est maintenant considéré comme une cible privilégiée dans les stratégies thérapeutiques de la maladie de Parkinson. Cependant, même si la stimulation cérébrale profonde présente des avantages cliniques importants, notamment en réduisant les effets secondaires, elle présente l'inconvénient de nécessiter l'implantation d'appareils de stimulation à demeure, sollicitant des réglages fréquents pour une utilisation optimale, amenant un certain risque infectieux ainsi que des facteurs d'inclusions restrictifs pour les patients.

L'évolution dans le temps de la maladie est impossible à prédire, elle dépend du patient, de la forme clinique, de la réponse aux traitements et de la présence de pathologies associées. La prise en charge des patients, les traitements pharmacologiques et chirurgicaux ont permis d'améliorer considérablement leur qualité de vie ainsi que leur autonomie durant l'évolution de la maladie.

I.B.) Les dyskinésies L-dopa induites et les récepteurs dopaminergiques

La L-dopa constitue actuellement le médicament le plus utilisé dans la maladie de Parkinson (Fahn et al., 2004). Mais, après quelques années, ce traitement reste néanmoins très insatisfaisant en raison de ses effets secondaires imprévisibles importants évoqués précédemment, en particulier les fluctuations de la réponse au traitement et les dyskinésies (Rascol et al., 2000). Les dyskinésies représentent un problème majeur chez ces patients parkinsoniens traités, car même s'ils voient diminuer leurs symptômes parkinsoniens, ils connaissent de plus en plus de difficultés dans leur vie quotidienne. Les fluctuations et les dyskinésies sont influencées par l'âge du début de la maladie : elles sont beaucoup plus précoces chez les patients plus jeunes.

I.B.1) Effets secondaires des traitements de la maladie de Parkinson

I.B.1.a) Complications motrices

I.B.1.a.i) Fluctuations motrices

Au cours de l'évolution de la maladie de Parkinson, des fluctuations des performances motrices apparaissent chez 95% des patients après 15 ans d'évolution de la maladie (Hely et al., 2005). Les fluctuations motrices sont définies par la réapparition intermittente des symptômes moteurs parkinsoniens. Plus précisément, elles correspondent à des modifications de l'état parkinsonien au cours du temps avec oscillations entre un « état OFF », où les signes de la maladie sont particulièrement sévères, et un « état ON », où ces signes sont atténués voire totalement abolis. Ces oscillations motrices suivent les taux sanguins et cérébraux de L-dopa et peuvent par conséquent être prévisibles sur des bases cliniques telles que la lenteur du déblocage matinal, la dystonie du petit matin ou les détériorations de fin de dose. Avec l'évolution de la maladie, ces fluctuations sont de plus en plus fréquentes et sévères et tendent

à devenir de moins en moins prévisibles, aboutissant aux phénomènes « ON-OFF » au cours desquels le patient oscille constamment entre des périodes de blocages et des périodes de dyskinésies, sans qu'un état satisfaisant ne puisse plus être obtenu, ou seulement pour de très courtes durées.

Ces fluctuations sont invalidantes en raison de l'instabilité motrice qu'elles entraînent. En effet, elles regroupent un ralentissement du mouvement, de la marche, l'apparition d'un tremblement, la rigidité, les dystonies spontanées des membres du sujet jeune, l'akinésie paradoxale, l'akathisie, les dystonies oro-faciales.

L'origine de ces fluctuations motrices est multifactorielle (Widnell, 2005). Néanmoins, on considère qu'elles sont la conséquence de la perte progressive de la capacité du système dopaminergique nigrostrié à stocker la L-dopa dans des vésicules synaptiques et à la convertir en dopamine. Durant « la période de lune de miel », les neurones dopaminergiques encore fonctionnels peuvent assurer ce rôle. A ce stade, la prise de L-dopa produit un bénéfice stable. Lorsqu'un seuil critique de perte neuronale est atteint, la fonction de stockage ne peut plus être assurée de manière efficace et la L-dopa ne peut plus être convertie en dopamine par les neurones dopaminergiques. Par conséquent, la L-dopa est convertie principalement dans les neurones sérotoninergiques (Carta et al., 2007; Navailles et al., 2010). La stimulation dopaminergique devient directement dépendante de la manière dont la L-dopa est délivrée au striatum et les fluctuations motrices vont suivre les variations des taux plasmatiques et cérébraux de L-dopa.

I.B.1.a.ii) Les dyskinésies

Toutes aussi fréquentes que les fluctuations motrices auxquelles elles sont intimement liées, les dyskinésies et leur physiopathologie sont différentes, même si leur survenue est également rythmée par les taux sanguins de L-dopa (Figure 6).

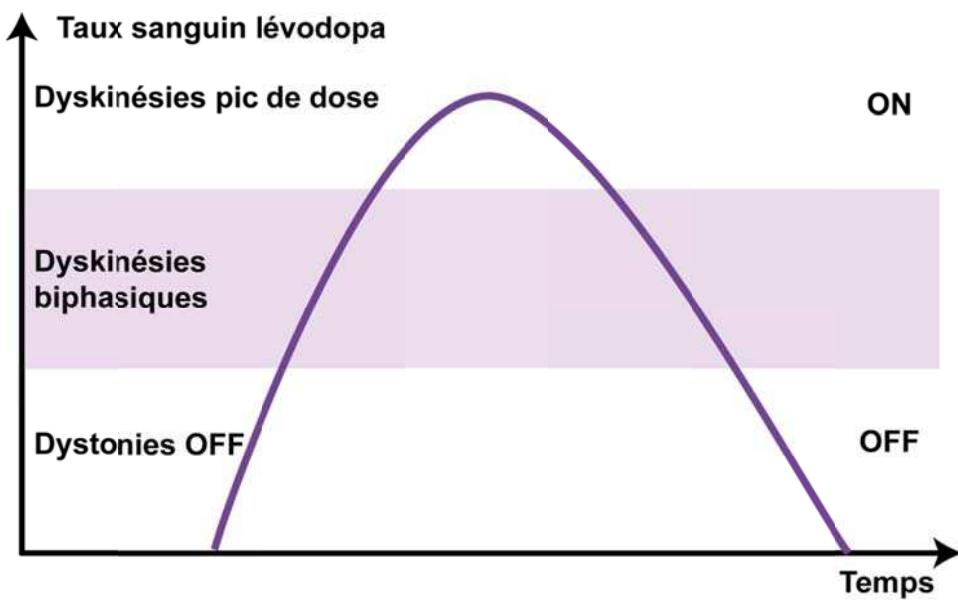


Figure 6 : Cinétique et effet d'une prise de L-dopa.

Les dyskinésies sont aussi fortement majorées par les émotions, le stress et la fatigue. Elles peuvent être différencierées en sous trois catégories de mouvements involontaires anormaux:

- *Les dystonies de phase « off » :*

Elles sont également appelées dystonies du petit matin ou « early morning dystonia », car elles apparaissent au lit dès le réveil ou le lever, mais peuvent récidiver au cours de la journée. Elles sont observées chez 30% des patients environ traités par la L-dopa.

Les dystonies de phase « off » sont caractérisées par une posture dystonique fixée pouvant être douloureuse, affectant de préférence les membres inférieurs sous la forme d'une extension du gros orteil, d'une flexion des orteils, du pied en varus équin. Elles atteignent plus rarement les membres supérieurs. Elles touchent généralement le pied le plus atteint mais elles peuvent aussi être bilatérales. Cependant, elles peuvent disparaître de façon spontanée, même en l'absence de toute prise médicamenteuse (Lees et al., 1977).

- *Les dyskinésies biphasiques ou dyskinésies de début et fin de dose :*

Elles surviennent un quart d'heure à une demi-heure après la prise du traitement et réapparaissent en fin de dose. Elles apparaissent donc lors de l'augmentation ou à la décroissance du taux sanguin de L-dopa. Elles affectent préférentiellement le membre inférieur, du côté le plus sévèrement atteint, mais peuvent s'étendre à l'ensemble de

l'hémicorps, voire du tronc. Il s'agit plus principalement d'une dystonie qui est très douloureuse et invalidante, et qui consiste à une torsion de la cheville, une rotation interne de la hanche, une extension de la jambe. En début de dose, elles sont généralement brèves mais intenses, de l'ordre de quelques minutes, en revanche, en fin de dose elles sont plus prolongées mais moins intenses (Nutt, 1990; Luquin et al., 1992).

- *Les dyskinésies de milieu de dose :*

Les dyskinésies de milieu de dose sont les plus fréquentes. Elles surviennent lorsque la symptomatologie parkinsonienne est réduite au minimum, bien contrôlée par le traitement et sont relativement bien tolérées par le patient. Elles sont souvent diffuses et prédominent aux membres supérieurs, pouvant affecter la face, le cou mais prédominant sur l'hémicorps le plus sévèrement atteint par la maladie. Elles peuvent être présentes au repos mais sont surtout observées lors du mouvement volontaire ou lors de tâches attentionnelles. Elles sont de type choréique essentiellement. La gêne fonctionnelle liée à leur présence reste souvent modérée et parfois les patients ne sont pas conscients de leur existence (Zimmerman et al., 1994).

L'apparition des dyskinésies au cours de l'évolution de la maladie de Parkinson représente un handicap majeur pour la vie quotidienne et les activités élémentaires des patients.

I.B.1.b) Effets non moteurs

Les fluctuations d'efficacité du traitement ne sont pas exclusivement motrices. Elles peuvent également se caractériser par le développement d'un cortège de symptômes non moteurs, en grande partie induits par la dégénérescence de structures cérébrales non dopaminergiques. Elles peuvent prendre de multiples aspects en fonction du patient et du stade évolutif de la maladie. Ces symptômes non moteurs sont réfractaires à la substitution dopaminergique, voire même exacerbés par les traitements dopaminergiques.

Le traitement par la L-dopa ne corrige pas certains symptômes non moteurs de la maladie de Parkinson avancée, notamment les troubles du sommeil (Barraud et Ghorayeb, en préparation) les performances cognitives (Schneider et al., 1994; Schneider et al., 1998) et les troubles intestinaux (Lebouvier et al., 2009) et en induit d'autres comme par exemple le syndrome de dysrégulation dopaminergique qui regroupe l'ensemble de troubles comportementaux provoqués par les traitements dopaminergiques : l'addiction au traitement

dopaminergique, le jeu pathologique, l'hypersexualité, les achats compulsifs, des compulsions alimentaires (la prévalence de ces troubles varie entre 3 et 8% environ), et le punding (comportements répétitifs sans but) est beaucoup plus variable et varie entre 1,5 et 14% (Evans et al., 2004; Voon et al., 2006; Weintraub et al., 2006; Miyasaki et al., 2007; Voon et al., 2007). De nombreux facteurs de risque de survenue d'un syndrome de dysrégulation dopaminergique ont été identifiés : le sexe masculin, un âge de début précoce, une dose quotidienne élevée de traitement dopaminergique, un état dépressif, une consommation régulière d'alcool et un tempérament impulsif, dominé par la recherche incessante de nouveautés (Voon et al., 2006). Ce syndrome serait dû à un dysfonctionnement de la voie dopaminergique méso-corticolimbique, impliquée dans le circuit de la récompense (Evans et al., 2006; Borg and Bayreuther, 2008).

Le traitement de la maladie de Parkinson à un stade évolutif avancé est donc complexe et nécessite la connaissance élargie des multiples manifestations motrices et non motrices. De plus, il doit pouvoir être modulé et est spécifique de chaque patient.

I.B.1.c) Les traitements antidyskinétiques

A ce jour, il n'existe toujours pas de traitement efficace des dyskinésies L-dopa induites. Il existe seulement des stratégies qui repoussent au maximum leur apparition. La première a pour but de retarder au maximum l'exposition à la L-dopa par un traitement à base d'agonistes dopaminergiques : c'est un traitement qui au cours de la phase initiale de maladie de Parkinson peut être administré seul ou en association avec la L-dopa. La deuxième stratégie tend à stabiliser les taux sanguins de L-dopa en la remplaçant par des formes retard ou en réduisant sa dégradation : c'est un traitement qui comme les traitements dopaminergiques, s'effectue pendant la phase initiale de la maladie et associe la L-dopa avec des inhibiteurs de la catéchol-O-méthyl-transférase (entacapone) (Myllyla et al., 2001; Poewe et al., 2002; Brooks and Sagar, 2003; Fenelon et al., 2003) ou d'inhibiteurs de la monoamine oxydase B (sélégiline, rasagiline) (Parkinson-Study-Group, 2002; Shoulson et al., 2002). La troisième est basée sur la seule molécule anti-dyskinétique disponible, l'amantadine (Verhagen Metman et al., 1998). Le mode d'action de cette molécule est encore mal connu : elle stimulerait directement des récepteurs dopaminergiques, elle inhiberait la recapture de la dopamine et bloquerait les récepteurs glutamatergiques de type N-méthyl-D-Aspartate (NMDA) (Stoof et al., 1992). Néanmoins, cette molécule présente une efficacité limitée et est

source de nombreux effets secondaires psychogéniques indésirables. Enfin, en dernier recours, lorsque ces dernières approches n'ont plus d'effets, une intervention neurochirurgicale est proposée telle que la stimulation profonde du noyau sous-thalamique (Benazzouz et al., 1993; Pollak et al., 1993; Limousin et al., 1998).

I.B.2) Les récepteurs dopaminergiques dans les ganglions de la base

I.B.2.a) Généralités

La présence de la dopamine dans le cerveau a été découverte dès la fin des années 1930, mais elle était considérée exclusivement comme un simple intermédiaire métabolique de la voie de biosynthèse de la noradrénaline (Blaschko, 1939). Elle n'a été désignée comme neurotransmetteur à part entière que seulement vingt ans plus tard (Montagu, 1957), et rapidement impliquée dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson (Carlsson, 1959; Ehringer and Hornykiewicz, 1960). Les recherches ultérieures ont non seulement amplement démontré ce rôle, mais ont hissé la dopamine au premier rang des neurotransmetteurs, eu égard à la diversité et à l'importance des fonctions qu'elle contrôle. En effet, il a été largement établi que la dopamine est un neurotransmetteur qui participe à un grand nombre de fonctions physiologiques du système nerveux comme la mémoire (Packard and White, 1991; Everitt and Robbins, 1997), le plaisir et la récompense (Wise, 1978; Schultz, 1997), la perception sensorielle (répine et bulbe olfactif), la régulation de certaines hormones hypophysaires (Pivonello et al., 2007), la thermorégulation (Missale et al., 1998) ou la motricité (Carlsson, 1959). La dopamine est très largement distribuée dans le système nerveux central des vertébrés, bien que seulement 0,3% des cellules cérébrales soient capables de la synthétiser.

I.B.2.a.i) Voie de synthèse de la dopamine

La dopamine est un membre de la famille des catécholamines avec l'adrénaline et la noradrénaline. La dopamine est ainsi synthétisée par une voie métabolique commune avec l'adrénaline et la noradrénaline.

La voie de biosynthèse principale de la dopamine s'effectue à partir de la tyrosine, captée à partir du milieu extracellulaire, transformée en L-dihydroxyphénylalanine (L-dopa) par la tyrosine hydroxylase (TH) (Figure 7). La L-dopa est ensuite transformée en dopamine par la

décarboxylase des acides aminés aromatiques (AADC). La dopamine synthétisée peut ensuite être stockée dans le réticulum endoplasmique lisse ou transportée dans des vésicules jusqu'aux boutons synaptiques *via* le transporteur spécifique des monoamines (VMAT). Après libération, la dopamine se fixe sur ses récepteurs et est à son tour recaptée à partir du milieu extracellulaire *via* le transporteur membranaire à la dopamine (DAT, dopamine transporter) par le neurone présynaptique ou *via* les astrocytes. De l'efficacité de la recapture dépend la durée d'action de la dopamine dans la fente synaptique et sa diffusion extrasynaptique comme en témoignent l'efficacité psychostimulante des molécules bloquant l'action du transporteur membranaire (Carboni et al., 1989; Garris et al., 1994; Nakachi et al., 1995; Suaud-Chagny et al., 1995) et l'hyperdopaminergie constitutive des souris knock-out pour le transporteur (Giros et al., 1996). La dopamine est ensuite soit (i) recyclée (inactivation non-catabolisante) soit (ii) catabolisée à la fois dans l'espace extracellulaire par la catécholamine-O-méthyl-transférase (COMT) et intracellulaire par l'enzyme mitochondriale, la monoamine oxydase B (MAO-B) (inactivation catabolisante).

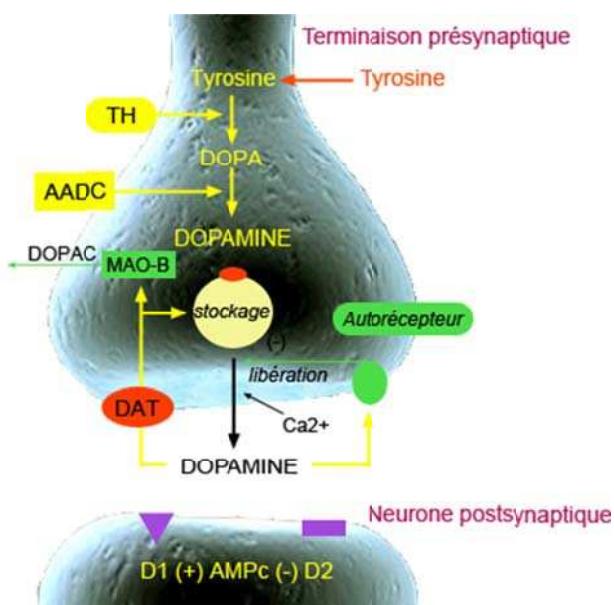


Figure 7 : Représentation schématique de la synapse dopaminergique.

TH = Tyrosine hydroxylase ; AADC = Décarboxylase des acides aminés aromatiques, MAO-B = Monoamine oxydase B ; DOPA = L-dihydroxyphénylalanine ; DOPAC = Acide dihydroxyphényleacétique.

I.B.2.a.ii) Voies dopaminergiques

Les neurones dopaminergiques ont pu être localisés initialement grâce aux techniques d'histofluorescence des monoamines(Dahlstrom and Fuxe, 1964). Leur localisation et leur systématisation ont ensuite largement été explorées par les approches d'immunohistochimie et d'hybridation *in situ* (Bjorklund and Dunnett, 2007).

Ces techniques permettant d'identifier les circuits utilisant la dopamine et de localiser leurs récepteurs ont permis de distinguer quatre voies dopaminergiques majeures dans le cerveau (Figure 8) :

- La **voie méso-limbique** part de l'aire tegmentale ventrale et innerve plusieurs structures du système limbique dont le noyau accumbens (striatum ventral). Ce faisceau dopaminergique est associé aux circuits de la récompense. Cette voie est importante pour la mémoire et la motivation de nos comportements. Elle est principalement mise en cause dans les phénomènes d'addiction et notamment la dépendance à la nicotine (Wise, 1978) et aux opiacés (Nestler, 2005). Ainsi, en bloquant ce faisceau dopaminergique, les antipsychotiques réduiraient les émotions intenses provoquées par la schizophrénie, par exemple (van Os and Kapur, 2009).
- La **voie méso-corticale** part aussi de l'aire tegmentale mais innerve le cortex frontal et les structures avoisinantes. Cette voie joue un rôle dans les émotions. Certains travaux suggèrent fortement qu'un dysfonctionnement de cette voie pourrait être à l'origine de certains symptômes de la schizophrénie, comme les hallucinations (van Os and Kapur, 2009) et des troubles cognitifs. Le blocage de cette voie dopaminergique avec des antagonistes dopaminergiques, des neuroleptiques, réduit les délires psychotiques, mais également le fonctionnement global des lobes frontaux.
- La **voie nigrostriée** projette ses axones issus de la substance noire *pars compacta* au striatum (noyau caudé et putamen). Cette voie est impliquée dans le contrôle moteur. La dégénérescence de ces neurones provoque la maladie de Parkinson (Braak et al., 2003).
- La **voie tubéro-infundibulaire** projette de l'hypothalamus vers l'éminence médiane et contrôle l'adénohypophyse. Elle influence la sécrétion de certaines hormones comme la prolactine.

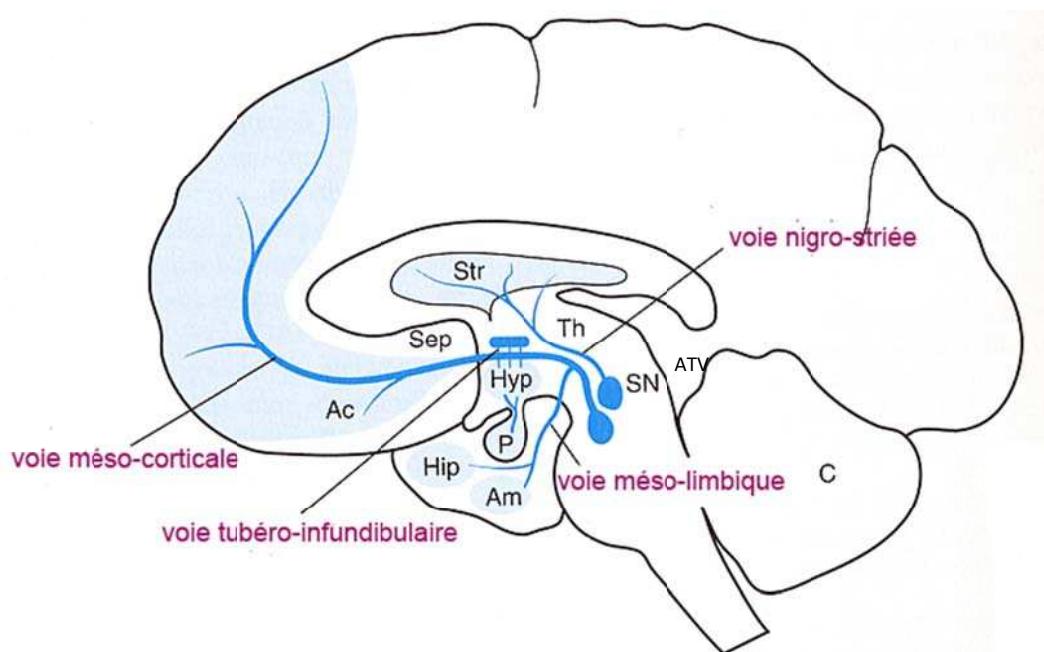


Figure 8 : Représentation schématique des quatre voies dopaminergiques.

Les voies méso-limbique et méso-corticale partent de l'aire tegmentale ventrale et innervent respectivement le noyau accumbens et le cortex frontal. La voie nigro-striée projette de la substance noire *pars compacta* au striatum. La voie tubéro-infundibulaire projette de l'hypothalamus à l'éminence médiane.

Str = striatum ; Th = Thalamus ; SN=Substance noire ; ATV = Aire tegmentale ventrale ; C=cortex ; Am = Amygdale ; Ac = noyau accumbens ; Sep = noyau du septum latéral, Hyp = Hypothalamus ; Hip = Hippocampe ; P = Hypophyse.

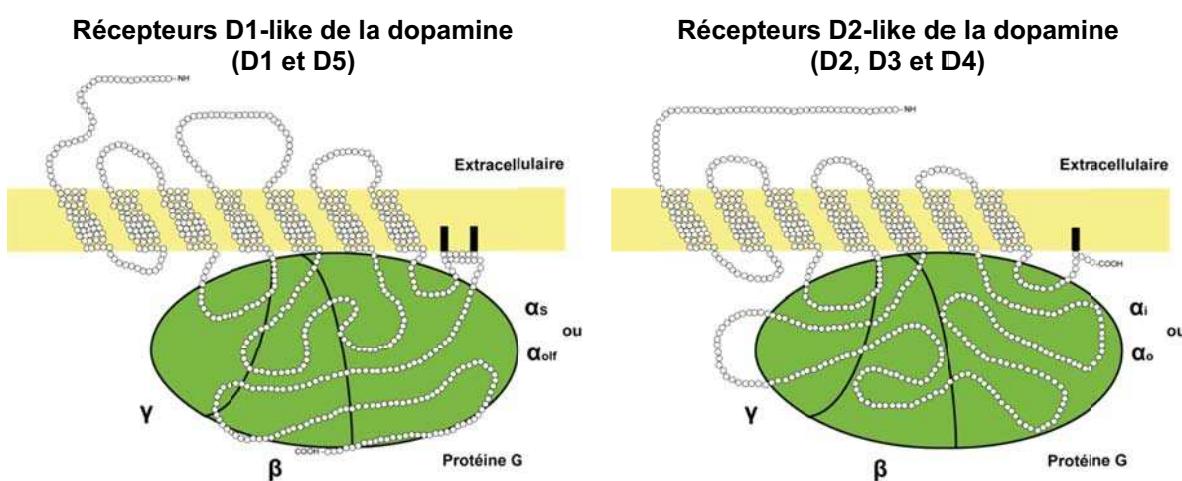
I.B.2.b) Rappels sur les caractéristiques et la structure des récepteurs de la dopamine

L'action de la dopamine dépend de sa fixation à différents sous-types de récepteurs membranaires qui appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G et se répartissent en deux classes nommées D1-like et D2-like.

La première identification pharmacologique des récepteurs dopaminergiques a été faite par Spano et ses collaborateurs en 1978. Initialement, des études pharmacologiques et biochimiques ont permis de classer les deux-sous types de récepteurs D1 et D2 selon leur effet intracellulaire activateur ou inhibiteur de l'adénylate cyclase respectivement (Kebabian and Calne, 1979).

Les récepteurs de type D1-like sont capables d'activer l'adénylate cyclase et permettre l'accumulation d'AMPc. En revanche, les récepteurs de type D2-like sont couplés

négativement à l'adénylate cyclase. Au début des années 1990, grâce aux méthodologies de clonage de gènes, cinq sous-types de récepteurs ont pu être caractérisés : D1, D2, D3, D4 et D5 (chez l'homme et son équivalent D1B chez les rongeurs) (Bunzow et al., 1988; Dearry et al., 1990; Monsma et al., 1990; Sokoloff et al., 1990; Zhou et al., 1990; Sunahara et al., 1991; Van Tol et al., 1991). L'identification de l'ADN complémentaire de ces cinq sous-types de récepteurs a montré une forte homologie des séquences transmembranaires entre d'une part les récepteurs D1 et D5 (Sunahara et al., 1991), formant ainsi la famille de type D1 et d'autre part des récepteurs D2, D3 et D4 (Missale et al., 1998) rassemblés alors dans la famille de type D2 (Figure 9).



Les principales voies de signalisation cellulaires

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - Activation de l'adénylate cyclase - Activation de la phospholipase C - Augmentation de l'entrée de Ca^{2+} - Inhibition de l'échangeur Na^+/H^+ | <ul style="list-style-type: none"> - Inhibition de l'adénylate cyclase - Activation de la sortie de K^+ - Inhibition de l'entrée de Ca^{2+} - Activation de l'ATPase Na^+/K^+ dépendante |
|---|---|

L'organisation génique

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - Pas d'introns dans la région codante | <ul style="list-style-type: none"> - Plusieurs introns dans la région codante - Variantes par épissage alternatif |
|--|---|

Figure 9 : Représentation schématique de la structure des récepteurs D1-like et D2-like à la dopamine.

Les principales caractéristiques du couplage aux protéines G et l'organisation génique de chacune des classes de récepteurs sont indiquées ici.

- **La famille D1**, dont la partie codante des gènes ne présente pas d'introns comprend les récepteurs D1 et D5. Cette classe est définie comme étant capable d'activer l'adénylate cyclase et permettre l'accumulation d'AMPc. La dopamine présente environ dix fois plus d'affinité pour le récepteur D5 que pour le D1.

- **La famille D2**, dont la partie codante des gènes possède des introns susceptibles de produire des variants par épissage alternatif, comprend les récepteurs D2, D3 et D4. Deux isoformes issues du récepteur D2 ont été identifiées : la forme longue D2L et la forme courte D2S (Dal Toso et al., 1989). Cette classe est définie comme étant capable d'inhiber l'adénylate cyclase. La région codante du gène du récepteur D2 possède 6 introns (Giros et al., 1989; Grandy et al., 1989; Monsma et al., 1989), celle du récepteur D3 possède 5 introns (Sokoloff et al., 1990) et celle du récepteur D4 en possède 3 (Van Tol et al., 1991). La dopamine présente environ vingt fois plus d'affinité pour les récepteurs D3 et D4 que pour le récepteur D2.

Ces récepteurs sont des récepteurs métabotropiques à sept hélices hydrophobes transmembranaires, qui sont très bien conservés entre les espèces. Des résidus hautement conservés au niveau des hélices transmembranaires 2, 3 5 et 6 participent à la liaison de la dopamine. Les régions intra et extracellulaires sont beaucoup plus variables. La partie N-terminale possède un nombre similaire d'acides aminés dans tous les sous-types de récepteurs. En revanche, des différences se trouvent dans le nombre de sites de N-glycosylation. La partie C-terminale est environ sept fois plus grande chez les récepteurs de la famille D1 par rapport aux membres de la famille D2. Cette région est riche en résidus sérine et thréonine, des sites potentiels de phosphorylation, et contient un résidu cystéine qui est conservé dans tous les récepteurs couplés aux protéines G.

Les récepteurs de type D1-like ont une longue extrémité C-terminale cytoplasmique et une troisième boucle intracytoplasmique courte. A l'opposé, les récepteurs de type D2-like possèdent une extrémité C-terminale très courte et une troisième boucle intracytoplasmique longue. Ces deux régions participent à un grand nombre de régulations de l'activité du récepteur, la plus importante étant le couplage aux protéines G : les récepteurs de la classe D1 sont préférentiellement associés à la sous-unité $G\alpha_s$ des protéines G, alors que les récepteurs de la classe D2 sont associés aux protéines $G\alpha_i/G\alpha_0$.

I.B.2.c) Voies de signalisation

Les protéines G représentent les principaux effecteurs des récepteurs couplés aux protéines G et répondent toutes au même mécanisme d'activation (Figure 10).

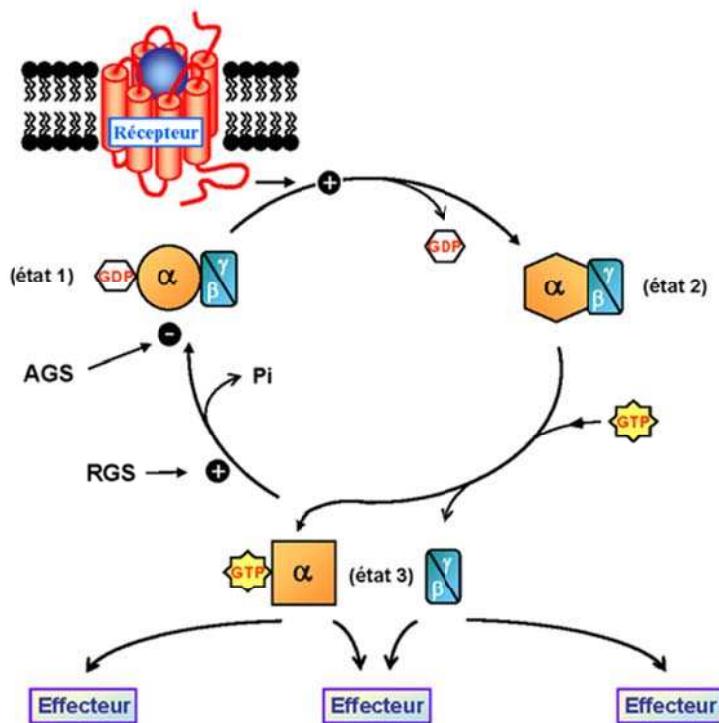


Figure 10 : Cycle d'activation des protéines G.

Brièvement, à l'état inactif, la protéine G est constituée de trois sous-unités : G α , G β et G γ (état 1). La sous-unité G α se lie à une molécule de guanosine diphosphate (GDP) au niveau de son domaine GTPase. L'activation du récepteur par son agoniste entraîne des modifications structurales qui favorisent le couplage du récepteur à la protéine G. L'affinité de la sous-unité G α pour le GDP est diminuée, ainsi le GDP se dissocie (Gilman, 1987) (état 2). L'état transitoire qui suit, bien qu'instable, n'en reste pas moins un état de haute affinité pour le récepteur. La fixation du GTP, présent à de hautes concentrations, au niveau de la sous-unité G α « vide » achève cette première phase d'activation (état 3). La conséquence majeure de l'échange GDP/GTP semble être une dissociation du complexe hétérotrimérique : G α -GTP et G $\beta\gamma$ (Neer, 1995). Les sous-unités ainsi dissociées activent différents effecteurs spécifiques tels que l'adénylate cyclase (AC) et la phospholipase C (PLC). Pour clôturer le cycle, le GTP est déphosphorylé en GDP par l'action d'une RGS (Regulator of G-protein signaling), ce qui arrête le signal d'activation. Le complexe G $\beta\gamma$ se reconstitue, stabilisant la liaison du GDP au niveau de la sous-unité G α .

La fixation du ligand sur son récepteur et l'activation de la protéine G constituent les deux premières étapes nécessaires à la transmission du signal intracellulaire. La protéine G α libre

peut activer différents effecteurs tels que l'adénylate cyclase. Selon le type de protéine G associé au récepteur, l'adénylate cyclase peut être activée ($G\alpha_s$ pour les récepteurs D1-like) ou inhiblée ($G\alpha_i$, pour les récepteurs D2-like).

L'activation des récepteurs D1 conduit à une accumulation intracellulaire d'AMPc et par conséquent à l'activation de la protéine kinase A (PKA), qui peut aller phosphoryler ses cibles, tels que des canaux potassiques et DARPP-32 (Dopamine and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-regulated phosphoprotein 32kDa), une phosphoprotéine centrale dans la transduction du signal dopaminergique postsynaptique (Greengard et al., 1999; Nishi et al., 1999), et moduler l'activité électrique des neurones (Figure 11).

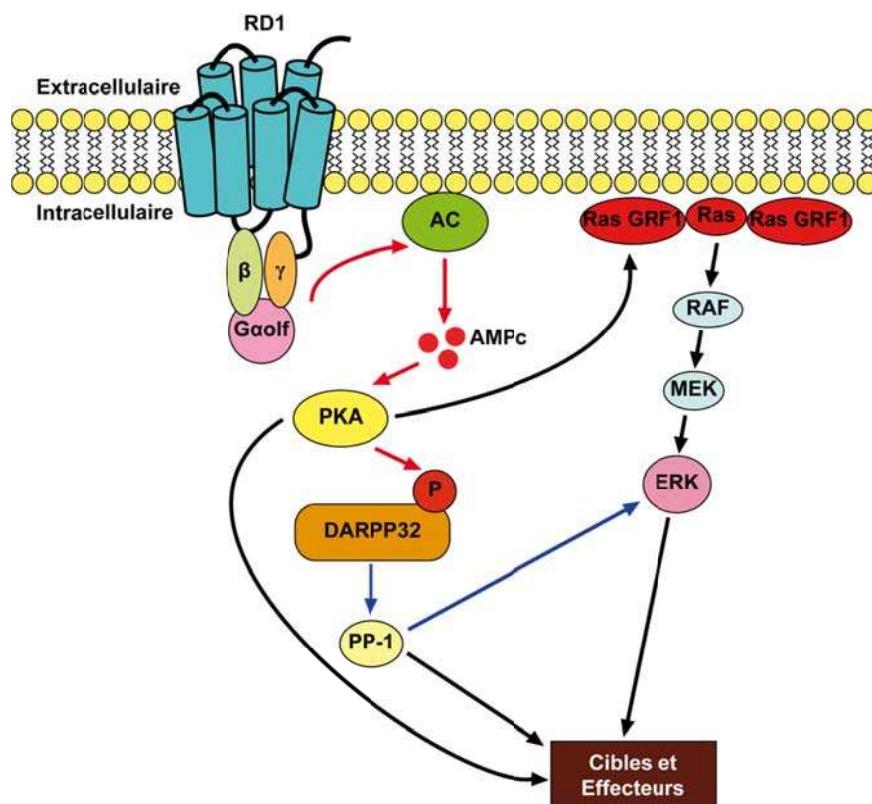


Figure 11 : Cascade de signalisation du récepteur D1 de la dopamine.

Le récepteur D1 de la dopamine (RD1) activé par sa liaison avec son agoniste stimulate l'adénylate cyclase (AC), ce qui augmente la production d'adénosine 3,5-monophosphate cyclique (cAMP) et active la protéine kinase A (PKA). La PKA phosphoryle ses nombreuses cibles, et notamment la DARPP-32 (Dopamine and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-regulated phosphoprotein 32kDa), un inhibiteur de la protéine phosphatase 1 (PP-1). La voie ras-ERK (extracellular signal-regulated kinase), membre de la famille des MAPK (mitogen-activated protein kinase) est parallèle à la voie canonique. Les deux cascades de signalisation vont activer leurs nombreuses cibles et leurs nombreux effecteurs.

A l'inverse, les récepteurs D2-like sont couplés négativement à l'adénylate cyclase et à la phosphorylation de DARPP-32 et permettent l'activation de canaux potassique (Kobayashi et al., 2004), la stimulation de la phospholipase A2 et la modulation des canaux calciques (Hernandez-Lopez et al., 2000).

I.B.2.d) Distribution des récepteurs dopaminergiques dans les ganglions de la base

Au sein des ganglions de la base, la distribution des cinq types de récepteurs dopaminergiques est clairement établie pour certains sous-types et reste encore discutée pour d'autres (Figure 12). Pour obtenir une cartographie précise de la localisation de ces récepteurs dopaminergiques dans ce réseau, différents outils ont été utilisés, notamment le binding autoradiographique et l'hybridation *in situ*, la RT-PCR et l'immunolocalisation avec la production d'anticorps spécifiques. Ces techniques présentent des sensibilités et des spécificités diverses et de ce fait, certains résultats sont divergents selon les études et soulèvent des problèmes d'interprétation. De plus, ces travaux ont été menées dans différentes espèces (rat, primate non-humain...) ; il existe une certaine variabilité d'expression et de localisation selon les espèces.

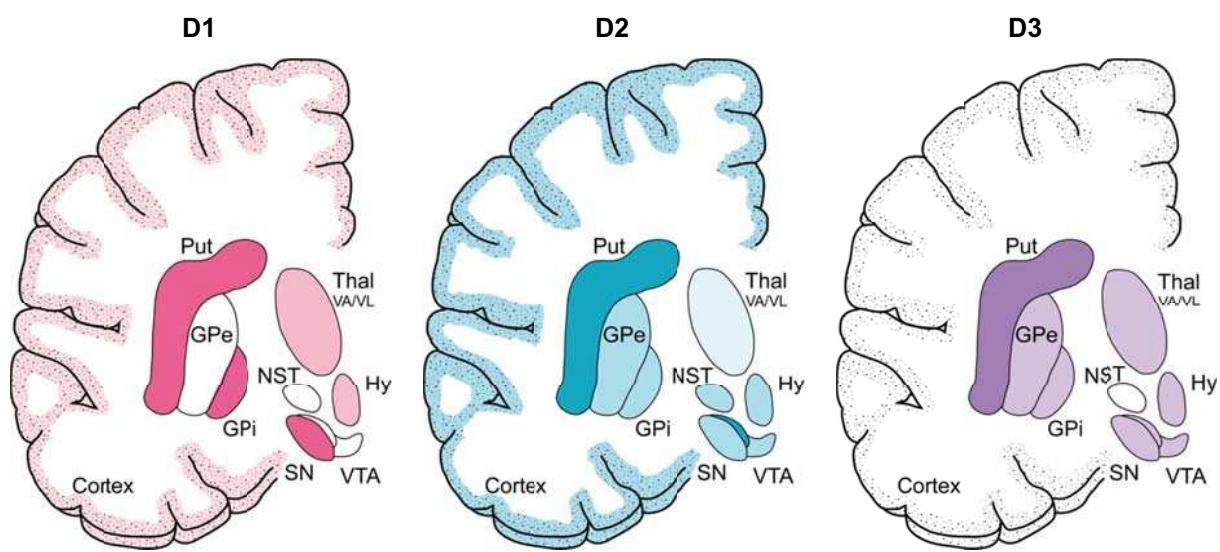


Figure 12 : Distribution des récepteurs D1, D2 et D3 à la dopamine au sein des ganglions de la base chez le primate non-humain.

Put = Putamen ; GPe = Globus Pallidus externe ; GPI = Globus Pallidus interne ; NST = Noyau sous-thalamique ; SN = Substance noire ; Hy = Hypothalamus ; Thal = Thalamus ; VAT = Aire tegmentale ventrale.

I.B.2.d.i) Récepteur D1

Le récepteur D1 est le récepteur de la dopamine le plus répandu dans le système nerveux central et le plus intensément exprimé parmi tous les sous-types (Dearly et al., 1990; Fremeau et al., 1991; Weiner et al., 1991). Le récepteur D1 est intensément exprimé dans le striatum (noyau caudé et putamen), le noyau accumbens, les tubercules olfactifs. Il est aussi présent dans le cortex cérébral, le système limbique, l'hypothalamus postérieur, le thalamus et l'hypophyse antérieure (cellules à prolactine).

D'autres régions montrent des sites de liaison pour le récepteur D1, sans qu'aucun ARNm ne soit détecté. Il s'agit du globus pallidus et de la substance noire pars reticulata (Spano et al., 1977), où les récepteurs D1 sont localisés en position présynaptique dans les terminaisons des neurones GABAergiques du caudé-putamen.

Plus précisément, dans le striatum, le récepteur D1 est localisé préférentiellement sur les neurones efférents GABAergiques de la voie directe (Gerfen et al., 1990; Le Moine et al., 1990). La détection en microscopie électronique du récepteur D1 dans le striatum localise principalement le récepteur à la membrane plasmique de ces neurones épineux de taille moyenne mais aussi dans la partie intracytoplasmique associé avec les endosomes, le réticulum endoplasmique et les citernes de l'appareil de Golgi (Caille et al., 1996). Il est aussi présent sur les dendrites, au niveau de la tête et du corps des épines dendritiques et il est distribué principalement au niveau de la densité postsynaptique des synapses asymétriques (Caille et al., 1996). Néanmoins la localisation membranaire du récepteur D1 immunodétectable est essentiellement extrasynaptique (Huang et al., 1992; Caille et al., 1996).

I.B.2.d.ii) Récepteur D2

Le récepteur D2 est principalement détecté dans le caudé-putamen, le noyau accumbens (plus fortement dans la partie « core ») et les tubercules olfactifs et le bulbe olfactif (Bouthenet et al., 1991). Le récepteur D2 est plus modérément détecté dans le noyau central de l'amygdale, le septum latérodorsal, diverses régions corticales (cortex préfrontal, cingulaire antérieur, entorhinal) et dans les cellules granulaires de l'hippocampe (Bouthenet et al., 1991; Levey et al., 1993; Jackson and Westlind-Danielsson, 1994). Il est aussi présent dans les neurones dopaminergiques de l'hypothalamus, la substance noire *pars compacta* et l'aire tegmentale

ventrale (Medor-Woodruff et al., 1989; Bouthenet et al., 1991; Weiner et al., 1991). De plus, dans ces structures, il est présent dans le péricaryon et les dendrites. Ces données sont en accord avec un rôle à la fois pré- et postsynaptique, et suggère que le récepteur D2 contrôle directement l'activité des neurones dopaminergiques. Plus précisément, dans le striatum, le récepteur D2 est localisée dans les neurones efférents de la voie indirecte produisant les enképhalines (Le Moine et al., 1990; Le Moine and Bloch, 1995) et est abondant dans les épines dendritiques.

I.B.2.d.iii) Récepteur D3

Le récepteur D3 est détecté dans la substance noire *pars compacta*, l'aire tegmentale ventrale, dans les tubercules olfactifs et les îlots de Calleja (Bouthenet et al., 1991; Levesque et al., 1995), mais ce récepteur est exprimé dans beaucoup moins de neurones dopaminergiques que le récepteur D2 (Diaz et al., 1994; Diaz et al., 1995).

Il est intéressant de noter que la distribution du récepteur D3 varie selon les espèces. En effet, chez le rat, le récepteur D3 est localisé au niveau du striatum ventral, dans la partie ventro-médiane du "shell" du noyau accumbens, où il est exprimé dans les neurones contenant la neurotensine et la substance P et projetant sur le pallidum ventral. (Levesque et al., 1992; Le Moine and Bloch, 1996) et est relativement peu exprimé dans le striatum dorsal (Sokoloff et al., 1990; Bouthenet et al., 1991; Levesque et al., 1995; Le Moine and Bloch, 1996). En revanche, chez le primate non-humain le récepteur D3 est exprimé dans l'ensemble du striatum dorsal (Morissette et al., 1998; Bezard et al., 2003).

De même que les récepteurs D2, les récepteurs D3 ont une localisation pré et postsynaptique (Bordet et al., 2000). Il est intéressant de noter que si leur expression est nettement inférieure à celle des récepteurs D2, leur affinité en revanche est supérieure. Les récepteurs D3 sont surtout des autorécepteurs (Sokoloff et al., 2006).

Le récepteur D3 présente une distribution spécifique dans des aires limbiques (Landwehrmeyer et al., 1993a, b). Il est faiblement exprimé dans l'hypothalamus, l'hippocampe, le septum et dans quelques couches corticales du lobe temporal (Bouthenet et al., 1991).

I.B.2.d.iv) Récepteur D4

Le récepteur D4 est faiblement exprimé dans les ganglions de la base. Son expression reste plus marquée dans les régions corticales limbiques que motrices suggérant une implication privilégiée de ces récepteurs dans les réponses émotionnelles et les fonctions cognitives (Civelli et al., 1993). Il est fortement exprimé dans le cortex frontal, l'amygdale, l'hippocampe, l'hypothalamus, le mésencéphale et la rétine (Van Tol et al., 1991; O'Malley et al., 1992). A un degré moindre, il est localisé dans le globus pallidus, la substance noire *par* *reticulata* et le noyau réticulaire du thalamus (Mrzljak et al., 1996). Une seule étude d'immunohistologie suggère que le récepteur D4 est localisé dans les neurones pyramidaux et non-pyramidaux du cortex cérébral, identifiés comme étant des interneurones GABAergiques (Mrzljak et al., 1996). Ainsi, dans le cortex cérébral, la dopamine par le récepteur D4, pourrait moduler la neurotransmission GABAergique.

I.B.2.d.v) Récepteur D5

Le récepteur D5 est relativement peu exprimé dans le système nerveux central comparé au récepteur D1 et présente une distribution différente. Il est principalement localisé dans l'hippocampe et des noyaux thalamiques où le récepteur D1 est peu détecté (Tiberi et al., 1991; Meador-Woodruff et al., 1992). L'ARNm du récepteur D5 est plus faiblement retrouvé dans le striatum dorsal, les tubercules olfactifs, les aires corticales du cerveau antérieur et dans des régions postérieures telle que l'aire tegmentale ventrale (Huntley et al., 1992; Rappaport et al., 1993; Choi et al., 1995). L'ARNm du récepteur D5 a été détecté dans le noyau sous-thalamique grâce une étude d'hybridation *in situ* (Svenningsson and Le Moine, 2002) et des travaux d'immunolocalisation avec un anticorps spécifique (Ciliax et al., 2000; Khan et al., 2000). Le récepteur D5 est également présent dans la substance noire *par* *reticulata*.

En résumé, les récepteurs D1-like sont principalement localisés sur les neurones postsynaptiques, alors que les récepteurs D2-like ont une localisation à la fois pré- et postsynaptique. La question de la co-localisation des récepteurs D1 et D2 dans les neurones striataux a été amplement explorée et controversée. On considère que pour l'essentiel, les récepteurs D1 et D2 sont ségrégés dans des populations distinctes du striatum, avec la description de co-localisations limitées, variables selon les approches utilisées et les espèces

(Gerfen et al., 1990; Le Moine et al., 1990; Le Moine et al., 1991; Hersch et al., 1995; Le Moine and Bloch, 1995; Aubert et al., 2000; Nadjar et al., 2006). En effet, le récepteur D1 est situé au niveau de la voie striatonigrale, alors que le récepteur D2 est sur la voie striatopallidale. Chez le rat, les récepteurs D1 et D2 sont ségrégés dans 5% de la population neuronale du striatum (Gerfen et al., 1990; Le Moine and Bloch, 1995). En revanche, chez le primate non-humain, les récepteurs D1 et D2 une peu plus sont ségrégés (25-30%) au niveau de la voie striatopallidale : les collatérales axonales du striatum projettent à la fois sur le globus pallidus externe et sur le globus pallidus interne (Nadjar et al., 2006). Les collatérales axonales du globus pallidus externe envoient des projections vers le globus pallidus interne et les collatérales axonales du globus pallidus interne envoient des projections vers le globus pallidus externe (Levesque and Parent, 2005). Dans le cerveau de primate non-humain, le récepteur D5 est co-localisé avec le récepteur D2 dans les interneurones cholinergiques du striatum (Bergson et al., 1995). Dans le striatum ventral, les récepteurs D1 et D3 sont également présents dans les mêmes neurones (Le Moine and Bloch, 1996; Ridray et al., 1998). Ainsi, en général, un même neurone striatal exprimerait les récepteurs D1 et D3/D4 ou les récepteurs D2 et D5.

I.B.2.e) Trafic, internalisation et désensibilisation du récepteur D1 de la dopamine

I.B.2.e.i) Biosynthèse et adressage des récepteurs

En condition basale, les récepteurs D1 de la dopamine, sont des protéines membranaires, dont l'action s'exerce une fois positionnée à la surface des neurones. Leur production obéit au trafic intraneuronal classique des récepteurs couplés aux protéines G. Une fois synthétisés, ils sont adressés à la surface membranaire des corps cellulaires, des dendrites et des terminaisons axonales et leur distribution, comme celle des autres protéines membranaires, fait intervenir (Figure 13) :

- La voie de biosynthèse et d'adressage des protéines nouvellement synthétisées : les protéines sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique et maturées dans l'appareil de Golgi, dans les corps cellulaires et probablement aussi dans les dendrites (Dotti and Banker, 1991; Bradke and Dotti, 1998). Elles sont ensuite majoritairement adressées à la membrane plasmique. Des phénomènes de dégradation directe à partir des compartiments de synthèse et de maturation protéiques ont été rapportés (Petaja-Repo et al., 2001).

- **Le transport** : il peut être antérograde ou rétrograde et conduire à des phénomènes de transcytose.

- **Les voies d'endocytose, de recyclage et de dégradation** : une fois dans les endosomes de tri (appelés aussi endosomes précoces), les protéines peuvent être prises en charge soit par les endosomes de recyclage pour être réaddressées à la surface membranaire, soit par les corps multivésiculaires pour être acheminées vers le cytoplasme du corps cellulaire par transport rétrograde, pour être prises en charges par les endosomes tardifs et majoritairement dégradées par les lysosomes. Des signaux d'adressage sélectifs vers la voie de dégradation ont été mis en évidence, notamment l'ubiquitylation du domaine cytoplasmique (Lemmon and Traub, 2000). Il est important de noter que ce phénomène d'endocytose fonctionne à bas bruit dans le neurone en condition normal.

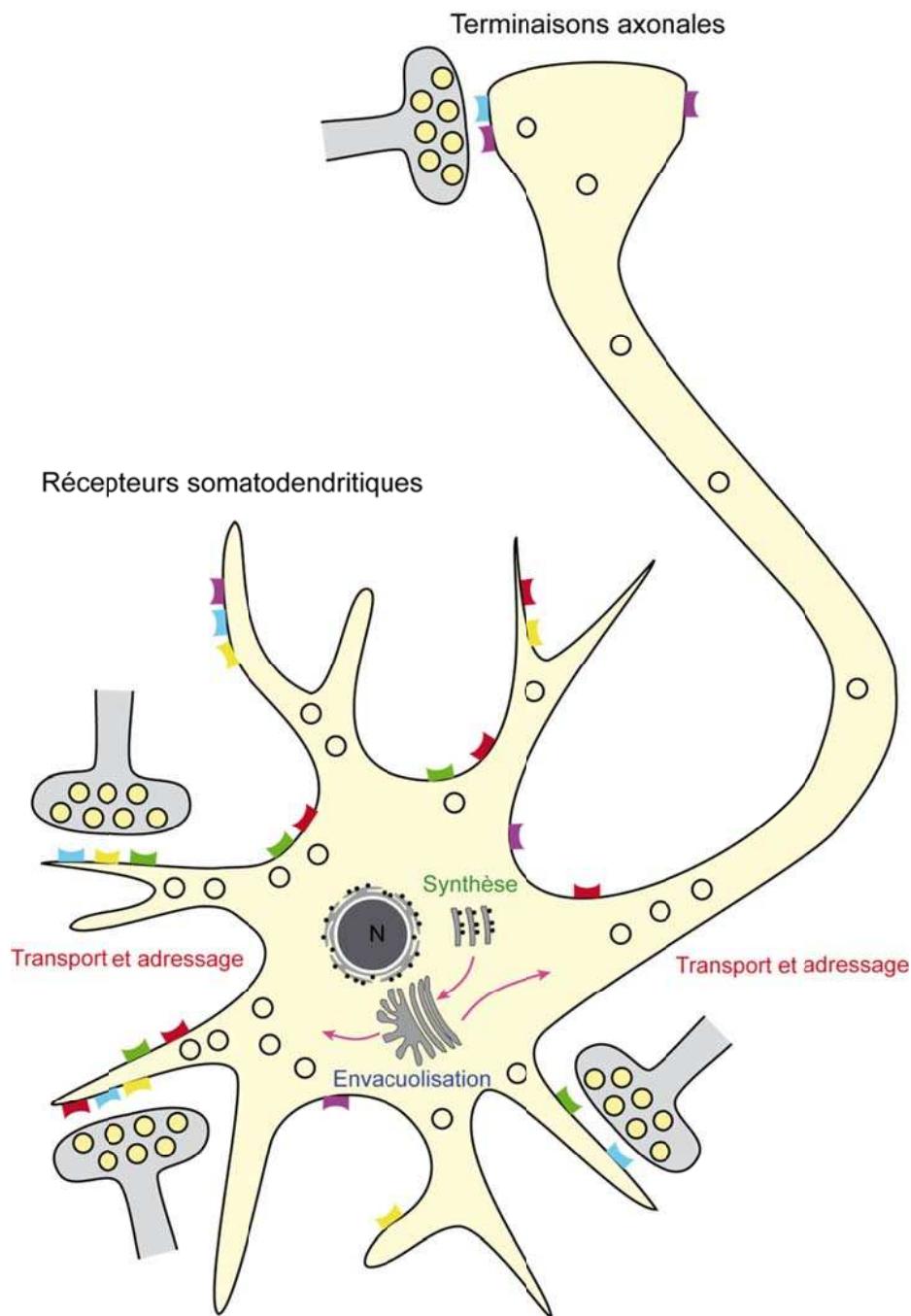


Figure 13 : Biosynthèse et adressage à la membrane des récepteurs aux neurotransmetteurs dans les neurones.

La distribution polarisée des récepteurs aux neurotransmetteurs est la résultante de leur trafic intracellulaire qui fait intervenir (1) les phénomènes de biosynthèse, de transport et d'adressage des récepteurs nouvellement synthétisés et (2) les voies d'endocytose, de recyclage et de dégradation des récepteurs.

Le récepteur D1 de la dopamine peut être localisé au niveau du compartiment somatodendritique, où il peut être majoritairement en position extrasynaptique, mais aussi au niveau des terminaisons axonales (Huang et al., 1992; Caille et al., 1996). Dans le striatum, il est principalement situé à la membrane plasmique des neurones épineux de taille moyenne. Néanmoins, il peut parfois être présent dans le cytoplasme au niveau du réticulum endoplasmique et dans les citernes de l'appareil de Golgi (Caille et al., 1996).

I.B.2.e.ii) Stimulation, internalisation et désensibilisation du récepteur D1 de la dopamine

Il est maintenant clairement établi depuis de nombreuses années que la stimulation des récepteurs couplés aux protéines G induit majoritairement leur internalisation, suivie d'une dégradation ou d'un recyclage à la membrane. Cette internalisation et cette dégradation sont dues à une accélération des phénomènes d'endocytose. Elles entraînent une diminution du nombre de récepteurs localisés à la membrane plasmique et sont étroitement associées aux mécanismes de désensibilisation (cf ci-dessous) et de diminution d'expression des récepteurs (Koenig and Edwardson, 1997; Bloch et al., 1999; Moore et al., 2007; Hanyaloglu and von Zastrow, 2008) (Figure 14).

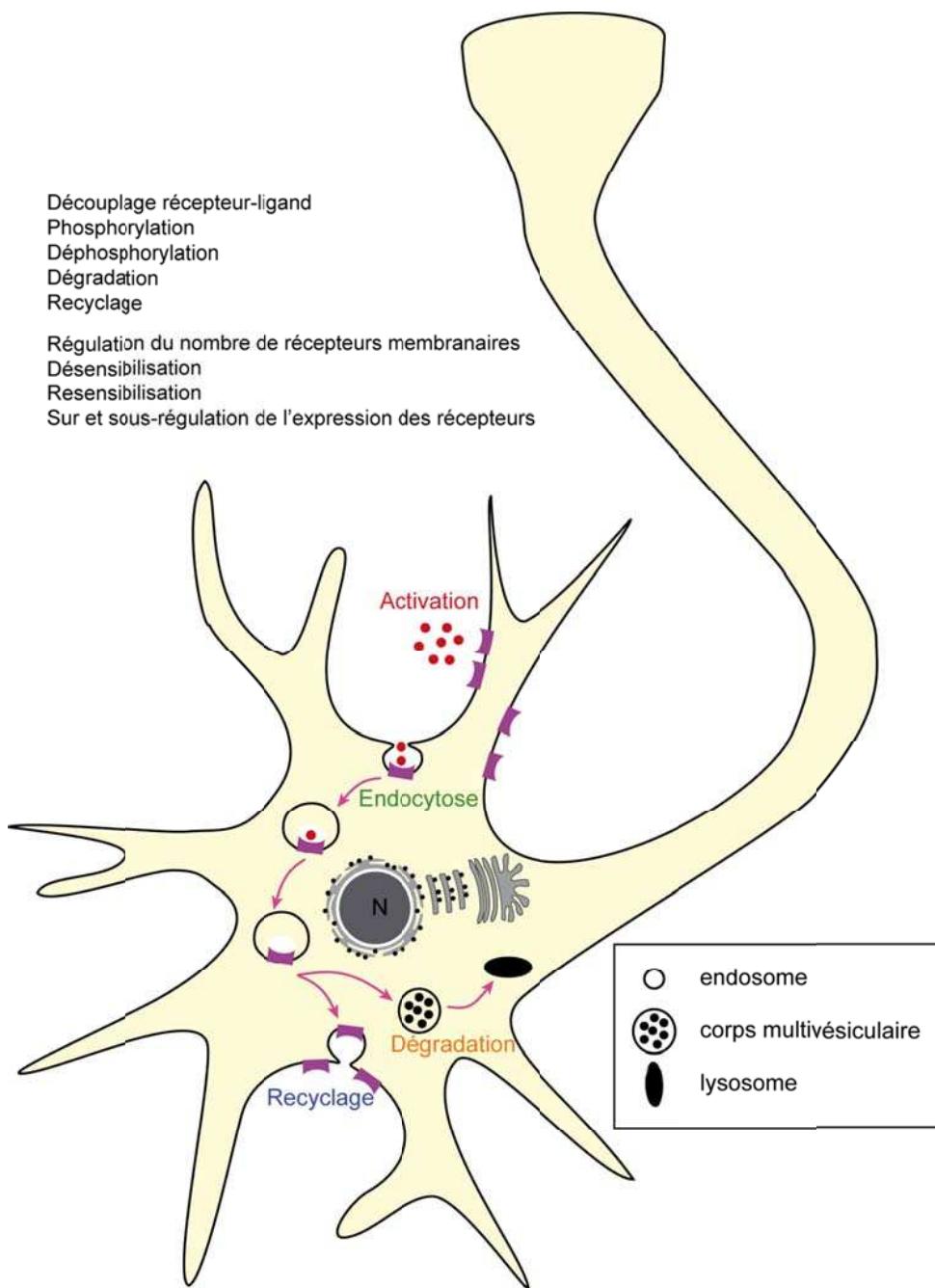


Figure 14 : Modèle du trafic intraneuronal des récepteurs couplés aux protéines G après stimulation.

L'activation du récepteur couplé aux protéines G conduit à son internalisation par des phénomènes d'endocytose. Une fois dans les endosomes, le récepteur peut être soit recyclé à la membrane plasmique soit dégradé par la voie lysosomale.

La **désensibilisation** est une des propriétés les plus importantes du fonctionnement des récepteurs couplés aux protéines G. Après l'activation du récepteur, la désensibilisation permet d'atténuer son activité de manière réversible en régulant son abondance à la membrane plasmique. La désensibilisation entraîne le découplage du récepteur de ses voies de transduction habituelles (Benovic et al., 1986; Hanyaloglu and von Zastrow, 2008).

Les mécanismes de désensibilisation et d'internalisation des récepteurs couplés aux protéines G ont été bien décrits avec comme modèle le récepteur $\beta 2$ adrénnergique (Krueger et al., 1997; Carman and Benovic, 1998; Ferguson and Caron, 1998; Bunemann and Hosey, 1999; Premont and Gainetdinov, 2007). Les nombreuses similitudes de fonction entre le récepteur $\beta 2$ adrénnergique et le récepteur D1 de la dopamine laissent penser que les mécanismes mis en jeu sont semblables (Figure 15).

La fixation du ligand à son récepteur favorise le couplage du récepteur à la protéine G. L'affinité de la sous-unité $G\alpha$ pour le GDP est diminuée, ainsi le GDP se dissocie. Ceci provoque la dissociation de la sous-unité et du dimère $G\alpha$ et $G\beta\gamma$, qui peuvent activer leurs effecteurs. Il se produit alors rapidement une phosphorylation du récepteur en C-terminal par la protéine kinase A ou les protéines kinases des récepteurs couplés aux protéines G (GRKs) : le récepteur est ainsi faiblement affin pour son ligand. La GRK vient se positionner à la membrane plasmique (Benovic et al., 1986; Moore et al., 2007). Ce recrutement à la membrane peut se faire soit directement par fixation à des phospholipides membranaires, soit par fixation de GRK aux sous-unités $G\beta\gamma$. La phosphorylation du récepteur entraîne une augmentation de son affinité pour les β -arrestines. La fixation de la β arrestine sur le récepteur (au voisinage de la troisième boucle intracytoplasmique) entraîne un découplage du récepteur et de la protéine G, conduisant à l'arrêt de la stimulation et à la désensibilisation rapide du récepteur (Lohse et al., 1990). La β arrestine est capable de se lier avec la clathrine pour initier l'endocytose du récepteur dans les endosomes (Ferguson et al., 1996) et son recyclage après déphosphorylation par des phosphatases (Moore et al., 2007). Les phosphatases garantissent le recyclage du récepteur à la membrane plasmique mais il peut aussi être dirigé vers les lysosomes et ainsi être dégradé.

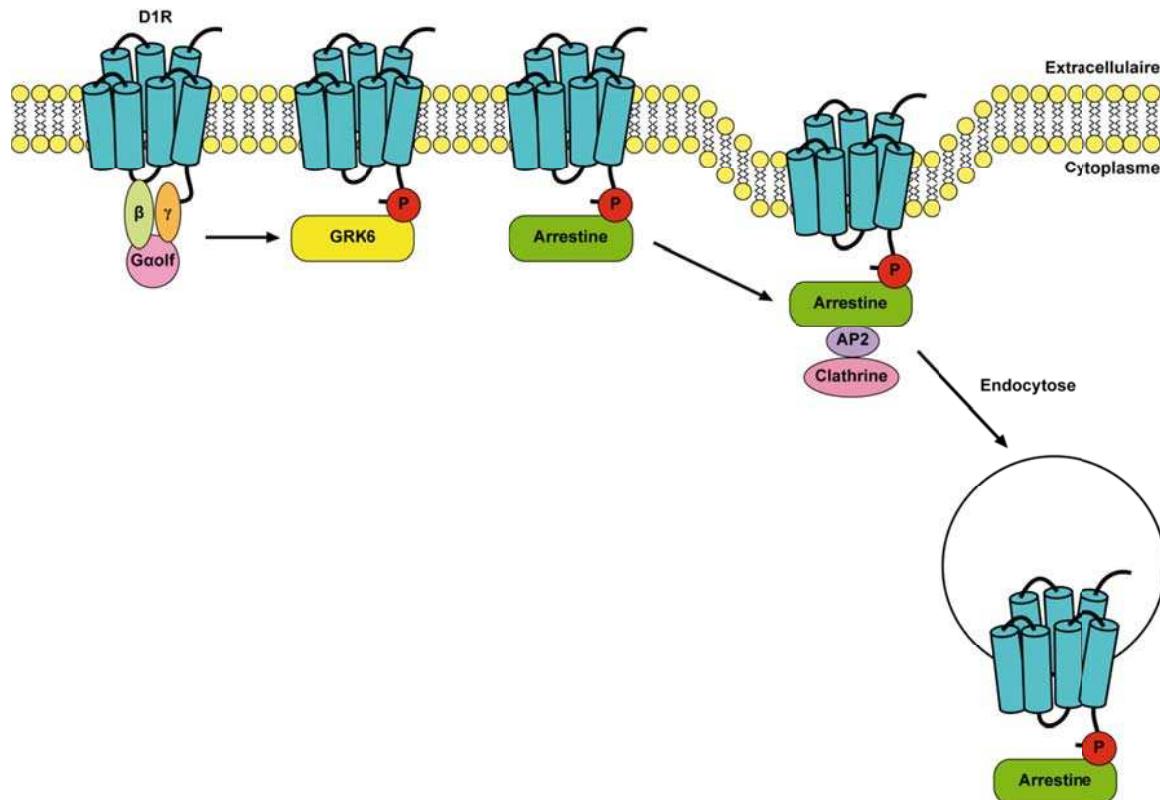


Figure 15 : Représentation schématique du mécanisme de désensibilisation homologue du récepteur D1 de la dopamine (Guigoni and Bezard, 2009).

Le ligand se fixe sur son récepteur spécifique et active les protéines G hétérotrimériques. La protéine kinase A (PKA) et les protéines kinases des récepteurs couplés aux protéines G (GRK) phosphorylent le récepteur. Par conséquent, le récepteur est fonctionnellement découpé des protéines G et son affinité augmente pour les arrestines. La fixation de l'arrestine sur le récepteur empêche l'association avec une nouvelle protéine G et donc toute nouvelle activation de protéines G. L'arrestine est capable de se lier avec la clathrine pour permettre l'endocytose du récepteur dans les endosomes. Les phosphatases garantissent le recyclage du récepteur à la membrane plasmique mais il peut aussi être dirigé vers les lysosomes et ainsi être dégradé.

La désensibilisation dite « **homologue** » dépend strictement de la présence de ses propres agonistes. Le récepteur est phosphorylé spécifiquement par une GRK rendant ainsi la conformation structurale du récepteur plus stable et empêchant le couplage de la protéine G avec le récepteur. Cela est suivi par le recrutement des β-arrestines qui provoque une désensibilisation fonctionnelle du récepteur et favorise le processus d'endocytose par la formation de puits recouverts de clathrine. Ces récepteurs sont rapidement ou lentement recyclés vers la membrane ou simplement dégradés dans les lysosomes. En revanche, la désensibilisation est qualifiée d'« **hétérologue** » lorsqu'elle n'est pas spécifique du couple ligand/récepteur : le mécanisme de désensibilisation hétérologue est déclenché lorsque le

messager secondaire active une PKA qui phosphoryle tous les récepteurs sous forme activée ou non activée par le ligand.

La baisse de l'efficacité de la désensibilisation a été montrée dans certaines pathologies et notamment dans la maladie de Parkinson. De plus les protéines GRK jouent un rôle important dans la désensibilisation et semblent être une piste thérapeutique très intéressante.

Le retour des récepteurs à la membrane plasmique est observé dans des délais relativement courts après l'endocytose, de l'ordre de l'heure. Les récepteurs délivrés à la membrane plasmique peuvent provenir soit du **recyclage** et/ou soit d'une **néosynthèse protéique**. A titre d'exemple, pour les récepteurs muscariniques, Koenig et Edwardson ont montré *in vitro* que dans des temps courts après l'internalisation (30min), le retour des récepteurs à la membrane plasmique provient essentiellement du recyclage des récepteurs internalisés (Koenig and Edwardson, 1994, 1997). Après des temps plus longs, ils ont montré que la moitié des récepteurs présents à la surface membranaire sont des récepteurs néosynthétisés, traduisant ainsi le turn-over des récepteurs.

La **dégénération** des récepteurs après internalisation est également un autre paramètre impliqué dans la régulation de l'abondance des récepteurs à la membrane plasmique et donc dans la régulation de la réceptivité du neurone face à une nouvelle stimulation. A titre d'exemple, la stimulation aigue induit une augmentation significative de la dégradation du récepteur delta aux opiacés (Ko et al., 1999; Tsao and von Zastrow, 2000).

Cependant, la situation est variable selon les types de récepteurs et leur mode de stimulation. Dans certains cas, l'activation du récepteur peut conduire à son adressage à la membrane plasmique. Notamment, la stimulation par la morphine du récepteur μ -opioïde peut induire une redistribution de sa localisation dans les dendrites et entraîner une augmentation de son abondance à la membrane plasmique dendritique (Haberstock-Debic et al., 2003).

La stimulation du récepteur D1 de la dopamine a été étudiée *in vitro* et *in vivo* dans les neurones striataux de rat (Dumartin et al., 1998; Dumartin et al., 2000; Martin-Negrier et al., 2000; Martin-Negrier et al., 2006). Après stimulation par l'agoniste D1 ou libération de dopamine, la désensibilisation des récepteurs D1 a lieu. Les récepteurs D1 subissent une importante redistribution intracellulaire dans les neurones striataux et sont endocytés dans des

temps brefs (quelques minutes). L'abondance des récepteurs D1 diminue à la membrane plasmique et augmente dans le cytoplasme au niveau des corps cellulaires et des dendrites, dans les endosomes (Dumartin et al., 1998; Martin-Negrier et al., 2000). Une fois endocyté, le récepteur retourne à la membrane 20 minutes après stimulation. Il est recyclé à la membrane plasmique à la fois des dendrites et des axones (Martin-Negrier et al., 2006). Il a été montré chez le rat que le couplage du récepteur D1 avec l'adénylate cyclase est médiée par la protéine $G\alpha_{olf}$ (olfactory type G-protein α subunit) et non pas par la isoforme ubiquitaire de la protéine $G\alpha$ stimulatrice ($G\alpha_s$) (Zhuang et al., 2000; Corvol et al., 2001). La protéine $G\alpha_{olf}$, identifiée pour la première fois dans l'épithélium olfactif (Jones et al., 1990; Belluscio et al., 1998), est exprimée fortement dans les neurones épineux de taille moyenne du striatum (Drinnan et al., 1991; Herve et al., 1993). De plus, son absence chez des souris transgéniques ($G\alpha_{olf}^{-/-}$) empêche le couplage du récepteur D1 à l'adénylate cyclase (Corvol et al., 2001). Chez l'homme, la protéine $G\alpha_{olf}$ est présente dans tous le cerveau (Zigman et al., 1993) mais sa distribution régionale n'a pas encore été examinée.

I.B.3) Altérations de la cascade de signalisation médiée par le récepteur D1 de la dopamine dans les dyskinésies L-dopa induites

Le développement des dyskinésies L-dopa induites implique des modifications postsynaptiques à long terme, en particulier du récepteur dopaminergique D1 qui module la voie directe des neurones striataux. L'hyperactivité de la voie striatonigrale directe semble être avoir un rôle central dans la genèse des mouvements anormaux. De nombreuses études menées dans le modèle rongeur lésé unilatéralement à la 6-OHDA ainsi que dans le modèle de référence de la maladie de Parkinson, le primate non-humain intoxiqué au MPTP (Berke et al., 1998; Cenci et al., 1998; Picconi et al., 2003; Aubert et al., 2005), ont permis de montrer différentes altérations de la cascade de signalisation du récepteur D1 lors de l'apparition des dyskinésies L-dopa induites.

I.B.3.a) Le récepteur D1 de la dopamine

Des études autoradiographiques d'hybridation *in situ* et binding du récepteur D1 et de GTP γ S, ont mis en évidence l'augmentation du niveau d'expression du récepteur D1 dans les neurones striataux ainsi que de son couplage aux protéines G (Aubert et al., 2005) chez les animaux dyskinétiques. Ceci suggère que l'hypersensibilité des récepteurs D1 observée dans

le striatum pourrait contribuer à l'apparition des dyskinésies. La distribution subcellulaire du récepteur D1 est également modifiée. En effet, chez le singe, des études quantitatives en microscopie électronique ont révélé une surabondance du récepteur D1 à la membrane plasmique des neurones du striatum (Guigoni et al., 2007) chez les animaux dyskinétiques par rapport aux animaux normaux, parkinsoniens et non dyskinétiques, suggérant ainsi que les dyskinésies sont associées à des altérations de la désensibilisation et du trafic intraneuronal du récepteur D1 (Guigoni et al., 2007).

I.B.3.b) La protéine G α et la protéine DARPP-32

Des travaux ont révélés que le niveau d'expression de la protéine G α_{olf} est significativement augmenté dans le striatum de rat avec une déplétion dopaminergique et chez les patients parkinsoniens (Corvol et al., 2004; Gold et al., 2007). Un tel accroissement de la capacité de transduction conduit à une augmentation de la production d'AMPc en relation avec une surstimulation de l'adénylate cyclase (Corvol et al., 2004). Un traitement chronique à la L-dopa ou avec un agoniste du récepteur D1 normalise l'expression de la protéine G α_{olf} (Corvol et al., 2004). La preuve finale de l'implication de la signalisation de récepteur D1 dans le développement des dyskinésies est établie par l'observation d'un accroissement très important des niveaux d'expression de la protéine DARPP-32 et de la protéine DARPP-32 phosphorylée chez les animaux dyskinétiques, corrélé avec la sévérité des dyskinésies (Picconi et al., 2003; Aubert et al., 2005; Santini et al., 2007).

I.B.3.c) Les protéines GRKs

Le mécanisme de désensibilisation homologue du récepteur D1 devrait théoriquement réguler son abondance exagérée à la membrane plasmique. Cependant, des études biochimiques ont révélé que les niveaux d'expression de trois protéines impliquées dans la machinerie de désensibilisation sont diminués chez les animaux dyskinétiques : la protéine GRK2 et la protéine GRK6, qui activent le récepteur par phosphorylation et la β arrestine 2 qui se lie au récepteur pour empêcher le couplage avec une nouvelle protéine G et permettre l'internalisation du récepteur (Bezard et al., 2005; Premont and Gainetdinov, 2007; Ahmed et al., 2008; Gurevich and Gurevich, 2008).

I.B.3.d) Le récepteur D3 de la dopamine

Ces différentes données suggèrent une sur-activation de la cascade de signalisation D1. Par ailleurs, il a été suggéré que le récepteur D3 pourrait intervenir dans le développement des dyskinésies. En effet, deux études ont montré une augmentation du niveau d'expression du récepteur D3 dans le striatum dorsal de souris, de rats et de primates non-humains dyskinétiques (Bordet et al., 1997; Bezard et al., 2003; Gross et al., 2003). De plus, récemment, une hétérodimérisation fonctionnelle entre les récepteurs D1 et D3 (Fiorentini et al., 2008) à travers un cross-talk intra-membranaire (Marcellino et al., 2008) a été révélée alors même que ces deux récepteurs sont co-exprimés dans les mêmes neurones épineux de taille moyenne du striatum (Le Moine and Bloch, 1996; Ridray et al., 1998). Enfin, un co-traitement avec la L-dopa et un antagoniste D3, le ST198 est connu pour limiter la sévérité des dyskinésies chez le rongeur et le primate non-humain (Bezard et al., 2003; Visanji et al., 2008).

Ces résultats suggèrent qu'une interaction physique du récepteur D1 de la dopamine avec le récepteur D3 pourrait expliquer une contribution du récepteur D3 aux dyskinésies.

I.B.4) Modèles animaux de la maladie de Parkinson et des dyskinésies L-dopa induites

Pour mieux comprendre les causes et les conséquences de la maladie de Parkinson et des dyskinésies L-dopa induites, l'utilisation de modèles animaux expérimentaux est nécessaire en particulier en l'absence de modèles animaux spontanés. Les modèles existants permettent d'explorer d'une part les mécanismes de dégénérescence des neurones à dopamine, d'autre part les conséquences moléculaires, cellulaires et comportementales de cette dégénérescence.

Tableau 2 : Différents modèles animaux utilisés pour étudier la maladie de Parkinson.

animaux	stockage	coût	avantages	inconvénients
drosophile	facile	peu cher	études de mutations, reproduction rapide	éloigné de l'homme
souris	facile	peu cher	modèles transgéniques, études comportementales	chirurgie stéréotaxique difficile
rat	facile	peu cher	chirurgie stéréotaxique, études comportementales	impossibilité de transgénèse classique
singe	difficile	cher	modèle le plus proche de l'homme	problèmes éthiques

Pour étudier les mécanismes de neurodégénérescence, de nombreux modèles expérimentaux et différentes espèces sont à disposition, allant de la drosophile au primate non-humain (Tableau 2). Il existe :

- des **modèles transgéniques** développés chez la drosophile et la souris, *via* le knock-out ou la surexpression de gène codant pour l' α -synucléine (suppression de l' α -synucléine soit mutée ou soit de la forme humaine sauvage) (Abeliovich et al., 2000; van der Putten et al., 2000; Giasson et al., 2002; Lee et al., 2002) ou la parkine. Les souris transgéniques qui surexpriment l' α -synucléine humaine présentent également des inclusions similaires aux corps de Lewy dans de nombreuses régions du cerveau, des déficits moteurs légers et une faible perte neuronale (van der Putten et al., 2000; Giasson et al., 2002; Lee et al., 2002). Ces modèles ne présentent pas de symptômes parkinsoniens mais ils sont très intéressants pour étudier l'étiologie de la maladie.
- des modèles de **tranfection virale** à l'aide de lentivirus ou d'adénovirus, qui en comparaison aux modèles de souris transgéniques sont plus facile à mettre en place, puisqu'ils ne nécessitent pas la génération des lignées stables, et peuvent être effectuée chez plusieurs espèces et notamment chez le rat et le primate non-humain. Des études de surexpression d' α -synucléine par transfection virale chez le rat ont caractérisé une perte neuronale significative des neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* et la présence d'inclusions cytoplasmiques éosinophiles (Lo Bianco et al., 2002). Ce modèle a aussi montré le rôle neuroprotecteur de la parkine (Lo Bianco et al., 2004).

- des **modèles neurotoxiques** (cf ci-dessous).

Pour étudier les conséquences de la maladie, les dyskinésies L-dopa induites, les modèles de choix sont les **modèles neurotoxiques** qui utilisent des neurotoxines spécifiques des systèmes dopaminergiques. Deux neurotoxines sont principalement utilisées : la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) qui est administrée par chirurgie stéréotaxique chez les rongeurs (rat et souris) et le MPTP qui est administré par voie systémique chez le primate non-humain (Figures 5 et 16). Ces modèles, après déplétion dopaminergique permettent de reproduire les symptômes parkinsoniens, ainsi que des mouvements involontaires anormaux, analogues aux dyskinésies chez l'homme, après un traitement chronique par la L-dopa.

Ces modèles ont contribué de manière décisive, malgré leurs imperfections, à la compréhension de la physiopathologie de la maladie de Parkinson et des dyskinésies L-dopa induites, et ont permis de définir de nouvelles approches thérapeutiques.

Il existe aussi des **modèles pharmacologiques** transitoires, avec des composés comme la réserpine qui provoque la déplétion des stocks de neurotransmetteurs monoaminergiques ou d'antagonistes des récepteurs dopaminergiques, afin d'induire un blocage transitoire de la transmission dopaminergique entraînant un syndrome parkinsonien sévère mais transitoire.

En résumé, une multitude de modèles pour étudier les causes et les conséquences de la maladie de Parkinson et des dyskinésies L-dopa induite sont à disposition. Aucun n'est parfait, chacun peut apporter des informations complémentaires. Il est important de choisir son modèle en fonction de la problématique posée.

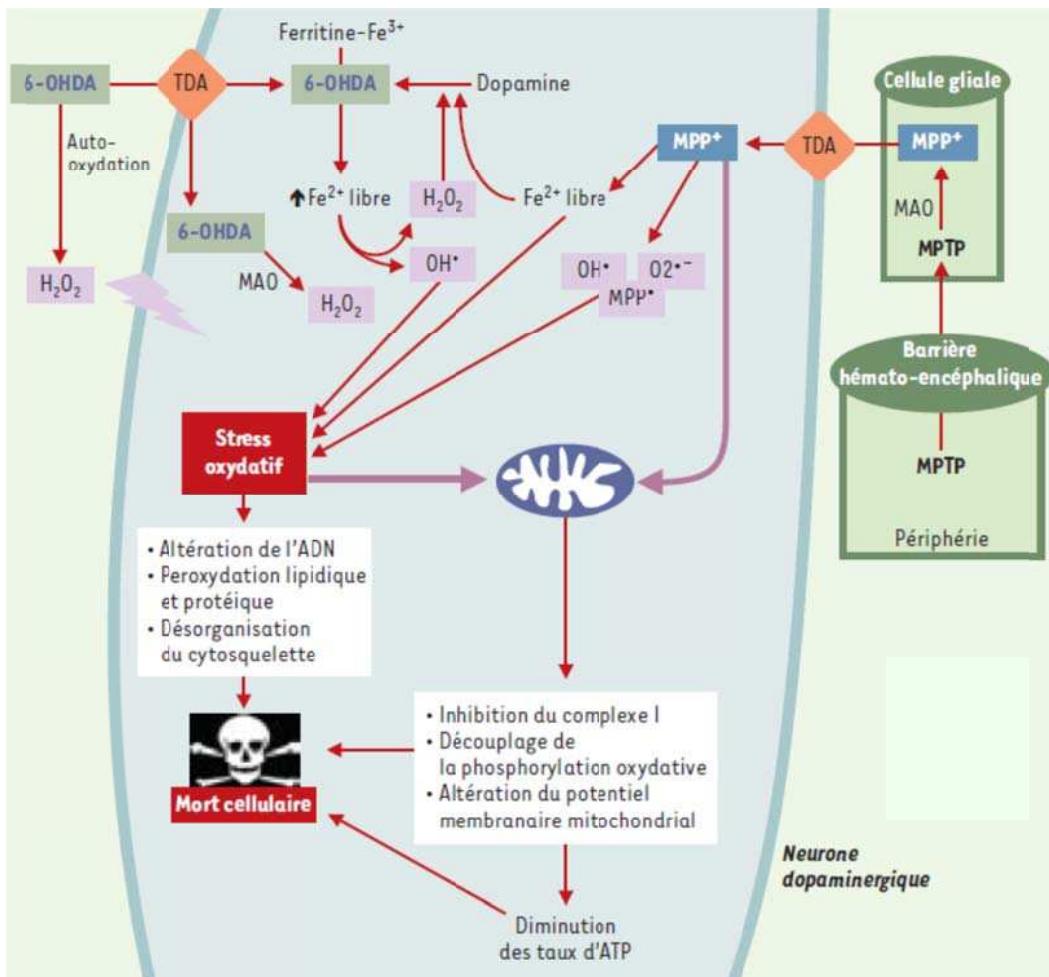


Figure 16 : Mécanismes impliqués dans la toxicité de la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) et du 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), d'après Lambeng 2002.

L'accumulation de 6-OHDA dans les neurones dopaminergiques, à la suite d'une injection intracérébrale ou d'une synthèse endogène mettant en jeu la dopamine et le fer, conduit à :

- (1) des modifications mitochondrielles (inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, découplage de la chaîne de phosphorylation oxydative et diminution du potentiel membranaire mitochondrial), qui concourent à la diminution des taux d'ATP.
- (2) la formation d'espèces radicalaires très réactives qui endommagent les macromolécules et participent à la désorganisation de la structure cellulaire.

Ces événements conjugués conduisent à la mort des neurones. Une oxydation de la 6-OHDA peut également avoir lieu à l'extérieur de la cellule, produisant alors du peroxyde d'hydrogène qui diffuse dans la cellule et concourt à l'accroissement des taux de radicaux libres intracellulaires.

Le MPTP est, quant à lui, transformé en son métabolite actif, le MPP⁺, par la monoamine oxydase (MAO) de type B présente dans les cellules gliales. Relargué par ces dernières, il est alors capté par les neurones dopaminergiques où il va, comme la 6-OHDA, inhiber le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, augmenter la synthèse de radicaux libres et provoquer la mort cellulaire. La diminution des taux d'ATP, à la suite du dysfonctionnement mitochondrial, est également responsable d'une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, liée à un phénomène d'excitotoxicité indirecte, qui accélère le processus de dégénérescence.

I.B.4.a) Lésions induites par la 6-hydroxydopamine

I.B.4.a.i) La toxicité de la 6-OHDA

La 6-OHDA est une forme hydroxylée de la dopamine. Les injections systémiques n'ont pas d'effet sur le système nerveux central car la 6-OHDA ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique (Figure 16). Elle doit par conséquent être administrée par injection stéréotaxique intracérébrale au niveau de la substance noire, du striatum, du faisceau médian du télencéphale ou par injection intraventriculaire (Ungerstedt, 1968; Schwarting and Huston, 1996; Tolwani et al., 1999; Blum et al., 2001).

La spécificité de la 6-OHDA pour les systèmes catécholaminergiques s'explique par sa structure, très proche de la dopamine et de la noradrénaline. Elle peut être ainsi captée par les transporteurs des catécholamines (Blum et al., 2001). Afin de cibler spécifiquement les neurones dopaminergiques, il est absolument nécessaire de co-traiter les animaux avec des inhibiteurs des catécholamines : la désipramine, qui est un inhibiteur de la recapture noradrénergique central et périphérique et un inhibiteur plus faible de la recapture de la sérotonine et le citalopram qui est un inhibiteur sélectif de la recapture sérotoninergique.

I.B.4.a.ii) Chez le rat

Le modèle le plus souvent utilisé est le rat lésé par injection unilatérale de 6-OHDA dans le faisceau médian du télencéphale. Le rat est un modèle de choix qui présente les mêmes qualités que la souris, sauf l'impossibilité de réaliser des animaux transgéniques. Il a une taille optimale (son stockage est facile, il est suffisamment grand pour réaliser de la stéréotaxie de précision et des études comportementales), son génome est bien caractérisé (utilisation de tous les outils de biologie moléculaire), sa neuroanatomie est bien connue et présente de grande similitude avec l'homme et il est possible d'utiliser un grand nombre d'animaux qui sont pratiquement identiques en terme d'âge, de poids et génétiquement, ce qui permet une reproductibilité dans les résultats.

Ce modèle rat lésé par la 6-OHDA dans le faisceau médian du télencéphale, reproduit l'essentiel des lésions dopaminergiques caractéristiques de la maladie de Parkinson. Ce modèle expérimental présente de nombreux avantages. Les troubles moteurs sont aisément mesurables en utilisant une batterie de tests comportementaux (Barneoud et al., 1995; Cenci et al., 2002). L'étendue de la lésion nigrale peut être mesurée avec un test comportemental rotatoire induit par les amphétamines. Ainsi, l'examineur peut mesurer de manière quantitative le déficit moteur à l'aide d'un rotomètre. Toutefois, il n'a pas été observé de formation de corps de Lewy dans la substance noire.

Ce modèle a fait ses preuves pour tester de nouvelles molécules thérapeutiques. Il a permis de caractériser l'apparition de mouvements involontaires anormaux chez l'animal lésé, similaires aux dyskinésies observées chez l'homme et le primate non-humain, après un traitement avec des doses thérapeutiques de L-dopa. Ces mouvements anormaux involontaires peuvent être quantifiés en se basant sur leurs distributions, leurs amplitudes et leurs durées, en utilisant des critères similaires à ceux utilisés en clinique. Ils peuvent être quantifiés en se basant sur l'échelle de Cenci qui repose sur quatre critères : les dyskinésies orofaciales, l'akinésie des pattes antérieures, la dystonie axiale et le nombre de rotations (Cenci et al., 1998; Andersson et al., 1999; Lundblad et al., 2002). Ces critères sont scorés de 0 à 4 en fonction de leurs durées pendant l'observation. Ces mouvements anormaux involontaires ont, après traitement à la L-dopa, le même déroulement temporel d'apparition que les dyskinésies de « pic de dose » et comme chez l'homme, ils perturbent fortement l'activité motrice physiologique. De plus, l'utilisation d'antidyskinétiques comme l'amantadine ou la clozapine réduisent la sévérité de ces mouvements anormaux involontaires (Metz and Whishaw, 2002).

Ce modèle est très utilisé pour étudier la maladie de Parkinson et les dyskinésies. Les lésions dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* sont pratiquement totales et très peu de neurones dopaminergiques survivent (97% de perte). C'est pour cette raison qu'il est un excellent modèle pour étudier des stades avancés de la maladie. Cependant, il présente quelques inconvénients, notamment des lésions des neurones dopaminergiques projetant vers le noyau accumbens sont aussi observées. L'inconvénient majeur de cette stratégie est que la dégénérescence des neurones dopaminergiques est relativement rapide (de 2 à 3 semaines) et unilatérale. Elle ne reproduit pas exactement les caractéristiques de la maladie de Parkinson, à savoir une dégénérescence bilatérale des neurones dopaminergiques. Les modèles de lésion bilatérale totale restent encore compliqués à réaliser, en raison de la viabilité des animaux, de

ce fait, l'injection unilatérale de 6-OHDA est beaucoup plus largement utilisée et présente l'avantage de garder le côté controlatéral à la lésion comme contrôle. Il existe cependant quelques modèles de lésions bilatérales partielles en injectant de faible dose de 6-OHDA (Barneoud et al., 1995; Salin et al., 1996).

En réalité, il existe plusieurs modèles de rats traités par la 6-OHDA, en fonction des modalités d'injection et de la dose injectée (Tableau 3).

Tableau 3 : Les différents modèles de rats traités par la 6-OHDA.

Modèles 6-OHDA	Atteinte du système DA	Perte des neuones DA	Déficits moteurs	Corps de Lewy	Effets de la L-dopa	viabilité
Striatum unilatérale	unilatérale	progressive	oui	non	MAIs	oui
Striatum bilatéral	bilatérale	progressive	oui	non	?	oui
SNpc unilatérale	unilatérale	aigue	oui	non	MAIs	oui
SNpc bilatérale	bilatérale	aigue	oui	non	?	oui
FMT unilatérale	unilatérale	aigue	oui	non	MAIs	oui
FMT bilatérale	bilatérale	aigue	oui	non	?	non

SNpc : substance noire *pars compacta* ; FMT : faisceau médian du télencéphale ; MAIs : mouvements involontaires anormaux.

Le modèle rat 6-OHDA obtenu par injection dans la substance noire *pars compacta* reproduit le pattern de la perte des neurones dopaminergiques de la maladie de Parkinson, avec une perte d'environ 90% des neurones.(Carman et al., 1991). Cependant, le processus neurodégénératif est également assez rapide et une des difficultés majeures de ce modèle est qu'il est relativement difficile d'injecter la 6-OHDA dans cette structure, sans léser les structures voisines comme l'aire tegmentale ventrale.

La 6-OHDA peut aussi être injectée dans le striatum, la mort neuronale est beaucoup plus progressive et peut évoluer pendant une période allant jusqu'à 16 semaines. Ce modèle est très intéressant pour étudier par exemple des stratégies neuroprotectrices.

I.B.4.a.iii) Chez la souris

Il existe également des modèles de lésions unilatérales par injection de 6-OHDA dans le faisceau médian du télencéphale, ou dans le striatum ou dans la substance noire *pars compacta* (Lundblad et al., 2005). La souris présente une neuroanatomie qui a des similitudes avec l'homme, mais la chirurgie stéréotaxique et les études comportementales sont plus compliquées à réaliser sur cet animal de petite taille, c'est pourquoi ce modèle reste peu utilisé.

I.B.4.b) Lésions induites par le MPTP

Le MPTP est une neurotoxine capables d'induire une dégénérescence sélective des neurones de la substance noire *pars compacta* (Figures 5 et 16).

I.B.4.b.i) Chez la souris

Le MPTP est généralement administré par voie intra-péritonéale. Le modèle de souris MPTP est facile d'utilisation et provoque des lésions bilatérale de la substance noire *pars compacta* (Heikkila et al., 1984). La cinétique et l'intensité de la perte neuronale sont influencées par la souche utilisée, l'âge, le sexe, la dose cumulée et le rythme d'administration (Gerlach and Riederer, 1996). L'administration de MPTP chez la souris n'entraîne généralement pas l'apparition d'un tableau clinique très marqué comme chez le primate non-humain en dehors des effets aigus comme l'akinésie, la posture arquée et l'hypothermie. Le traitement par la L-dopa améliore la symptomatologie. Par contre, les dyskinésies sous traitement à la L-dopa n'ont pas été clairement décrites. Ceci est sans doute dû à une perte neuronale trop faible des neurones dopaminergiques.

Les effets observés à moyen et à long terme sur le comportement moteur sont parfois contradictoires (Arai et al., 1990; Nishi et al., 1991; Chia et al., 1996). En raison de l'instabilité des perturbations motrices, les tests comportementaux doivent être effectués dans des conditions suffisamment exigeantes afin de révéler des anomalies significatives (Sedelis et al., 2001).

Le modèle de souris MPTP est classiquement utilisé pour l'étude biochimique et moléculaire des évènements impliqués dans l'étiologie de la maladie et a ainsi permis de montrer

l'importance de la perturbation énergétique (Mizuno et al., 1988), l'implication des dérivés réactifs de l'oxygène (Przedborski et al., 1992), et l'activation des voies de l'apoptose (Turmel et al., 2001).

I.B.4.b.ii) Chez le rat

L'injection systémique de MPTP n'induit pas de lésion dopaminergique chez le rat, car contrairement à la souris et au primate non-humain, il a la particularité de posséder de grandes quantités de monoamine oxydase B au niveau de ses vaisseaux périphériques. Par conséquent, le MPP⁺ formé est dégradé avant de passer la barrière hémato-encéphalique.

Cependant, il est possible de réaliser des injections stéréotaxiques de MPTP, directement dans la voie dopaminergique nigrostriatale de manière unilatérale (Bellissimo et al., 2004) ou de manière bilatérale (Braga et al., 2005), pour étudier les troubles cognitifs (Da Cunha et al., 2001; Da Cunha et al., 2003; Bellissimo et al., 2004; Braga et al., 2005) et ainsi induire une lésion partielle de la substance noire *pars compacta* et du striatum. Néanmoins, ce modèle ne présente pas de perturbations motrices importantes. Les dyskinésies sous traitement à la L-dopa n'ont pas été mises en évidence. Ce modèle est par conséquent très peu utilisé.

I.B.4.b.iii) Chez le primate non-humain

Le primate non-humain intoxiqué au MPTP est un modèle plus appliqué puisqu'il est proche de l'homme. Il a permis d'étudier les différentes altérations au niveau de ganglions de la base et a contribué à la compréhension de la physiopathologie de la maladie de Parkinson. Il est devenu indispensable pour tester de nouvelles molécules cibles car c'est le modèle « ultime » avant la recherche clinique.

L'intoxication par le MPTP induit des lésions des systèmes dopaminergiques avec une distribution et des conséquences cliniques très similaires à celles observées dans la maladie de Parkinson (Forno et al., 1993) : une perte plus massive au sein du putamen par rapport au noyau caudé des terminaisons dopaminergiques (Moratalla et al., 1992) et une dégénérescence plus importante au niveau de la substance noire *pars compacta* par rapport à l'aire ventrale tegmentale, avec une perte préférentielle au sein des segments ventraux et latéraux de la substance noire *pars compacta* (Sirinathsinghji et al., 1992; Varastet et al., 1994; Bezard et al., 2001b; Bezard et al., 2006). De plus, comme dans la maladie de Parkinson (Hirsch et al.,

1988), les neurones dopaminergiques qui contiennent de la neuromélanine sont plus sensibles à la toxicité du MPTP (Herrero et al., 1993; Purisai et al., 2005). Néanmoins, les effets toxiques du MPTP ne sont pas uniquement limités aux systèmes dopaminergiques : des lésions moins importantes des systèmes noradrénergiques et sérotoninergiques (Mitchell et al., 1985b) et des lésions des systèmes non monoaminergiques (perte neuronale GABAergique et glycinergique de la rétine (Cuenca et al., 2005) et du globus pallidus (Emborg et al., 2006)).

Le MPTP induit un syndrome parkinsonien sévère chez le primate non-humain (Burns et al., 1983; Doudet et al., 1985) : il permet de reproduire la plupart des caractéristiques de la maladie comme l'akinésie/bradykinésie, la rigidité et l'instabilité posturale. Par contre, même si des tremblements posturaux ont été observés, le tremblement de repos n'est pas induit dans la plupart des primates non-humains : il n'est présent que chez le singe vert (Bergman et al., 1998; Guehl et al., 2003) et reste variable en fonction des doses utilisées (Gomez-Mancilla et al., 1991; Bezard et al., 1997).

Le primate non-humain répond bien au traitement par la L-dopa ainsi que par des agonistes dopaminergiques. Chez certains primates non-humains, il est ainsi possible d'obtenir à long terme des complications motrices, des dyskinésies induites par la L-dopa, qui sont similaires à celles observées dans la maladie de Parkinson. Ces dyskinésies perturbent leur activité motrice et sont équivalentes aux dyskinésies de pic de dose observées chez les patients (Nutt, 1990).

La sévérité des dyskinésies peut être également évaluée en se basant sur leurs distributions, leurs amplitudes et leurs durées, en utilisant des critères similaires à ceux utilisés en clinique. Les dyskinésies sont mesurées suivant une échelle allant de 0 à 4 : 0 pour des dyskinésies absentes ; 1 pour des dyskinésies légères, fugaces et rares ; 2 pour des dyskinésies modérées, des mouvements anormaux plus importants, mais qui n'interfèrent pas de manière significative sur le comportement normal ; 3 pour des dyskinésies marquées, fréquentes et parfois en continu, qui empiètent sur le comportement normal et 4 pour des dyskinésies sévères, presque en continu, qui remplacent le comportement normal de l'animal (Boraud et al., 2001; Bezard et al., 2003; Guigoni et al., 2005; Gold et al., 2007).

En réalité, il n'existe pas un seul modèle de primate non-humain intoxiqué au MPTP. En effet, différents protocoles expérimentaux d'intoxication ont été mis au point ou proposés. Le

MPTP peut être administré par voie intra-carotidienne de manière unilatérale ou bilatérale, par voie intraveineuse, par voie intrapéritonéale ou voie sous-cutanée. De même, le rythme d'administration et les doses utilisées peuvent être variable (modèles d'intoxication aigus ou modèles d'intoxication chroniques). De ce fait, les lésions induites sont différentes et plus ou moins sévère selon le protocole utilisé.

Différentes études récentes ont montré que ce modèle reproduisait également les troubles cardiovasculaires (Oiwa et al., 2003), cognitifs (Decamp and Schneider, 2004) et gastro-intestinaux (Chaumette et al., 2009), observés dans la maladie de Parkinson. Ce modèle est également pertinent par étudier les troubles veille/sommeil (Almirall et al., 1999). Le modèle primate non-humain intoxiqué au MPTP est donc un excellent modèle pour étudier les effets physiopathologiques de la dénervation nigrostriatale, pour les études précliniques et le développement de nouvelles stratégies thérapeutique car il est très proche anatomo-fonctionnellement de l'homme. En revanche, ce modèle présente quelques inconvénients. C'est un modèle très couteux, il est impossible de travailler sur de grandes séries d'animaux et il pose des problèmes d'éthiques. De plus, il ne reproduit pas toutes les caractéristiques de la maladie de Parkinson et notamment, la présence de corps de Lewy, même si des inclusions intraneuronales ont été rapportées chez certains singes âgés (Forno et al., 1986; Purisai et al., 2005) mais avec des caractéristiques ultrastructurales différentes (Forno et al., 1988). La progression lente et continue des lésions neurologiques de la maladie est aussi impossible à reproduire. Il existe cependant des modèles chroniques, plus progressifs sur plusieurs semaines pour mieux mimer l'évolution naturelle de la maladie (Bezard et al., 2001b).

I.C.) Système ubiquitine-protéasome et maladies neurodégénératives

Le système ubiquitine-protéasome joue un rôle majeur dans les mécanismes de protéolyse intracellulaire, dans de multiples métabolismes, pour des fonctions très diverses. Ce système est constitué de nombreux composants ; ce sont des complexes protéiques avec une architecture multimérique et modulaire non associé spécifiquement à un compartiment membranaire donné, permettant (i) l'intégration fonctionnelle de plusieurs activités enzymatiques dans une même structure (protéasome) (ii) et (ii) le partage d'un même module fonctionnel par plusieurs protéines (enzymes d'ubiquitylation), qui identifient et marquent les protéines pour les adresser au protéasome. Ces propriétés contribuent à l'étonnante spécificité et efficacité de cette voie protéolytique.

Dans les cellules eucaryotes, le protéasome est reconnu depuis longtemps comme étant le site où se déroule la dégradation de nombreuses protéines normales ou anormales produites par la cellule. Il est composé d'environ 1% des protéines cellulaires totales (Tanaka et al., 1986) et assure la plus grande activité protéolytique cellulaire. Une conséquence importante de l'activité catalytique du protéasome est la régulation de l'activité de certaines protéines produites par la cellule à travers le contrôle de leur durée de vie et de leur dégradation. Les constituants du protéasome sont présents et actifs dans de nombreux compartiments de la cellule y compris le noyau. Il peut être aussi associé à la membrane du réticulum endoplasmique ou au cytosquelette (Coux et al., 1996). Chez les eucaryotes supérieurs, il régule un grand nombre de voies essentielles dans la cellule en dégradant de nombreuses protéines contrôlant des processus biologiques importants tels que le cycle cellulaire, l'apoptose, la prolifération, la différentiation, la transcription, et la réponse aux stimuli extracellulaires (Ciechanover and Schwartz, 1998). Il a aussi été caractérisé pour être impliqué dans la réponse immunitaire en assurant l'approvisionnement en peptides antigéniques des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (Goldberg and Rock, 1992).

I.C.1) Struture du protéasome 26S

Le protéasome 26S est un complexe multienzymatique intervenant dans la protéolyse intracellulaire dans les cellules eucaryotes. Dans la cellule, le protéasome est majoritairement sous sa forme 26S. La dégradation par le protéasome 26S des protéines polyubiquitinylées peut intervenir dans le cytoplasme et le noyau et est dépendante de l'ATP à pH neutre (Figure 17) (Coux et al., 1996; Voges et al., 1999), indépendamment de tout système vésiculaire. Son rôle prépondérant chez les eucaryotes supérieurs a été clairement établi grâce au développement d'inhibiteurs spécifiques (Lee and Goldberg, 1998).

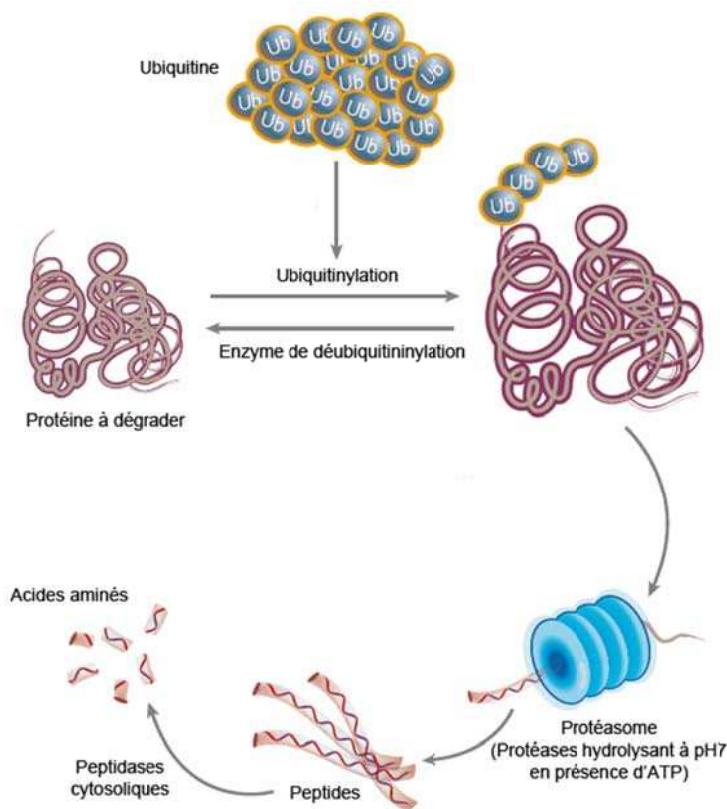


Figure 17 : Diagramme schématique du système ubiquitine-protéasome.

Avant d'être dégradées par le protéasome, les protéines sont ubiquitinylées. Le protéasome fonctionne à pH7 et son activité est dépendante de l'ATP. Dans le protéasome, les protéines à dégrader sont réduites en peptides qui sont relargués dans le cytoplasme. Ces peptides sont ensuite métabolisés en acides aminés par des peptidases cytosoliques. (Rubinsztein, 2006)

Le protéasome 26S est un complexe multiprotéique de 2500kDa, constitué par l'association de deux sous-complexe : la partie catalytique 20S (700kDa) ou cœur catalytique, qui porte l'activité peptidase et la partie régulatrice 19S ou PA700 (700kDa), qui a une activité de reconnaissance spécifique des protéines polyubiquitinylées et de dépliement de ces protéines avant leur dégradation (Figure 18).

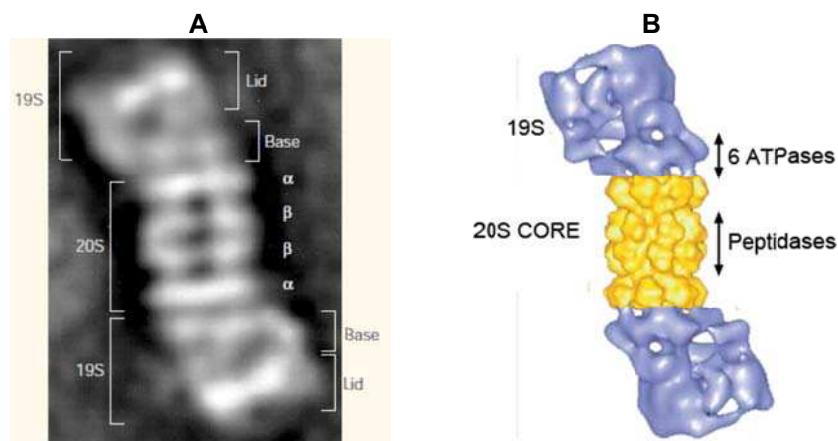


Figure 18 : Le protéasome 26S.

Le protéasome 26S est un complexe multimérique qui dégrade les protéines polyubiquitinylées. Il est composé de deux sous-complexe : le protéasome 19S qui reconnaît et déplie les protéines polyubiquitinylées et le protéasome 20S qui porte l'activité catalytique. **(A)** Cliché de microscopie électronique représentant le protéasome 26S de *Saccharomyces cerevisiae* (Ciechanover, 2005). **(B)** Représentation du protéasome 26S et ses différentes activités (Goldberg, 2005).

I.C.1.a) Le protéasome 20S

Le protéasome 20S est une particule stable et abondante, de structure cylindrique creuse, formée de 28 sous-unités apparentées, distribuées en quatre anneaux heptamériques empilés. Les deux anneaux centraux β sont identiques et sont composée chacun par sept sous-unités différentes ($\beta_{1 \rightarrow 7}$) qui définissent une cavité interne qui renferme les sites catalytiques. Les deux anneaux extérieurs α sont formés également de sept sous-unités différentes ($\alpha_{1 \rightarrow 7}$) qui permettent l'association du protéasome 20S à des complexes régulateurs et contrôlent l'entrée des substrats dans la chambre de catalyse (Figure 19).

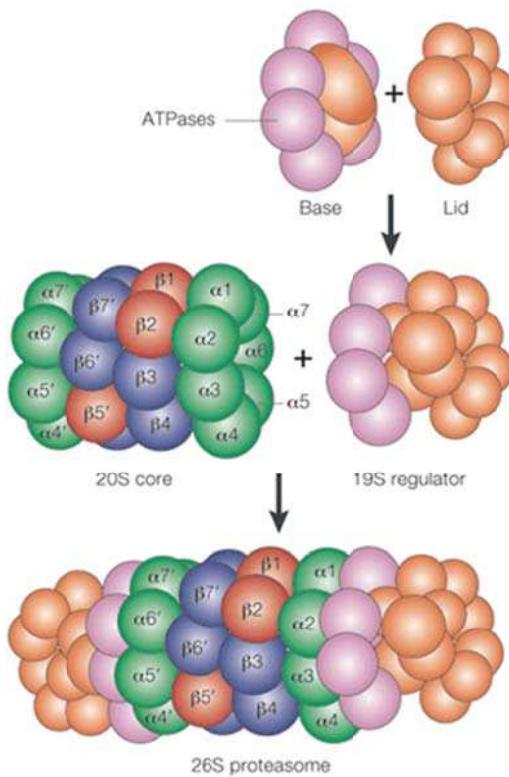


Figure 19 : Structure du protéasome 20S.

Le protéasome 20S est constitué de quatre structures heptamériques circulaires, composés de deux anneaux extérieurs de 7 sous unités α servant pour la régulation et ayant un rôle plutôt structural, tandis que les sept sous-unités β des deux anneaux intérieurs portent l'activité catalytique par le biais des sites actifs des protéases qu'elles contiennent. Les protéasomes 19 S, présents aux deux extrémités du complexe, sont composés de deux sous-ensembles : une partie assurant le lien avec le protéasome 20S, ayant une forte activité ATPasique, et une autre partie nécessaire à la reconnaissance et la dégradation des protéines polyubiquitinylées (Kloetzel, 2001).

Chaque sous-unité α et β a une taille allant de 20 à 35kDa. Le protéasome 20S est la première sous-unité à avoir été caractérisée et purifiée (Lowe et al., 1995). Sa masse moléculaire est d'environ 700kDa. Il possède un diamètre apparent de 113nm et une longueur de 148nm. Sa structure cylindrique comprend un canal central et trois chambres internes. Les deux chambres externes sont entourées des sous-unités α et β . Le canal central où a lieu l'activité protéolytique est quant à lui au centre des anneaux β . L'entrée dans les chambres externes au niveau des anneaux α ne fait que 13nm soit la largeur d'une hélice α . Ainsi, une protéine entièrement repliée ne pourra pas y pénétrer. Il est donc nécessaire que les protéines soient dépliées avant leur entrée dans la chambre externe du protéasome. Le protéasome 20S ne fonctionne jamais seul dans les cellules et interagit avec d'autres facteurs qui contrôlent son

ouverture et qui le fournissent en substrats, et notamment, les complexes 19S et 11S. La cavité du protéasome 20S est généralement fermée. Son ouverture est induite du fait de son association de manière ATP dépendante.

Le protéasome 20S possède au moins cinq activités peptidasiques, caractérisées par des substrats et des inhibiteurs différents, mais seulement trois d'entre elles ont été localisées physiquement (activités chymotrypsine-like, trypsine-like et peptidylglutamyl-peptide hydrolase ou caspase like) au niveau des sous-unités β .

I.C.1.b) Le complexe régulateur 19S

Le complexe 19S joue un rôle prépondérant dans la dégradation des protéines polyubiquitinylées. C'est un complexe de 20 sous-unités qui s'associe à la sous-unité 20S de manière ATP dépendante, d'un seul côté ou des deux côtés du protéasome pour former le protéasome 26S (Figure 20). Il active le protéasome 20S probablement en « ouvrant » les orifices des anneaux α et il apporte des sous-unités qui permettent la reconnaissance des chaînes d'ubiquitine, la dénaturation du substrat et le recyclage de l'ubiquitine. Il est constitué d'une « base » assurant le lien avec le protéasome 20S et d'une partie externe beaucoup plus flexible « couvercle » qui participe à la reconnaissance des protéines polyubiquitinylées (Voges et al., 1999). La structure 19S n'a pas encore été résolue à l'heure actuelle mais son architecture générale a été établie par des expériences de biochimie et d'imagerie (Ferrell et al., 2000).

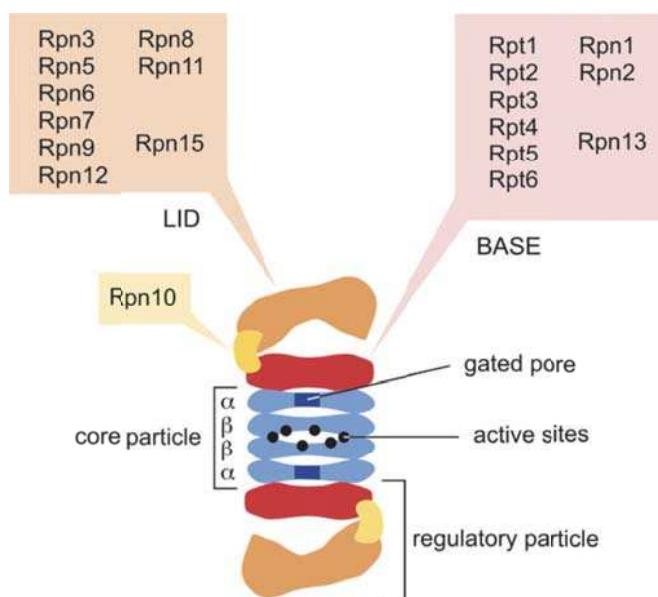


Figure 20 : Représentation du protéasome 19S, d'après (Hanna and Finley, 2007).

Le couvercle du protéasome 19S est constitué de sous-unités non ATPasique (Rpn) et est responsable de la reconnaissance des protéines polyubiquitylées. La base du protéasome 19S porte l'activité ATPasique. Elle est constituée de six sous-unités ATPasiques nommées Rpt1 à Rpt6 et de trois sous-unités non ATPasiques Rpn1, Rpn2 et Rpn13. Ces protéines forment un anneau hexamérique qui s'installent parallèlement à l'axe des sous-unités α du protéasome 20S (Smith et al., 2006). Bien que ces ATPases soient clairement apparentées, leurs fonctions ne sont pas redondantes puisque chacune est nécessaire. Il est probable qu'elles hydrolysent l'ATP pour fournir de l'énergie nécessaire à la déstructuration et le déploiement des substrats (Braun et al., 1999), à l'activation du protéasome 20S et, vraisemblablement, à la translocation des substrats dans la chambre catalytique du protéasome 20S. Une activité isopeptidasique (capable d'hydrolyser les chaînes d'ubiquitine) est aussi associée au complexe 19S. Elle assure le recyclage de l'ubiquitine lors de la dégradation des substrats ubiquitylés, et vraisemblablement aussi une fonction de « contrôle de qualité» permettant le recyclage des protéines mal ubiquitylées, ou mal dégradées par le protéasome (Lam et al., 1997).

I.C.1.c) L'activateur 11S

Il existe d'autres complexes protéiques qui s'associent au protéasome de manière ATP indépendante dans certaines conditions cellulaires, en l'occurrence le complexe activateur 11S, aussi appelé PA28, mis en évidence chez les eucaryotes supérieurs. Il est constitué de deux sous-unités de 28kDa apparentées : PA28 α et PA28 β , qui forment des anneaux hexamériques ou heptamériques qui comme le protéasome 19S, peuvent s'associer aux extrémités du protéasome 20S. *In vitro*, PA28 stimule l'hydrolyse des peptides par le protéasome 20S, de façon indépendante de l'ATP, probablement en maintenant ouverts les orifices de ce complexe. Cependant, son rôle physiologique est loin d'être compris. Aussi, il est généralement admis que PA28 joue un rôle plus spécifique dans la réponse immunitaire (Goldberg et al., 2002). De plus, des particules hybrides contenant un complexe 11S et un complexe 19S associés à un même protéasome 20S ont été mises en évidence, ce qui suggère que ces deux complexes régulateurs pourraient avoir un rôle complémentaire.

I.C.1.d) L'immunoprotéasome

Dans les cellules eucaryotes, l'activité catalytique du protéasome 20S peut être modulée par des complexes régulateurs comme décrit ci-dessus et par différents facteurs environnementaux et cellulaires, ce qui peut entraîner des modifications post-traductionnelles par phosphorylation et le changement des sous-unités catalytiques du protéasome conduisant à l'apparition de l'immunoprotéasome. L'immunoprotéasome intervient dans la réponse immunitaire, mais également dans le vieillissement.

I.C.1.d.i) Réponse immunitaire

La plupart des peptides produits par le protéasome sont hydrolysés en acides aminés par des peptidases cellulaires. Cependant, chez les eucaryotes supérieurs, certains sont utilisés par le système immunitaire. En présence d'interféron- γ (IFN- γ), qui stimule la réponse immunitaire, les sous-unités catalytiques du protéasome standard ($\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$) sont remplacées par les sous-unités dites inducibles ($\beta 1i$, $\beta 2i$ et $\beta 5i$) et forment ainsi l'immunoprotéasome, responsable de la genèse des peptides antigéniques présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) classe I (Goldberg and Rock, 1992; Pamer and Cresswell, 1998; Rock and Goldberg, 1999) et récemment décrit pour le complexe CMH de classe II (Schmid and Munz, 2005).

I.C.1.d.ii) Vieillissement

L'effet de l'âge sur l'activité et l'expression de l'immunoprotéasome n'est pas encore clairement établi. Néanmoins, plusieurs travaux ont mesuré l'expression de l'immunoprotéasome et le vieillissement dans le cerveau (Lee et al., 1999; Mishto et al., 2006). L'expression de l'immunoprotéasome est augmentée dans le cerveau chez les personnes âgées. Dans le cerveau, cette augmentation de l'immunoprotéasome pourrait être expliquée par l'accumulation des protéines oxydées, qui conduit à l'induction des immuno-sous-unités dans le cerveau des personnes âgées (Mishto et al., 2006). En général, dans les tissus âgés, l'activité protéase du protéasome est diminuée, conséquence de la réduction de l'expression de complexes régulateurs tels que le PA28 et le PA700 (Martinez-Vicente et al., 2005). Cette diminution contribue à l'accumulation de protéines endommagées et pourrait être à l'origine de maladies neurodégénératives (Martinez-Vicente et al., 2005).

I.C.2) Système ubiquitine-protéasome

Le système ubiquitine/protéasome orchestre la dégradation des protéines qui est un processus régulé et dynamique (Hershko and Ciechanover, 1998). Il fait intervenir le complexe protéasome et l'ubiquitine, une petite molécule de 9kDa (76 résidus).

La dégradation des protéines par le système ubiquitine/protéasome fonctionne en deux grandes étapes successives (Figure 21A).

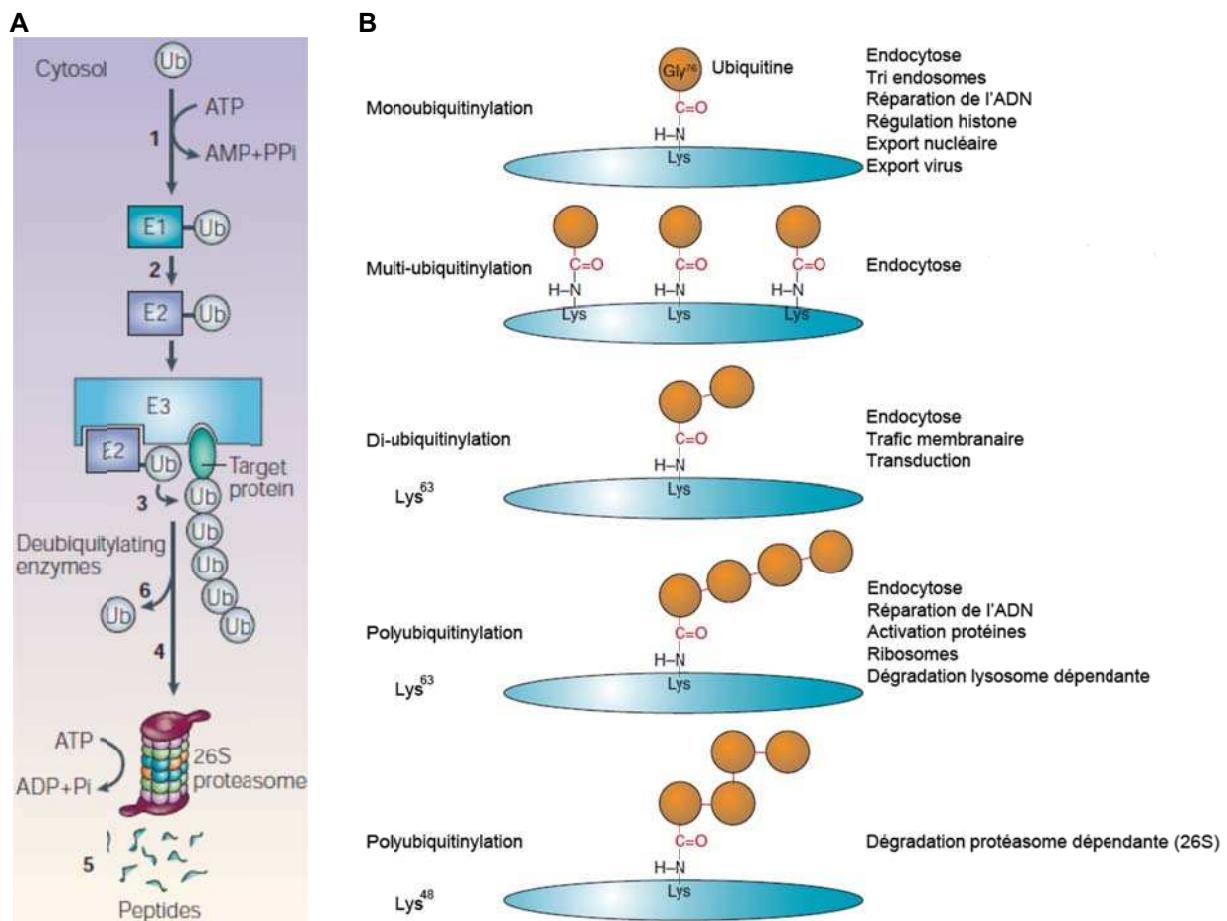


Figure 21 : Le système ubiquitine/protéasome et les types de fixation de l'ubiquitine.

(A) E1, E2 et E3 permettent la fixation et l'elongation des chaînes polyubiquitynées sur les protéines à dégrader. La protéine polyubiquitynée est alors déubiquitynée par des DUB (Deubiquitinase enzyme) après son assemblage avec le protéasome 19S et la protéine est dégradée dans le protéasome 20S (Ciechanover, 2005).

(B) L'ubiquitynation d'une protéine est la fixation covalente d'une ubiquitine (76 acides aminés) sur une lysine de la protéine cible. Il existe plusieurs variétés d'ubiquitynations impliquées dans de nombreuses fonctions distinctes, indépendamment du protéasome. Les substrats peuvent être modifiés avec une seule molécule d'ubiquitine (monoubiquitynation) fixées sur le résidu lysine ou avec de multiples molécules d'ubiquitine (multiubiquitynation) fixées sur différents résidus lysines. Il existe également la diubiquitynation et la polyubiquitynation (à partir d'une chaîne de 4 ubiquitines), le plus souvent par la Lys63 ou la Lys48 (Miranda and Sorkin, 2007).

Dans une première étape, le substrat est ubiquitinylé (par une liaison covalente de molécule d'ubiquitine au niveau des résidus lysine des protéines) de manière ATP dépendante et catalysées par une série d'enzymes. L'ubiquitine est tout d'abord activée et forme une liaison thioester avec une enzyme d'activation (ubiquitin-activating enzyme ou E1). Elle est ensuite transférée, en formant une autre liaison thioester, sur un membre d'une famille d'enzymes de conjugaison (ubiquitin-conjugating enzymes ou E2). Les E2 confèrent un premier niveau de spécificité dans la reconnaissance des substrats. Certaines d'entre elles peuvent transférer directement l'ubiquitine sur des protéines cibles. Cependant, dans l'immense majorité des cas, un troisième composant, appelé ubiquitine ligase ou E3 est nécessaire et joue le rôle principal dans la reconnaissance des substrats. Enfin, une nouvelle classe d'enzyme, dite E4, a récemment été identifiée et jouerait un rôle restant à caractériser dans l'élongation de certaines chaînes d'ubiquitine (Koegl et al., 1999). Ainsi, les protéines dirigées vers la dégradation subissent plusieurs étapes d'ubiquitylation ou d'élongation de la chaîne d'ubiquitine.

Dans une seconde étape, la séquence de polyubiquitine est reconnue comme un signal de dégradation par le protéasome 26S. L'interaction de la chaîne polyubiquitylée avec les sous-unités de reconnaissance de l'ubiquitine au niveau du complexe 19S entraîne la protéine vers sa dégradation à travers le protéasome. La protéine est ainsi dégradée en petits peptides qui sont rapidement hydrolysés par les exopeptidases (carboxypeptidases et aminopeptidases) cellulaires car ceux-ci représentent une source d'acides aminés pour la cellule. La cellule recycle aussi les molécules d'ubiquitine qui se retrouvent dans le cytosol à la fin du cycle de dégradation sous forme libre et disponible pour un nouveau cycle de dégradation protéolytique.

Il existe différentes formes d'ubiquitylation d'une protéine (Figure 21B):

- la **monoubiquitylation** qui est l'ajout d'un seule ubiquitine à la protéine et qui est impliquée dans la régulation des histones, de l'endocytose et dans le bourgeonnement des rétrovirus à partir de la membrane plasmique (Hicke, 2001).
- la **multiubiquitylation** qui se produit lorsque plusieurs résidus lysine de la protéine cible sont associés à des molécules d'ubiquitine unique.
- la **polyubiquitylation** qui représente l'ajout d'une chaîne constituée de plusieurs ubiquitines et liée par une lysine spécifique de la protéine cible.

Il a été montré que la monoubiquitylation et la multiubiquitylation sont nécessaires pour l'entrée des protéines cargo dans les vésicules impliquées dans les voies de sécrétion/endocytose, tandis que la polyubiquitylation est principalement associée à la dégradation des protéines par le protéasome (Figure 21). Dans le cas de la polyubiquitylation, la chaîne d'ubiquitines peut se fixer sur différents résidus lysine : la fixation sur la Lys48 est principalement utilisée pour cibler le protéasome alors que la fixation sur la Lys63 semble jouer un rôle important dans la réparation de l'ADN, la réponse inflammatoire, la voie d'endocytose, et la synthèse des protéines.

Le processus d'ubiquitylation est clairement impliqué dans l'endocytose de récepteurs membranaires et a notamment été très étudiée pour le récepteur au facteur de croissance (TGF- β). Il intervient *via* les mécanismes d'endocytose et dans le ciblage vers les corps multivésiculaires qui constituent une voie de transition pour leur dégradation par le lysosome ou le protéasome (Mukhopadhyay and Riezman, 2007). Le récepteur ubiquitynlé est internalisé dans des vésicules recouvertes de clathrines et est pris en charge par les compartiments de tri des endosomes. L'ubiquitine fixée sur le récepteur est reconnue par la protéine de tri Hrs (Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate, équivalent de Vsp 27 chez la levure (Vacuolar Protein Sorting-Associated Protein)). La protéine Hrs localisée à la membrane de l'endosome recrute à la membrane le complexe ESCRT (Endosomal sorting complex required for transport) (Raiborg and Stenmark, 2009). L'ubiquitine est retirée avant l'entrée du récepteur dans les vésicules internes des corps multivésiculaires (Figure 22). Ainsi, le récepteur est dégradé par le protéasome ou par le lysosome, suivant l'endroit de fixation de l'ubiquitine (Lys48 ou Lys63).

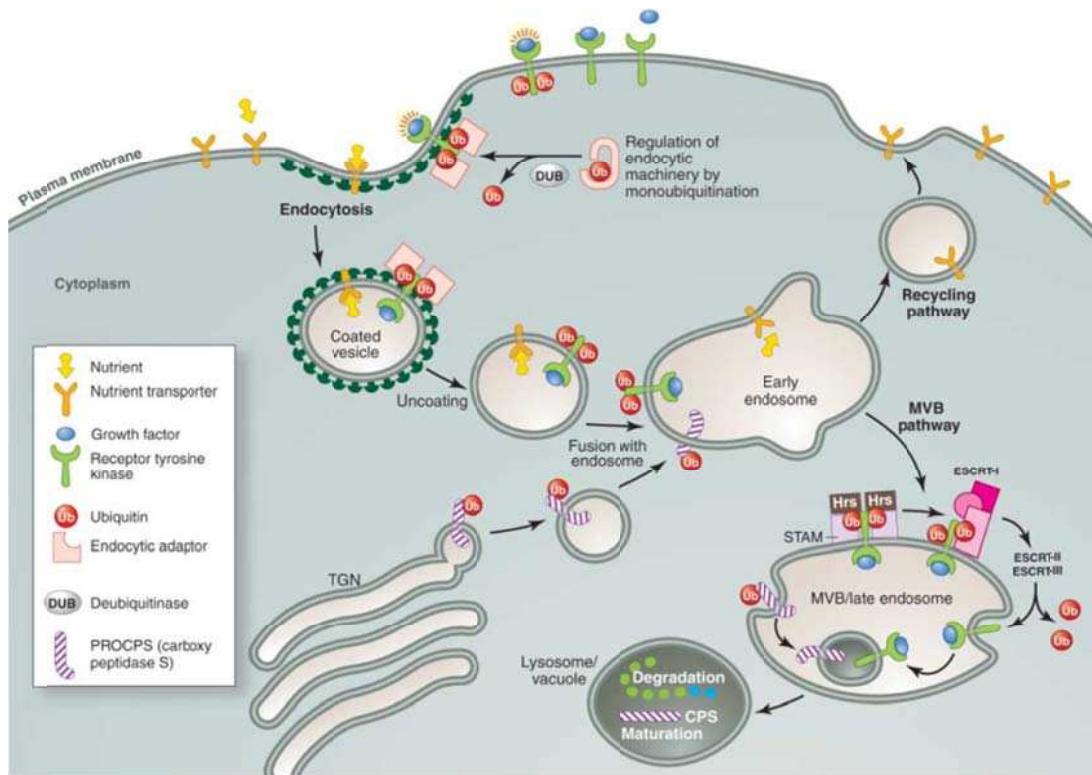


Figure 22 : Intervention du système ubiquitine/protéasome dans le métabolisme intraneuronal des récepteurs (Mukhopadhyay and Riezman, 2007)

L'ubiquitine joue un rôle majeur dans les voies de sécrétion et d'endocytose. De nombreuses protéines membranaires et des récepteurs sont ubiquitinylées sur leurs domaines cytoplasmiques. Dans les cellules animales, un signal peut entraîner l'endocytose des protéines membranaires ou des récepteurs par des vésicules à clathrines. L'ubiquitine agit également comme un signal pour la prise en charge par les corps multivésiculaires (MVBs), où l'ubiquitine est reconnue par Vps27/Hrs puis transmise vers le complexe ESCRT (Endosomal sorting complex required for transport). L'ubiquitine est retirée avant l'entrée dans les vésicules internes des MVBs : il y a déubiquitylation et l'ubiquitine est recyclée. Les protéines non-ubiquitinylées, tels que les transporteurs des éléments nutritifs, sont recyclées à la surface membranaire à partir des endosomes.

TGN, le réseau trans-Golgi; STAM, molécule adaptatrice de transduction du signal.

La dégradation des protéines par le système ubiquitine/protéasome est un processus endogène normal. Lorsque le système des protéines chaperones est défaillant, les protéines présentent des conformations aberrantes, la dégradation des protéines par le système ubiquitine/protéasome est augmentée et ces protéines ubiquitinylées sont adressées au protéasome.

I.C.3) Rôle du système ubiquitine-protéasome dans le contrôle des activités neuronales et les mécanismes de neurodégénérescence**I.C.3.a) Système ubiquitine-protéasome et contrôles des activités neuronales**

Depuis quelques années, de nombreux travaux ont montré que le système ubiquitine-protéasome intervient dans de nombreuses activités neuronales dans des conditions physiologiques expérimentales ou pathologiques diverses. Ces études démontrent que ces activités dépassent largement le cadre des mécanismes de dégradation classique des protéines et contribuent à la régulation des phénomènes de communications interneuronales en particulier à travers les interactions entre le protéasome et les molécules impliquées dans l'action des neurotransmetteurs, tels les récepteurs.

I.C.3.a.i) Adressage membranaire et dégradation des récepteurs aux neurotransmetteurs

À niveau neuronal, récemment, de nombreux travaux menés dans différents modèles expérimentaux ont montré « *in vitro* » et « *in vivo* » que l'activité du système ubiquitine-protéasome module la réactivité des neurones à différents neurotransmetteurs, et à des agents pharmacologiques apparentés, tels que le glutamate, les opiacés et le GABA (DiAntonio and Hicke, 2004; Citri et al., 2009), en contribuant à réguler le trafic intraneuronal de leurs récepteurs, en particulier leur abondance à la membrane plasmique, leur adressage et leur dégradation.

Ainsi, dans des neurones corticaux, le blocage de l'activité synaptique augmente l'ubiquitylation des récepteurs GABA-A et diminue leur expression à la membrane plasmique, par un mécanisme protéasome dépendant (destruction « *in situ* » au niveau du réticulum endoplasmique ERAD, ER-Associated Degradation). À l'inverse, la stimulation diminue l'ubiquitylation des récepteurs GABA-A, favorisant leur expression à la membrane. L'ubiquitylation des récepteurs GABA-A régule directement leur abondance membranaire, au niveau synaptique (présynaptique) (Saliba et al., 2007).

Le système ubiquitine/protéasome peut aussi intervenir dans l'endocytose des récepteurs glutamatergiques. Dans des cultures d'hippocampe, le blocage de l'activité du protéasome

empêche l'internalisation des récepteurs glutamatergiques GluR1 et GLuR2, sans modifier l'abondance des récepteurs à la membrane (Patrick et al., 2003). La stimulation des récepteurs glutamatergiques conduit à leur internalisation et à leur dégradation qui sont dépendantes d'une mono ou d'une ployubiquitylation (Patrick et al., 2003). De même, le co-traitement de neurones corticaux par des inhibiteurs du système ubiquitine-protéasome et par du glutamate diminue l'abondance des récepteurs glutamatergiques GluR2 à la membrane. Le glutamate induit la dégradation de GRIP-1 (glutamate receptor interacting protein 1) par le protéasome. GRIP-1 est une protéine d'échafaudage de la densité postsynaptique qui intervient dans l'adressage de GluR2 à la membrane synaptique, Ainsi, le protéasome régule indirectement l'abondance de GluR2 à la membrane (Guo and Wang, 2007).

I.C.3.a.ii) Plasticité synaptique

Le système ubiquitine-protéasome joue un rôle majeur dans la plasticité synaptique au niveau postsynaptique par différents mécanismes impliqués dans l'induction de la LTP (« la potentialisation à long terme ») et dans la régulation de la composition protéique de la densité postsynaptique, mais aussi au niveau présynaptique en modulant la taille et le nombre des vésicules et leur relargage (DiAntonio and Hicke, 2004; Tai and Schuman, 2008).

Les premières études qui ont montré un lien entre le système ubiquitine-protéasome et la plasticité synaptique ont été menées dans les neurones d'aplysie, qui possèdent des synapses modulées par des phénomènes similaires à la potentialisation à long et à court terme (Hegde et al., 1993). La stimulation par la sérotonine induit la LTP, qui conduit à l'accumulation d'AMPc (Byrne and Kandel, 1996) et active la protéine kinase A (PKA) (Hegde et al., 1997; Chain et al., 1999). La PKA est composé d'une sous-unité régulatrice et d'une sous-unité catalytique. La PKA est inhibée quand les deux sous-unités sont associées : lorsque l'AMPc se lie à la sous-unité régulatrice de la PKA, la sous-unité catalytique est libérée. Elle entre dans le noyau et active notamment CREB (cAMP-response-element-binding Protein) qui entraîne la transcription de gènes précoces. L'un de ces gènes précoces est l'hydrolase Ap-Uch (Aplysia ubiquitin C-terminal hydrolase), codant pour une enzyme de déubiquitylation qui favorise la dégradation de la sous-unité régulatrice de la PKA par le protéasome, permettant à la sous-unité catalytique d'être continuellement active (Hegde et al., 1997). L'altération de la Ap-Uch conduit à la perturbation de la LTP, en bloquant son induction (Hegde et al., 1997). De plus, l'inhibition du protéasome entraîne des changements à la fois pré et postsynaptique,

en augmentant le nombre de contacts synaptiques entre les deux neurones, la taille des neurites et l'amplitude de la potentialisation en augmentant la sensibilité au glutamate au niveau postsynaptique (Zhao et al., 2003).

Des études plus récentes, suggèrent que la plasticité synaptique est modulée par un équilibre complexe entre la synthèse protéique et la dégradation. A titre d'exemple, dans des modèles de tranches d'hippocampe de rat, la LTP est inhibée par des inhibiteurs du protéasome (Fonseca et al., 2006; Karpova et al., 2006), mais est restaurée avec un inhibiteur de la synthèse protéique, l'anisomycine (Fonseca et al., 2006). De manière intéressante, le traitement par l'anisomycine seul bloque également la LTP (Krug et al., 1984). Cependant, la coordination de la synthèse et de la dégradation dans la modulation de la plasticité synaptique reste inconnue.

Le système ubiquitine-protéasome régule également la transmission présynaptique. Par exemple, dans des cultures de neurones d'hippocampe, la taille et le nombre des vésicules de recyclage augmente au niveau présynaptique de 76% après 2 heures d'inhibition du protéasome, un effet qui est indépendant de la synthèse protéique.(Willeumier et al., 2006). Dans des tranches d'hippocampe de rat, l'inhibition du protéasome conduit à une augmentation de la fréquence des courants miniatures excitateurs postsynaptiques (Yao et al., 2007). Cette augmentation est en majorité abolie chez des animaux transgéniques qui sont knock-out pour SCRAPPER, une enzyme ubiquitine ligase E3 qui est exprimée à la membrane présynaptique (Yao et al., 2007). Un des substrats de SCRAPPER est RIM1 (Rab3-interacting molecule 1), un régulateur de la plasticité présynaptique. SCRAPPER et RIM1 régulent le relargage des vésicules présynaptiques. Ainsi, dans l'élément présynaptique, le système ubiquitine-protéasome régule la taille et le nombre de vésicules et leur relargage.

Le système ubiquitine-protéasome régule l'abondance des protéines impliquées dans la réponse postsynaptique, notamment les récepteurs glutamatergiques (cf ci-dessus) et des protéines de la densité postsynaptique (Sheng and Hoogenraad, 2007; Yi and Ehlers, 2007). Le blocage chronique des potentiels d'action par la tétrodoxine conduit à une augmentation des niveaux d'expression de certaines protéines de la densité postsynaptique (SHANK, NR2B and protéine phosphatase 1) et une diminution des niveaux d'expression d'autres (PSD95 (Postsynaptic density 95), NR2A, CaMKII α (calcium calmodulin-dependent protein kinase II α) (Ehlers, 2003). L'arrêt de la neurotransmission inhibitrice par la bicuculline (un

antagoniste GABA) induit des effets opposés (Ehlers, 2003). Un co-traitement avec un inhibiteur du protéasome bloque ces changements de composition protéique de la densité postsynaptique (Ehlers, 2003), démontrant l'importance du processus de protéolyse dans la restructuration de la synapse en réponse aux changements de l'activité neuronale.

I.C.3.a.iii) Activité électrique

Le système ubiquitine-protéasome intervient également dans le contrôle de l'activité électrique. Des travaux menés avec des mutants du protéasome dominants négatifs de la jonction neuromusculaire de drosophile (transmission glutamatergique), ont montré que l'augmentation de l'amplitude des courants postsynaptiques est directement corrélée à l'augmentation du nombre de récepteurs postsynaptiques au glutamate à la membrane (Haas et al., 2007). L'inhibition du protéasome provoque une stimulation de ces potentiels postsynaptiques récepteurs dépendants. Dans les neurones d'aplysie, l'inhibition du protéasome entraîne une augmentation de l'amplitude de la potentialisation en augmentant la sensibilité au glutamate au niveau postsynaptique (Zhao et al., 2003). De même, l'inhibition du protéasome dans des tranches d'hippocampe de rat conduit à l'augmentation de la fréquence des courants miniatures excitateurs postsynaptiques (Yao et al., 2007).

I.C.3.a.iv) Contrôle de la localisation intraneuronale du système ubiquitine-protéasome et de son activité par l'environnement en neurotransmetteurs.

L'activité neuronale et en particulier l'environnement en neurotransmetteurs module l'activité du protéasome en modifiant la distribution de ses sous-unités dans les différents compartiments intraneuronaux.

Ainsi, dans des neurones hippocampiques en culture, à l'état basal, le protéasome 19S est localisé dans les dendrites et les épines. Après dépolarisation, le protéasome 19S change de localisation en quelques minutes et provoque la translocation de sous-unités du protéasome des troncs dendritiques vers les épines (Bingol and Schuman, 2006). La même redistribution a été observée pour la sous-unité $\alpha 4$ de protéasome 20S, indiquant que la distribution des sous-unités 20S et 19S du protéasome est dépendante de l'activité neuronale (Bingol and Schuman, 2006). Le traitement avec un antagoniste des récepteurs NMDA bloque la translocation des sous-unités du protéasome après la dépolarisation, ce qui montre l'implication des récepteurs

NMDA dans les phénomènes de translocation. En effet, la stimulation directe des récepteurs NMDA provoque également la translocation de sous-unités du protéasome des troncs dendritiques vers les épines. De plus, la dépolarisation induit aussi une augmentation de 67% des niveaux d'ubiquitine dans les épines et dans le tronc 10 min après stimulation. Ces résultats montrent que la dégradation locale de protéines peut avoir lieu dans les épines et est dépendante de l'activation des récepteurs NMDA, ce qui permet de moduler localement la plasticité synaptique.

De plus, à l'état basal, dans les neurones corticaux en culture, le protéasome co-localise avec NAC1, un régulateur de la transcription induit par la cocaïne, dans le noyau des neurones. Sous bicuculline (antagoniste GABA), le protéasome est transloqué dans les épines dendritiques et dans la densité postsynaptique. Ceci est confirmé par l'absence de translocation du protéasome chez les souris KO pour NAC (Shen et al., 2007). Ces travaux montrent que NAC1 module la translocation du protéasome du noyau vers les épines dendritiques, suggérant que le recrutement de la protéolyse intervient dans le remodelage de la synapse.

I.C.3.b) Pathologie du système nerveux et système ubiquitine-protéasome et physiopathologie

Au niveau de l'ensemble du système nerveux, on commence à découvrir que le protéasome peut être impliqué dans des processus pathologiques, soit en raison d'anomalies de son fonctionnement, soit parce qu'il participe à des mécanismes intraneuronaux responsables de pathologie. L'exemple le plus documenté correspond aux mécanismes de neurodégénérescence (cf ci-dessous) mais on observe la contribution du protéasome à des (dys)régulations neuronales dans des situations aussi diverses que la dépendance aux opiacés, l'épilepsie ou les mécanismes d'analgésie (Ossipov et al., 2007; Yadav et al., 2007; Yang et al., 2008).

Le syndrome d'Angelman qui est un trouble sévère du développement neurologique (retard mental, déficit important de la parole...), se caractérise par une mutation de l'ubiquitine ligase E6-AP.(Kishino et al., 1997; Matsuura et al., 1997). Chez les souris mutantes pour E6-AP, il a été montré un déficit de la LTP hippocampique et de la mémoire dépendante du contexte (Jiang et al., 1998). L'inhibition du protéasome chez le rat bloque deux comportements qui

dépendent probablement de la LTP, le développement de mémoire à long terme (Lopez-Salon et al., 2001), et les douleurs neuropathiques (Moss et al., 2002).

Récemment, l'implication du système ubiquitine-protéasome a été révélée dans la dépendance aux drogues. Un récent travail reprend les conditions de stimulation chronique par la cocaïne (Sun and Wolf, 2009) et montre sur des co-cultures de neurones du noyau accumbens et du cortex préfrontal de rat, le traitement répété par la dopamine induit une augmentation des récepteurs GluR1 et GluR2 à la membrane (Wolf et al., 2004). L'inhibition du protéasome entraîne les mêmes effets. Cette augmentation de l'expression des récepteurs APMA à la surface est due à la synthèse protéique et à l'inhibition du système ubiquitine-protéasome. Ceci montre pour la première fois un lien indirect entre les récepteurs à la dopamine et l'activité catalytique du protéasome (Sun and Wolf, 2009).

En comparaison avec les récepteurs glutamatergiques (Citri et al., 2009; Sun and Wolf, 2009), les dyskinésies pourraient être dues à une réduction de l'activité catalytique du protéasome, après une stimulation chronique des récepteurs de la dopamine. Le système ubiquitine-protéasome pourrait être un mécanisme de rétrocontrôle qui pourrait agir de manière directe ou indirecte sur l'internalisation, le trafic et la dégradation des récepteurs dopaminergiques.

I.C.3.c) Protéasome et dégénérescence des neurones dopaminergique

Le système ubiquitine-protéasome joue un rôle majeur dans la protéolyse intracellulaire qui permet notamment la dégradation des protéines anormales ou surnuméraires. Cependant, parfois, la capacité de la cellule à dégrader ou à replier des protéines est dépassée et ainsi des molécules dénaturées ou partiellement repliées s'accumulent et tendent à s'agrégger. Cette défaillance peut résulter d'une mutation génétique, ou d'un stress cellulaire ou d'un affaiblissement des machineries de repliement ou de dégradation au cours du vieillissement (Friguet et al., 2000). Ce défaut du contrôle qualité de la cellule peut conduire à l'agrégation de protéines et entraîner leur accumulation, souvent sous une forme ubiquitinylée, oxydée et agrégé. Ce phénomène peut avoir des conséquences catastrophiques pour la viabilité de la cellule.

De très nombreuses maladies dont particulièrement les maladies neurodégénératives semblent dues à l'accumulation de protéines de structure anormale, ayant tendance à s'agréger induisant ainsi un gain de fonction毒ique pour la protéine mutée :

- Les maladies à expansion de polyglutamine, comme la maladie d'Huntington, sont associées à la présence d'agrégats d'huntingtine, constituant des inclusions protéiques dans les neurones des patients (DiFiglia et al., 1997).
- La maladie de Parkinson présente des structures spécifiques appelées corps de Lewy qui comportent des agrégats d' α -synucléine (Spillantini et al., 1998).
- La maladie d'Alzheimer est caractérisée par des plaques amyloïdes extracellulaires formés à partir de peptides A β 42 agrégés (Cole and Frautschy, 2006) ou de protéine Tau intracellulaire agrégée.
- Les maladies à prions présentent des accumulations de protéines prion caractéristiques. Pour la maladie de Creutzfeld Jacod, il s'agit de la version mutante de la protéine Prion PrP^{sc} (Prusiner, 1998).

Toutes ces maladies sont caractérisées par l'accumulation de protéines spécifiques de chaque pathologie (Taylor et al., 2002).

Dans la maladie de Parkinson, l'implication du système ubiquitine/protéasome a émergé après l'identification de différentes mutations localisées sur le gène codant pour la parkine (Kitada et al., 1998), un gène responsable d'une forme autosomique récessive de la maladie. En relation avec notre champ de recherche, il est à noter que cette forme qui apparaît de manière très précoce induit des dyskinésies sévères chez les jeunes parkinsoniens. Le gène de la parkine code pour l'enzyme E3 ubiquitine-ligase (Shimura et al., 2000) intervenant dans la voie du complexe ubiquitine-protéasome. Ces mutations touchant la parkine sont associées à une perte des neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* et du locus coeruleus. Les E3 ubiquitine-ligases catalysent la fixation de chaînes d'ubiquitine sur des protéines afin de signaler et entraîner leur dégradation par le protéasome. Plusieurs substrats de la parkine ont été mis en évidence dont l' α -synucléine (Petrucci et al., 2002). La perte de fonction de la parkine entraîne l'accumulation de ces substrats entraînant la mort neuronale.

De plus, l'implication du système ubiquitine/protéasome a aussi été mise en évidence après la découverte de mutations situées sur le gène de l'ubiquitine carboxy-terminale hydrolase (UCH-L1) (Leroy et al., 1998), responsable d'une forme autosomale dominante de la maladie de Parkinson. L'ubiquitine carboxy-terminale hydrolase est abondante dans le cerveau et dans

les corps de Lewy de patients parkinsoniens (Lowe et al., 1990). C'est une ubiquitine hydrolase impliquée dans le recyclage des chaînes polyubiquitylées en monomères d'ubiquitine et qui possède une activité ubiquitine-ligase non classique qui conduit à la formation de chaînes polyubiquitylées résistantes à la dégradation par le protéasome (Liu et al., 2002) Les mutations localisées sur ce gène entraînent la mort pour des neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta*.

Résultats

II) Résultats

II.A.) Article 1 : L'analyse pharmacologique révèle des altérations de la distribution neuronale du récepteur D1 de la dopamine dans un modèle rat analogue des dyskinésies L-dopa induites.

II.A.1) Résumé

Dans ce premier travail, nous avons eu pour objectif d'étudier en situation pathologique et de manière approfondie les relations entre l'apparition des dyskinésies L-dopa induites et les perturbations du trafic intraneuronal du récepteur D1 de la dopamine.

Différents travaux réalisés précédemment au sein de notre équipe, ont mis en évidence que le traitement chronique à la L-dopa, en condition de dénervation striatale, entraîne des altérations majeures du trafic intraneuronal du récepteur D1 de la dopamine et de sa signalisation dans les neurones cibles de la dopamine, les neurones épineux de taille moyenne. En effet, dans un premier temps, des études de binding, d'autoradiographique et d'hybridation *in situ* ont montré une hypersensibilisation des récepteurs D1 à la dopamine (Aubert et al., 2005). De plus, des études d'imagerie cellulaire en microscopie électronique ont révélé un recrutement massif du récepteur D1 de la dopamine à la membrane plasmique des neurones striataux et une perturbation du trafic intraneuronal suggérant un défaut d'endocytose après stimulation par son ligand naturel, la dopamine (Guigoni et al., 2007).

La majorité de ces études a été menée dans le modèle primate non-humain analogue des dyskinésies L-dopa induites (primate non-humain intoxiqué au MPTP). Malgré ses intérêts, ce modèle présente de nombreuses limites et reste insuffisant à lui seul pour réaliser une exploration approfondie des changements dans les mécanismes moléculaires conduisant à l'apparition des dyskinésies L-dopa-induites. C'est le cas en particulier à cause de son coût, de la complexité et de la lourdeur des expériences et des analyses morphologiques quantitatives en microscopie électronique qui avaient limité la portée des informations obtenues dans le travail mené par notre équipe et publié en 2007 (Guigoni et al., 2007). Ceci nous a conduits à choisir le modèle du rat présentant une déplétion dopaminergique striatale unilatérale par injection de 6-hydroxydopamine (6-OHDA).

Dans un premier temps, nous avons validé notre modèle d'étude en reproduisant dans le modèle rat analogue des dyskinésies, les quatre groupes expérimentaux qui peuvent être obtenus chez le primate non-humain et qui reproduisent l'histoire naturelle de la maladie de Parkinson chez l'homme : animal normal, animal traité par la 6-OHDA, animal traité par la 6-OHDA et traité chroniquement par la L-dopa (sans dyskinésie), et animal traité par la 6-OHDA, traité chroniquement par la L-dopa et développant des mouvements involontaires anormaux, analogues aux dyskinésies observées chez le primate non-humain et chez l'homme (Tableau 1). Nous avons dû pour notre travail associer différentes approches : analyses comportementales, études pharmacologiques et techniques d'immunohistochimie quantitative en microscopie électronique. Comme attendu, du côté lésé, dans les neurones striataux, les récepteurs D1 à la dopamine sont essentiellement présents à la membrane plasmique des corps cellulaires du striatum quels que soient les groupes, ce que confirment les études d'immunohistochimie quantitatives en microscopie électronique : les immunoparticules D1 sont majoritairement localisées à la face interne de la membrane plasmique des corps cellulaires et sont en faible abondance dans le cytoplasme quels que soient les groupes (Figure 1). La comparaison entre le côté lésé dépourvu de dopamine et le côté non lésé montre que la lésion seule ou le traitement par la L-dopa sans dyskinésie ne provoque aucun changement du côté lésé dans l'abondance du récepteur D1 ni à la membrane plasmique, ni dans le cytoplasme ou dans les différents compartiments subcellulaires que nous avons examiné, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, vésicules, corps multivésiculaires (Figure 2). En revanche, chez les rats dyskinétiques, la densité des récepteurs D1 présents à la membrane plasmique augmente de façon importante du côté lésé alors même qu'il n'existe pas de modification de leur abondance dans le cytoplasme (Figure 2).

Nous avons ainsi confirmé les résultats obtenus précédemment chez le primate non-humain : le récepteur D1 de la dopamine est anormalement surreprésenté à la membrane plasmique des neurones striataux chez le rat dyskinétique du côté lésé alors qu'il devrait être internalisé après stimulation par son ligand naturel, la dopamine, si les mécanismes de désensibilisation fonctionnaient normalement.

Nous avons ensuite cherché à vérifier si la capacité du récepteur D1 à s'internaliser était maintenue chez les rats dyskinétiques après stimulation par un puissant agoniste sélectif du D1, le SKF-82958. En microscopie optique, chez les animaux traités par la 6-OHDA et le SKF-82958 seul, les récepteurs D1 à la dopamine sont présents essentiellement dans le cytoplasme des neurones striataux, comme attendu. Ceci est confirmé en microscopie

électronique, chez les animaux traités conjointement par la L-dopa et l'agoniste D1 : les immunoparticules D1 sont abondants dans le cytoplasme, au niveau du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi, des corps multivésiculaires et de vésicules (Figure 1). L'analyse quantitative du nombre d'immunoparticules montre que du côté lésé, l'immunoréactivité D1 diminue à la membrane plasmique et augmente de manière significative dans le cytoplasme, après stimulation par l'agoniste D1 chez les rats dyskinétiques traités conjointement par la L-dopa et à l'agoniste sélectif D1 en comparaison aux rats dyskinétiques uniquement traités par la L-dopa (Figure 3).

Chez les rats dyskinétiques, l'administration supplémentaire d'un agoniste sélectif D1, provoque l'internalisation massive des récepteurs D1 démontrant que les récepteurs D1, accumulés à la membrane, ont gardé leurs capacités d'internalisation.

Sur la base de l'hypersensibilisation du récepteur D1 de la dopamine, nous nous sommes intéressés aux différents organites concernés par ces modifications. Après administration de l'agoniste D1, chez les animaux dyskinétiques, l'abondance des récepteurs D1 à la dopamine augmente dans les compartiments subcellulaires impliqués dans l'internalisation, le transport (+250% dans les vésicules) et la dégradation du récepteur D1 (+550% dans les corps multivésiculaires), en comparaison aux animaux non dyskinétique après la L-dopa et traités par l'agoniste D1, mais aussi dans les compartiments de synthèse protéique (+ 150% dans le réticulum endoplasmique) et de modification post-traductionnelle (+190% dans l'appareil de Golgi) (Figure 3).

Pour terminer, nous avons cherché à déterminer par quel mécanisme le récepteur D1 de la dopamine est maintenu à la membrane plasmique et en particulier si le récepteur D3 contribuait à cette présence. En effet, puisqu'une hétérodimérisation fonctionnelle entre les récepteurs D1 et D3 à la dopamine a été suggérée (Fiorentini et al., 2008; Marcellino et al., 2008) et que le récepteur D3 est surexprimé chez les animaux dyskinétiques (Le Moine and Bloch, 1996; Ridray et al., 1998), nous avons émis l'hypothèse que ce manque d'internalisation induit par la L-dopa pourrait être dû à une interaction entre les récepteurs D1 et D3 : leur co-activation par la L-dopa contribuerait à ancrer le récepteur D1 à la membrane plasmique. Nous avons donc testé l'effet d'un antagoniste sélectif du récepteur D3, sur la distribution des récepteurs D1. La comparaison entre le coté lésé versus non lésé montre que l'antagoniste D3 diminue significativement l'abondance des récepteurs D1 à la membrane plasmique du coté lésé chez les animaux dyskinétiques. En revanche, aucune modification

n'est observée dans le cytoplasme, ni dans les organelles. L'administration d'un antagoniste sélectif du récepteur D3, restaure en effet le niveau basal du récepteur D1 à la membrane plasmique, validant notre hypothèse (Figure 4). **Ces résultats suggèrent que l'activation du récepteur D3 par la dopamine contribuerait au maintien du récepteur D1 à la membrane.**

En conclusion, nous avons démontré dans cette étude que des altérations du trafic intraneuronal du récepteur D1 de la dopamine jouent un rôle central dans les dyskinésies L-dopa induites. Les récepteurs D1 à la dopamine sont anormalement ancrés à la membrane plasmique des neurones striataux bien que leur capacité d'internalisation soit conservée. Ces résultats ouvrent des perspectives de recherches futures afin de mieux comprendre ces perturbations pour promouvoir l'internalisation des récepteurs D1 dans les dyskinésies L-dopa induites.

II.A.2) Article 1

Pharmacological Analysis Demonstrates Dramatic Alteration of D1 Dopamine Receptor Neuronal Distribution in the Rat Analog of L-dopa-Induced Dyskinesia.

Amandine Berthet, Grégory Porras, Evelyne Doudnikoff, Holger Stark, Martine Cador, Erwan Bezard, et Bertrand Bloch.

The Journal of Neuroscience, Volume 29, Issue 15, Avril 2009, Pages 4829-35.

[doi:10.1523/JNEUROSCI.5884-08.2009](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5884-08.2009)

Pharmacological Analysis Demonstrates Dramatic Alteration of D₁ Dopamine Receptor Neuronal Distribution in the Rat Analog of L-DOPA-Induced Dyskinesia

Amandine Berthet,¹ Grégory Porras,¹ Evelyne Doudnikoff,¹ Holger Stark,² Martine Cador,¹ Erwan Bezard,^{1*} and Bertrand Bloch^{1*}

¹Université Victor Segalen–Bordeaux 2, Centre National de la Recherche Scientifique, Bordeaux Institute of Neuroscience, UMR 5227, 33076 Bordeaux Cedex, France, and ²Johann Wolfgang Goethe-Universität, Biozentrum, 60438 Frankfurt am Main, Germany

We have associated behavioral, pharmacological, and quantitative immunohistochemical study in a rat analog of L-DOPA-induced dyskinesia to understand whether alterations in dopamine receptor fate in striatal neurons may be involved in mechanisms leading to movement abnormalities. Detailed analysis at the ultrastructural level demonstrates specific alterations of dopamine D₁ receptor (D₁R) subcellular localization in striatal medium spiny neurons in L-DOPA-treated 6-hydroxydopamine-lesioned rats with abnormal involuntary movements (AIMs). This includes exaggerated D₁R expression at the plasma membrane. However, D₁R retains ability of internalization, as a challenge with the potent D₁R agonist SKF-82958 induces a strong decrease of labeling at membrane in animals with AIMs. Since a functional cross talk between D₁R and D₃R has been suggested, we hypothesized that their coactivation by dopamine derived from L-DOPA might anchor D₁R at the membrane. Accordingly, cotreatment with L-DOPA and the D₃R antagonist ST 198 restores normal level of membrane-bound D₁R. Together, these results demonstrate that AIMs are related to abnormal D₁R localization at the membrane and intraneuronal trafficking dysregulation, and suggest that strategies aiming at disrupting the D₁R–D₃R cross talk might reduce L-DOPA-induced dyskinesia by reducing D₁R availability at the membrane.

Introduction

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder caused by the degeneration of nigral neurons that provide dopamine to the striatum (Ehringer and Hornykiewicz, 1960). The still most effective symptomatic therapy is the dopamine precursor L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA). Long-term treatment leads to L-DOPA-induced dyskinesia (LID) or involuntary aimless movements (Cotzias et al., 1969). Loss of dopamine in PD induces complex modifications in signaling, with numerous pathways showing exaggerated responses to dopaminergic stimulation in the dopamine-depleted striatum (Bezard et al., 2001a; Jenner, 2008). Chronic L-DOPA treatment further distorts the signaling. Existing evidence suggests that supersensitivity of D₁ [dopamine D₁ receptor (D₁R)] and D₂ dopamine receptors is one of the molecular mechanisms underlying LID (Bezard et al., 2001a; Jenner, 2008).

Homologous desensitization effectively terminates signaling

by G-protein-coupled receptors (GPCR), thereby controlling their activity. In theory, the acute activation of dopamine receptors by their direct agonist should provoke a dramatic modification of their subcellular distribution in neurons, including plasma membrane depletion and internalization in the cytoplasm (Dumartin et al., 1998). In LID, however, at odds with this predicted behavior, we reported that elevated membrane expression and reduced internalization of D₁R occurs in the striatum of dyskinetic monkeys (Guigoni et al., 2007), suggesting that LID are associated with deficiencies in the D₁R desensitization and trafficking (Bezard et al., 2005; Guigoni et al., 2007). Interestingly, expression level of the D₃R in the dorsal motor-related striatum correlates with experimental mouse (Gross et al., 2003), rat (Bordet et al., 1997), and primate (Bézard et al., 2003) analogs of dyskinesia. D₁R and D₃R are coexpressed by the striatonigral medium spiny neurons (Le Moine and Bloch, 1996; Ridray et al., 1998) and have recently been shown to directly interact (Fiorentini et al., 2008) through an intramembrane D₁R–D₃R cross talk (Marcellino et al., 2008).

Therefore, we hypothesized that the lack of L-DOPA-induced D₁R internalization may be caused by the concomitant stimulation of both D₁R and D₃R by their natural ligand dopamine. We here test this hypothesis in the rat analog of LID, i.e., the L-DOPA-induced abnormal involuntary movements (AIMs) in unilaterally 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-lesioned animals (Cenci et al., 1998), investigating the cellular and subcellular distribution of D₁R at electron microscopic level in a comprehensive behavioral pharmacological study.

Received Dec. 11, 2008; revised March 10, 2009; accepted March 11, 2009.

This work was supported by an Agence Nationale de la Recherche grant (B.B., E.B.) and by a Ministère de l'Enseignement et de Recherche grant (A.B.). We thank Service Commun de Microscopie for technical assistance at electron microscope; A. Fayoux, S. Lelegouach, and J.-G. Hervouet for animal care; and P. Gonzalez and A. Estager for general technical assistance. The Université Victor Segalen–Bordeaux 2 and the Centre National de la Recherche Scientifique provided the infrastructural support.

*E.B. and B.B. contributed equally to this work, and both should be considered as senior authors.

Correspondence should be addressed to Bertrand Bloch, CNRS UMR 5227, 146 rue Léon Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France. E-mail: bertrand.bloch@u-bordeaux2.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.5884-08.2009

Copyright © 2009 Society for Neuroscience 0270-6474/09/294829-07\$15.00/0

Table 1. Experimental protocol with timelines, drug treatments, and behavioral consequences

	6-OHDA	Benserazide	L-DOPA	AIMs	SKF-82958	ST 198	AIMs
Timing (day)	0	21–30	21–30	29	30	30	30
Groups							
1 (<i>n</i> = 4)	+	+	—	No	—	—	—
2 (<i>n</i> = 4)	+	+	+	No	—	—	—
3 (<i>n</i> = 4)	+	+	+	Yes	—	—	+
4 (<i>n</i> = 4)	+	+	—	No	+	—	—/+
5 (<i>n</i> = 4)	+	+	+	No	+	—	+
6 (<i>n</i> = 4)	+	+	+	Yes	+	—	+
7 (<i>n</i> = 4)	+	+	+	Yes	—	+	+

On day 30, all animals received the last vehicle injection +/− L-DOPA. D₃R antagonist ST 198 was injected 60 min before killing (group 7); D₁R agonist SKF-82958 was injected 45 min before killing (groups 4, 5, and 6). All animals were killed 60 min after L-DOPA, the last administration.

Materials and Methods

Experimental design. Adult male Sprague Dawley rats (Charles River Laboratories), weighing 175–200 g at the beginning of the experiment, were used. They were maintained under standard laboratory conditions. Experiments were performed in accordance with French (87-848, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt) and European Economic Community (86-6091 EEC) guidelines for the care of laboratory animals and were approved by the Ethical Committee of Centre National de la Recherche Scientifique, Région Aquitaine.

On day 0 of the protocol (Table 1), unilateral dopamine deprivation of the striatum was obtained by 6-OHDA (3 µg/µl; Sigma) injection in the right medial forebrain bundle (2.5 µl at anterior-posterior = −3.7 mm, medial-lateral = +1.7 mm, and dorso-ventral = −8 mm, relative to bregma) (Meissner et al., 2006; Schuster et al., 2008) in rats pretreated with citalopram (1 mg/kg, i.p.; Sigma), an inhibitor of serotonin reuptake and with desipramine hydrochloride (20 mg/kg, i.p.; Sigma), an inhibitor of noradrenergic reuptake (Torres et al., 2003). Animals displaying both an impaired stepping test (Olsson et al., 1995; Winkler et al., 2002; Pioli et al., 2008), measured on days 18–20 (supplemental Fig. 1, available at www.jneurosci.org as supplemental material), and a loss of tyrosine hydroxylase-immunopositive fibers in the striatum >95% (Bezard et al., 2001b; Guigoni et al., 2005), assessed after completion of all experiments (supplemental Fig. 1, available at www.jneurosci.org as supplemental material), were retained for final analysis.

From day 21 till day 30, rats were treated once daily with benserazide (15 mg/kg, i.p.; Sigma) and either vehicle (12 rats) or L-DOPA (3 mg/kg, i.p.; Sigma) (65 rats) (Table 1). This dose of L-DOPA was similar to the ED₅₀ value used for AIMs induction in rats [3.2 mg/kg plus benserazide (12.5 mg/kg, i.p.)] (Puttermann et al., 2007). In such conditions, L-DOPA induces a gradual development of dyskinetic-like AIMs. On day 29, 21 rats were scored as nondyskinetic (score = 0.71), and 44 rats were scored as dyskinetic (score = 8.3) after observation by a trained investigator as described previously (Meissner et al., 2006; Schuster et al., 2008, 2009) using a validated rating scale (Cenci et al., 1998; Lundblad et al., 2002). On day 30, a subset of the above animals received an additional acute challenge of either the D₁R agonist SKF-82958 (2 mg/kg, i.p.; Sigma; 15 min after L-DOPA) or the D₃R antagonist ST 198 (30 mg/kg, p.o.; University of Frankfurt) (Mach et al., 2004) together with L-DOPA. Doses were chosen for their respective ability to induce D₁R internalization (Dumartin et al., 1998) and to reduce dyskinesia severity (Bézard et al., 2003). AIMs score was rated again during the last 15 min before terminal procedure. All animals were killed 60 min after L-DOPA administration. A total of seven experimental groups was thus considered (Table 1). Four animals were randomly selected in each group for ultrastructural analysis.

Immunohistochemical detection of D₁R. D₁R was detected by immunohistochemistry at the light and electron microscopic level according to previously described and validated procedures (Caillé et al., 1996; Dumartin et al., 1998) using a monoclonal antibody raised in rat against a 97 aa sequence corresponding to the C terminus of the human D₁R (Sigma) (Levey et al., 1993; Hersch et al., 1995). Chloral hydrate-anesthetized (400 mg/kg, i.p., VWR) rats were perfused with 2% paraformaldehyde (PFA)/0.2% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer at

pH 7.4. Brains were quickly removed, left overnight in 2% PFA at 4°C, and cut into 60-µm-thick frontal sections with vibratome. To enhance the penetration of the immunoreagents, the sections were equilibrated in a cryoprotectant solution, freeze-thawed, and stored in PBS with 0.03% sodium azide. For light microscopy observation, tissue sections of striatum were treated by immunoperoxidase technique using the tyramide signal amplification method (New England Nuclear) as described previously (Guigoni et al., 2007) or the avidin–biotin complex revealed by the glucose oxidase-DAB-nickel method (Shu et al., 1988). For electron microscopy observation, D₁R was detected by the pre-embedding immunogold technique as described previously (Caillé et al., 1996; Dumartin et al., 1998, 2000; Guigoni et al., 2007). After immunodetection, the vibratome sections were postfixed, dehydrated, and included in resin (Durcupan ACM; Fluka). Serial ultrathin sections were cut with a Reichert Ultracut S, contrasted with lead citrate and examined with Hitachi H-7650 microscope.

Quantitative analysis of immunogold experiments. Abundance of D₁R in the different subcellular compartments was analyzed from immunogold-treated sections at the ultrastructural level (Dumartin et al., 1998, 2000; Guigoni et al., 2007). The analysis was performed on digital images obtained with a computer linked directly to charge-coupled device camera on the electron microscope at a final magnification of 8000–12,000 using the MetaMorph software (version 4.6r5; Universal Imaging). The immunogold particles were identified and counted in association with five compartments: plasma membrane, rough endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, endosome-like small vesicles (Dumartin et al., 1998), and multivesicular bodies, which are organelles known as marker of the degradative lysosomal pathway (Bernard et al., 2006; Piper and Katzmann, 2007; Hanyaloglu and von Zastrow, 2008). The measures were performed on 25 perikarya per animal with four animals per group and expressed as the number of immunoparticles per 100 µm of membrane, per 100 µm² of total cytoplasmic surface and the number of immunoparticles associated with each of the five different subcellular compartments per 100 µm² of cytoplasmic surface.

Statistical analysis. For multiple comparisons, depending on the number of factors, a one-way ANOVA (Kruskal–Wallis test) or a three-way ANOVA were followed, if allowed, by *post hoc* *t* tests corrected for multiple comparisons. All data were normally distributed, and significance levels of *t* test comparisons were adjusted for inequality of variances when appropriate. These analyses were completed using STATA program (Intercooled Stata 9.0; Stata Corporation). A probability level of 5% (*p* < 0.05) was considered statistically significant.

Results

Overall D₁R distribution in parkinsonian animals

D₁R immunostaining at both light and electron microscopic levels showed typical localization in striatal medium spiny neurons in the vehicle-injected 6-OHDA-lesioned animals (Fig. 1). At the light microscopic level, D₁R was located mostly at the plasma membrane, whatever group considered, with the noticeable exception of SKF-82958-treated groups, that demonstrated prominent cytoplasmic localization (Fig. 1A–E) as expected from our previous experiments (Caillé et al., 1996; Dumartin et al., 1998,

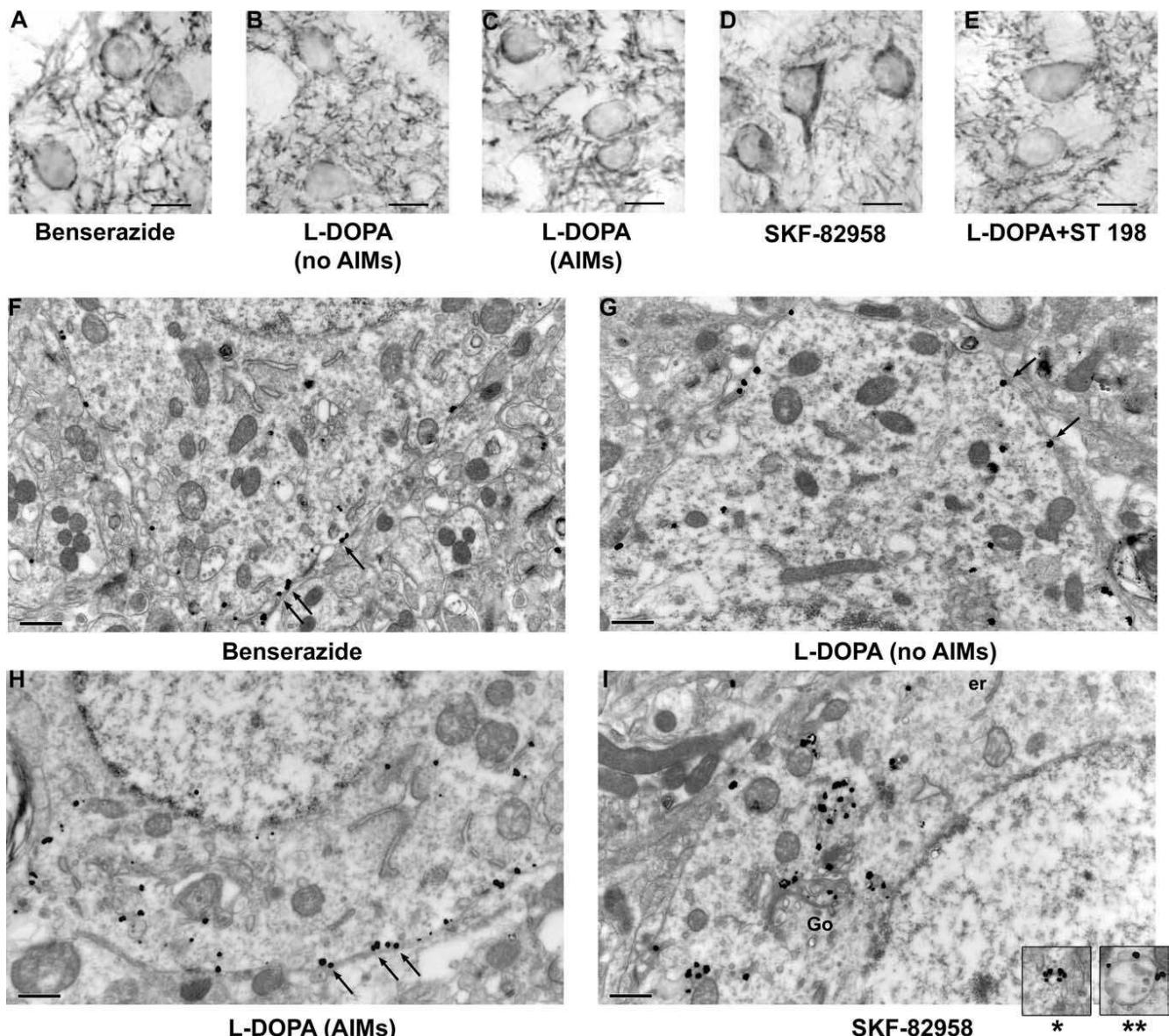


Figure 1. Detection of D₁R immunoreactivity at light and electron microscopic levels in striatal medium spiny neurons of 6-OHDA unilaterally lesioned rats. All animals bear a 6-OHDA lesion. **A–E**, Light microscopy, Avidin–biotin DAB Nickel technique (scale bar, 10 μ m). **A**, Control (benserazide only); **B**, L-DOPA treated without AIMs; **C**, L-DOPA-treated with AIMs; **D**, SKF-82958 treated; **E**, combination of L-DOPA and ST 198. D₁R immunoreactivity is mostly located at plasma membrane of cell bodies and in the neuropil in all situations, except after SKF-82958 where immunoreactivity has prominent cytoplasmic localization. **F–I**, Electron microscopy, Immunogold technique (scale bar, 0.5 μ m). **F**, Control (benserazide only); **G**, L-DOPA treated without AIMs; **H**, L-DOPA treated with AIMs; **I**, combination of L-DOPA and SKF-82958. D₁R immunoreactivity shows prominent localization at plasma membrane in all situations (**F–H**, arrows) but after combination of L-DOPA and SKF-82958 (**I**) where D₁R immunoreactivity is prominently localized in cytoplasmic organelles (er, endoplasmic reticulum; Go, Golgi apparatus). Insets in **I** show labeling at the periphery of vesicles (*) and multivesicular bodies (**).

2000). Ultrastructural analysis confirmed that, in vehicle-injected 6-OHDA-lesioned animals (group 1), the majority of immunogold particles were located at the inner side of the plasma membrane (61.2%) of the cell bodies. D₁R was present in low abundance in cytoplasm (38.8%), restricted mostly to the endoplasmic reticulum (30.1%) and the Golgi apparatus (6.2%) (Fig. 1*F*).

Quantitative analysis of D₁R localization at the ultrastructural level in subcellular compartments demonstrated several discrete changes in D₁R subcellular distribution depending on pharmacological treatments (Figs. 2, 3).

Dramatic increase of D₁R at the plasma membrane in lesioned side of rats with AIMs

Quantitative analysis at the ultrastructural level demonstrated a dramatic and specific increase in D₁R immunoreactivity at the

plasma membrane in lesioned side of L-DOPA-treated rats with AIMs (group 3) compared with their unlesioned side ($p < 0.05$) (Fig. 2*A*). Such an increase in D₁R abundance at plasma membrane was significantly different from both the vehicle-injected 6-OHDA-lesioned (group 1; $p < 0.05$) and the nondyskinetic L-DOPA-treated 6-OHDA-lesioned rats (group 2; $p < 0.05$) (Fig. 2*A*). Indeed, in these two groups, D₁R abundance at membrane was not modified in lesioned side (Fig. 2*A*). Whatever group considered, D₁R abundance did not change in cytoplasm and organelles (Fig. 2*B*).

AIMs are associated with high abundance of membrane-bound D₁R that retains a relative capability of internalization
These data suggested that AIMs are related to a recruitment of D₁R at membrane, thereby confirming our previous data col-

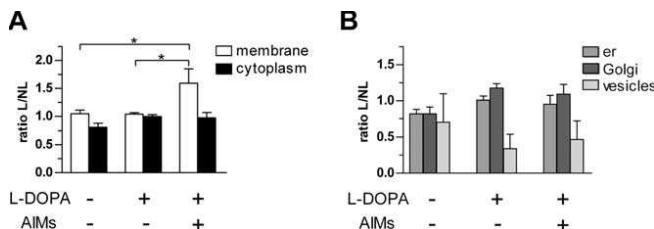


Figure 2. Effect of L-DOPA during D₁R subcellular distribution in striatal neurons. Ratio L/NL (mean \pm SEM) represents the number of immunoparticles in lesioned side (L) versus nonlesioned (NL) side at the plasma membrane [Kruskal–Wallis (KW) = 7.423; $p < 0.05$], in the cytoplasm [KW = 4.269; not significant (ns); **A**], and in organelles (**B**) (er, endoplasmic reticulum; KW = 0.199, ns; Golgi, KW = 0.105, ns; vesicles, KW = 0.675, ns). *indicates a significant difference between related groups; $p < 0.05$; Mann–Whitney *post hoc* test.

lected in monkeys (Guigoni et al., 2007). Such aberrant behavior for a GPCR required further pharmacological analysis. We, therefore, tested the ability of the specific D₁R agonist SKF-82958 to induce homologous desensitization in these L-DOPA-treated animals.

Quantitative analysis of D₁R localization at the ultrastructural level in lesioned striatum demonstrated several discrete changes in D₁R subcellular distribution specifically related to presence of L-DOPA-induced AIMs, after chronic L-DOPA treatment associated or not with acute SKF-82958 injection. Total D₁R immunoreactivity in striatal neurons of dopamine-deprived striatum did not change after L-DOPA (groups 2 and 3) or SKF-82958 alone (group 4) but was increased when both drugs were injected (groups 5 and 6) (Fig. 3B). As expected, dopamine receptor stimulation by L-DOPA or by SKF-82958 decreased D₁R immunoreactivity at the plasma membrane in all conditions of stimulation, compared with control benserazide group (group 1), with the noticeable exception of the group with L-DOPA-induced AIMs (group 3) (Fig. 3C). Indeed, D₁R abundance at the plasma membrane in animals with L-DOPA-induced AIMs was not decreased, whereas it was in animals without L-DOPA-induced AIMs. Interestingly, SKF-82958 challenge unraveled more subtle differences. Animals of groups 5 and 6 differentiated by their AIMs status prior to SKF-82958 challenge, with group 5 animals presenting no AIMs, whereas group 6 did (Table 1). The more dyskinetic they were before SKF-82958, the higher the D₁R membrane abundance remains compared with group 4 animals that were challenged with SKF-82958 only ($p < 0.05$) (Fig. 3C). Together, these data suggest that D₁R in L-DOPA-treated brain retains the ability to internalize at a degree that correlates with occurrence of AIMs (the more AIMs the less forced internalization).

AIMs are also associated with alterations of intraneuronal D₁R localization and impaired internalization

Analysis of D₁R within the cytoplasm expectedly not only mirrored the membrane localization but unraveled further disturbances. Indeed, stand-alone or combined treatment with L-DOPA and SKF-82958 increased cytoplasmic D₁R immunoreactivity in all conditions compared with control benserazide group (group 1), with the noticeable exception of group with L-DOPA-induced AIMs (group 3) (Fig. 3D). Greater increase was achieved when SKF-82958 was coadministered (Fig. 3D). Indeed, in the cytoplasm of animals with L-DOPA-induced AIMs, D₁R did not increase (compared with benserazide group), whereas it was more abundant in animals without L-DOPA-induced AIMs ($p < 0.05$). Interestingly, SKF-82958 challenge unraveled more subtle differences. Animals of groups 5 and 6 differentiated by

their AIMs status prior to SKF-82958 challenge, with group 5 animals presenting no AIMs, whereas group 6 did (Table 1). The more dyskinetic they were before SKF-82958, the higher the D₁R cytoplasm abundance increases compared with group 4 animals (that were challenged with SKF-82958 only) and between them ($p < 0.05$) (Fig. 3C). Detailed counting in several organelles (Fig. 3D1–D4) confirmed these specific differences related to AIMs. The more dyskinetic they were before SKF-82958, the higher the D₁R abundance is in the endoplasmic reticulum (+29.3%; $p < 0.05$) (Fig. 3D1), the Golgi complex (+88.4%; $p < 0.05$) (Fig. 3D2), the vesicular compartment (+149.5%; $p < 0.05$) (Fig. 3D3), and the multivesicular bodies (+424%; $p < 0.05$) (Fig. 3D4). Together, these data suggest that D₁R in L-DOPA-treated brain (1) does not internalize if further challenged with L-DOPA but (2) display greater internalization when challenged with D₁R agonist, as D₁R overall availability has dramatically increased (Fig. 3B).

Disruption of D₁R–D₃R cross talk by D₃R antagonist normalizes D₁R membrane-bound abundance in rats with AIMs

D₁R-positive neurons coexpress D₃R, which expression levels dramatically increase after L-DOPA treatment in dopamine-depleted dorsal striatum (Bordet et al., 1997; Bézard et al., 2003). In addition, D₁R and D₃R directly interact through an intramembrane cross talk (Marcellino et al., 2008), suggesting that the natural ligand of those receptor, i.e., dopamine, would coactivate them, whereas receptor-specific ligands would not. We thus hypothesized that the lack of L-DOPA-induced D₁R internalization in dyskinesia is caused by the concomitant stimulation of both D₁R and D₃R. To address that question, we tested the effect of the specific D₃R antagonist ST 198 (Bézard et al., 2003) coadministered with L-DOPA during D₁R subcellular distribution in dyskinetic 6-OHDA-lesioned rats. ST198, as well as other specific D₃R antagonist such as S33084, have been shown to reduce dyskinesia severity in rodent and nonhuman primate analog of Parkinson's disease (Bézard et al., 2003; Visanji et al., 2008), thereby confirming a class effect. Accordingly, ST198 coadministered with L-DOPA reduced AIMs by 22.1% in the 15 min window of behavioral observation immediately before terminal procedure ($p = 0.07$; paired *t* test of area under curve). The short duration of the observation period required by the experimental design prevented data from reaching statistical significance, but the AIM reduction is in full agreement with the decrease in dyskinesia observed at the same time point with D₃ antagonists (Bézard et al., 2003; Visanji et al., 2008) that then develops in statistical significance at later time points. Quantitative analysis at the ultrastructural level demonstrated that coadministration of ST 198 with L-DOPA decreased significantly D₁R abundance at plasma membrane to a level identical to both the nondyskinetic L-DOPA-treated animals and the vehicle-injected animals ($p < 0.05$) (Fig. 4A). No significant modification was observed in the cytoplasm or in organelles after ST 198 injection (Fig. 4B). These data suggest that D₃R anchors D₁R at membrane in dyskinetic animals.

Discussion

The present data show that AIMs are related to D₁R overexpression at the plasma membrane associated with intraneuronal trafficking dysregulation including organelles involved in biosynthesis, packaging, and degradation, namely endoplasmic reticulum, Golgi complex, and vesicles. We show that D₁R retains its ability to internalize as the potent D₁R agonist SKF-82958 promotes

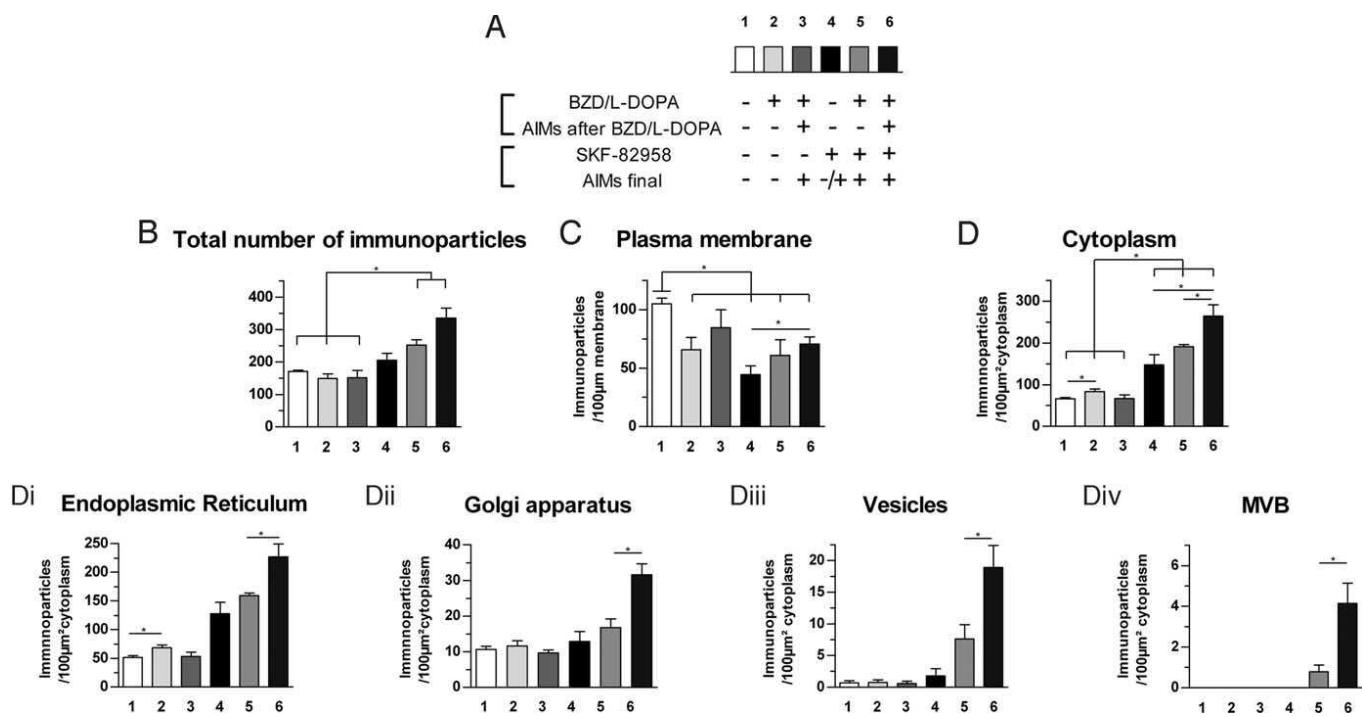


Figure 3. Relationship between D₁R subcellular distribution and AIMs: effect of D₁R agonist. Data (mean \pm SEM) were collected on the 6-OHDA-lesioned side. **A**, Experimental details of the six groups showing the pharmacological treatments and their behavioral consequences. Number of D₁R immunoparticles (**B**) per neuronal cell body ($F_{(1,23)} = 11.6, p < 0.01$), per 100 μm^2 of plasma membrane ($F_{(1,23)} = 5.5, p < 0.05$) (**C**), and per 100 μm^2 of cytoplasm ($F_{(1,23)} = 34.4, p < 0.001$) (**D**). The subcellular distribution in cytoplasmic organelles is further broken down into (**Di**) endoplasmic reticulum ($F_{(1,22)} = 39.4, p < 0.001$), (**Dii**) Golgi apparatus ($F_{(1,23)} = 8.3, p < 0.01$), (**Diii**) vesicles ($F_{(1,23)} = 8.4, p < 0.01$), and (**Div**) multivesicular bodies ($F_{(1,23)} = 4.9, p < 0.05$). *indicates a significant difference between related groups; $p < 0.05$, Mann–Whitney post hoc test.

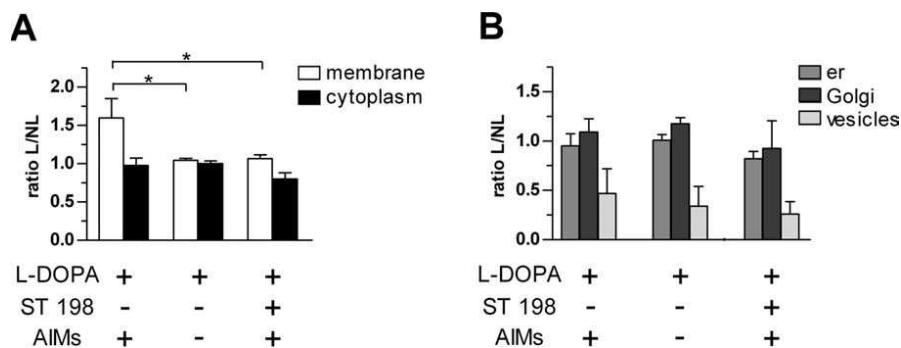


Figure 4. Effect of D₃R antagonist ST-198 during D₁R subcellular distribution in striatal neurons. Ratio L/NL (mean \pm SEM) represents the number of immunoparticles in lesioned side (L) versus nonlesioned (NL) side at the plasma membrane [Kruskal–Wallis (KW) = 7.423, $p < 0.05$], in the cytoplasm [KW = 3.5, not significant (ns)] (**A**), and in organelles (**B**) (er, endoplasmic reticulum; KW = 0.167, ns; Golgi, KW = 0.437, ns; vesicles, KW = 0.716, ns). *indicates a significant decrease compared with L-DOPA-treated dyskinetic rats; $p < 0.05$, Mann–Whitney post hoc test.

membrane depletion in chronically L-DOPA-treated 6-OHDA-lesioned rats, with a magnitude of induced-internalization related to AIMs occurrence prior to SKF-82958 challenge. We further show that this aberrant presence at the plasma membrane of medium spiny neurons is controlled by D₁R–D₃R interactions as coadministration of the specific D₃R antagonist ST 198 with L-DOPA normalizes membrane-bound D₁R abundance.

AIMs are linked to D₁R overexpression at plasma membrane

Dyskinetic chronically L-DOPA-treated 6-OHDA-lesioned rats showed an overrepresentation of D₁R at the plasma membrane of striatal medium spiny neurons. On the contrary, denervation alone or combined with a L-DOPA treatment that does not provoke AIMs has no effect on membrane abundance. These data

substantiate previous limited information obtained in dyskinetic monkeys showing both an increased D₁R expression at membrane (Guigoni et al., 2007) and a relative decrease in the protein machinery of the homologous desensitization (Bezard et al., 2005). The relationship between D₁R membrane abundance and motor abnormalities fits with the main pathophysiological hypothesis of LID placing D₁R supersensitivity at the cornerstone of the phenomenon (Bezard et al., 2001a; Jenner, 2008). Such overexpression at membrane is, however, not exclusive of other mechanisms. Further stimulation using the D₁R agonist SKF-82958 shows that, if D₁R does not internalize spontaneously under L-DOPA in dyskinetic animals, it retains the ability to internalize. Such experiments evidence suggests that AIMs are not caused by the inability of D₁R to internalize, and consequently to desensitize, but rather by its active maintenance at membrane.

...and to D₁R trafficking dysregulation

Distribution analysis in subcellular compartments shows that specific abnormalities in D₁R intraneuronal localization are associated with AIMs. These abnormalities are apparent with the sole L-DOPA treatment but are clearly unraveled by SKF-82958 stimulation suggesting that AIMs are associated with a latent dysregulation of D₁R trafficking. Combined treatment with L-DOPA and SKF-92958 has additive effects resulting into an increase in D₁R content in all cytoplasmic compartments. In such conditions, the important rise in endoplasmic reticulum, Golgi

complex, and vesicular system associated with overexpression of membrane-bound receptor strongly suggest that D₁R biosynthetic steps, involving translation and packaging, contribute directly to D₁R supersensitivity. The dyskinetic rats have initially more D₁R at the membrane. Although D₁R internalizes under dopamine agonist stimulation, D₁R is nevertheless more retained at the plasma membrane than in the nondyskinetic rats comparably challenged. The dyskinetic rats also present a greater increase in D₁R in the endoplasmic reticulum, the Golgi complex, vesicles, and multivesicular bodies under L-DOPA-SKF-82958 association than the nondyskinetic ones. These results are consistent with our previous data showing specific increase in both D₁R expression and sensitivity in dyskinetic monkeys (Aubert et al., 2005). A complementary and nonexclusive hypothesis is that AIMs are linked to increased biosynthesis and degradation of D₁R (compared with the situation in nondyskinetic rats) associated to a lesser sensitivity to homologous desensitization by its natural agonist, dopamine. That this decreased desensitization capability is caused by decreased bioavailability of the protein machinery, e.g., arrestins and GPCR-regulated kinases (Bezard et al., 2005), or by a modification of the D₁R, such as receptor oligomerization (Kong et al., 2006), remains an open question.

Nevertheless, since the electron microscopic detection of cytoplasmic vesicles does not differentiate between endocytic and exocytic vesicles, the important rise of immunogold positive particles in vesicles after L-DOPA-SKF-82958 association may reflect (1) an increased membrane delivery through exocytic vesicles and/or (2) an increased internalization through endocytic vesicles. The dramatic augmentation of multivesicular bodies under L-DOPA-SKF-82958 treatment supports the occurrence of the latter pathway and extends it to increased D₁R degradation in the cytoplasm after internalization, since multivesicular bodies are markers of the lysosomal pathway (Bernard et al., 2006; Piper and Katzmann, 2007; Hanyaloglu and von Zastrow, 2008). An all-inclusive concept might well be that dyskinesia are related to an increased D₁R turn-over resulting into decreased D₁R half-life in medium spiny neurons.

A key role for D₃R in maintaining D₁R at membrane

Since D₁R and D₃R directly interact through an intramembrane cross talk (Marcellino et al., 2008) and that the D₁R-positive neurons coexpress D₃R (Le Moine and Bloch, 1996; Ridray et al., 1998), we hypothesized that the lack of L-DOPA-induced D₁R internalization in dyskinesia is caused by the concomitant stimulation of both D₁R and D₃R. The release of D₁R internalization when using D₃R antagonist ST 198 in combination with L-DOPA (Fig. 4) firmly substantiates and extends previous pharmacological, behavioral, and anatomical data suggesting functionally relevant important D₃R–D₁R interactions in neurons of the dorsal striatum. Although a role for the D₃R itself in LID pathophysiology has been suggested (Bordet et al., 1997; Bézard et al., 2003) culminating with demonstration that both D₃R partial agonist and antagonists decrease dyskinesia in primate (Bézard et al., 2003), the exact mechanism by which modulation of D₃R activity was affecting medium spiny activity remained shadowy. The existence of a direct intramembrane D₁R–D₃R cross talk (Marcellino et al., 2008) offers an explanation both for the previous behavioral data and for the present data. The L-DOPA-derived dopamine would bind to both D₁R and D₃R, anchoring D₁R to membrane in both dyskinetic rats (present data set) and monkeys (Guigoni et al., 2007), two animal models into which D₃R is highly increased (Bordet et al., 1997; Bézard et al., 2003). Antagonizing the D₃R releases D₁R from the plasma membrane. Not

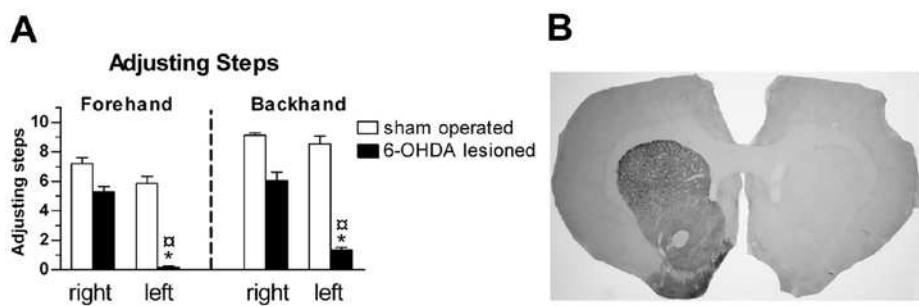
only this result demonstrates for the first time the physiological (ensuring dopamine receptor availability) and pathophysiological role (too much D₁R at membrane because of increased D₃R expression) of the cross talk, but it also provides a mechanistic explanation for the reduction in dyskinesia severity after D₃R antagonist treatment.

Together, these results further support the hypothesis that D₁R fate in medium spiny neurons during dyskinesia induction and occurrence is under multiple influences and can be modulated by pharmacological approaches. Further studies are now needed for investigating the offered antidyskinetic therapeutic possibilities by disrupting the dopamine receptor cross talks and/or by modulating D₁R fate at different levels.

References

- Aubert I, Guigoni C, Håkansson K, Li Q, Dovero S, Barthe N, Bioulac BH, Gross CE, Fisone G, Bloch B, Bezard E (2005) Increased D1 dopamine receptor signalling in levodopa-induced dyskinesia. *Ann Neurol* 57:17–26.
- Bernard V, Décosas M, Liste I, Bloch B (2006) Intraneuronal trafficking of G-protein-coupled receptors in vivo. *Trends Neurosci* 29:140–147.
- Bezard E, Brotchie JM, Gross CE (2001a) Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: potential for new therapies. *Nat Rev Neurosci* 2:577–588.
- Bezard E, Dovero S, Prunier C, Ravenscroft P, Chalon S, Guilloteau D, Crossman AR, Bioulac B, Brotchie JM, Gross CE (2001b) Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 21:6853–6861.
- Bézard 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.
- Bezard E, Gross CE, Qin L, Gurevich VV, Benovic JL, Gurevich EV (2005) L-DOPA reverses the MPTP-induced elevation of the arrestin2 and GRK6 expression and enhanced ERK activation in monkey brain. *Neurobiol Dis* 18:323–335.
- 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.
- Caillé I, Dumartin B, Bloch B (1996) Ultrastructural localization of D1 dopamine receptor immunoreactivity in rat striatonigral neurons and its relation with dopaminergic innervation. *Brain Res* 730:17–31.
- Cenci MA, Lee CS, Björklund 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.
- Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R (1969) Modification of Parkinsonism—chronic treatment with L-dopa. *N Engl J Med* 280:337–345.
- Dumartin B, Caillé I, Gonon F, Bloch B (1998) Internalization of D₁ dopamine receptor in striatal neurons *in vivo* as evidence of activation by dopamine agonists. *J Neurosci* 18:1650–1661.
- Dumartin B, Jaber M, Gonon F, Caron MG, Giros B, Bloch B (2000) Dopamine tone regulates D1 receptor trafficking and delivery in striatal neurons in dopamine transporter-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1879–1884.
- 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.
- Fiorentini C, Busi C, Gorruso E, Gotti C, Spano P, Missale C (2008) Reciprocal regulation of dopamine D1 and D3 receptor function and trafficking by heterodimerization. *Mol Pharmacol* 74:59–69.
- Gross CE, Ravenscroft P, Dovero S, Jaber M, Bioulac B, Bezard E (2003) Pattern of levodopa-induced striatal changes is different in normal and MPTP-lesioned mice. *J Neurochem* 84:1246–1255.
- Guigoni C, Li Q, Aubert I, Dovero S, Bioulac BH, Bloch B, Crossman AR, Gross CE, Bezard E (2005) Involvement of sensorimotor, limbic, and associative basal ganglia domains in L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia. *J Neurosci* 25:2102–2107.
- 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.

- Hanyaloglu AC, von Zastrow M (2008) Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48:537–568.
- 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.
- Jenner P (2008) Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat Rev Neurosci* 9:665–677.
- Kong MM, Fan T, Varghese G, O'dowd BF, George SR (2006) Agonist-induced cell surface trafficking of an intracellularly sequestered D1 dopamine receptor homo-oligomer. *Mol Pharmacol* 70:78–89.
- Le Moine C, Bloch B (1996) Expression of the D3 dopamine receptor in peptidergic neurons of the nucleus accumbens: comparison with the D1 and D2 dopamine receptors. *Neuroscience* 73:131–143.
- Levey AI, Hersch SM, Rye DB, Sunahara RK, Niznik HB, Kitt CA, Price DL, Maggio R, Brann MR, Ciliax BJ (1993) Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8861–8865.
- Lundblad M, Andersson M, Winkler C, Kirik D, Wierup N, Cenci MA (2002) Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 15:120–132.
- Mach UR, Hackling AE, Perachon S, Ferry S, Wermuth CG, Schwartz JC, Sokoloff P, Stark H (2004) Development of novel 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline derivatives and closely related compounds as potent and selective dopamine D3 receptor ligands. *Chembiochem* 5:508–518.
- Marcellino D, Ferré S, Casadó V, Cortés A, Le Foll B, Mazzola C, Drago F, Saur O, Stark H, Soriano A, Barnes C, Goldberg SR, Lluis C, Fuxe K, Franco R (2008) Identification of Dopamine D1–D3 Receptor Heteromers: Indications for a role of synergistic D1–D3 receptor interactions in the striatum. *J Biol Chem* 283:26016–26025.
- Meissner W, Ravenscroft P, Reese R, Harnack D, Morgenstern R, Kupsch A, Klitgaard H, Bioulac B, Gross CE, Bezard E, Boraud T (2006) Increased slow oscillatory activity in substantia nigra pars reticulata triggers abnormal involuntary movements in the 6-OHDA-lesioned rat in the presence of excessive extracellular striatal dopamine. *Neurobiol Dis* 22:586–598.
- Olsson M, Nikkhah G, Bentlage C, Björklund A (1995) Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *J Neurosci* 15:3863–3875.
- Pioli EY, Meissner W, Sohr R, Gross CE, Bezard E, Bioulac BH (2008) Differential behavioral effects of partial bilateral lesions of ventral tegmental area or substantia nigra pars compacta in rats. *Neuroscience* 153:1213–1224.
- Piper RC, Katzmann DJ (2007) Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:519–547.
- Puttermann DB, Munhall AC, Kozell LB, Belknap JK, Johnson SW (2007) Evaluation of levodopa dose and magnitude of dopamine depletion as risk factors for levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther* 323:277–284.
- Ridray S, Griffon N, Mignon V, Souil E, Carboni S, Diaz J, Schwartz JC, Sokoloff P (1998) Coexpression of dopamine D1 and D3 receptors in islands of Calleja and shell of nucleus accumbens of the rat: opposite and synergistic functional interactions. *Eur J Neurosci* 10:1676–1686.
- 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.
- Schuster S, Doudnikoff E, Rylander D, Berthet A, Aubert I, Ittrich C, Bloch B, Cenci MA, Surmeier DJ, Hengerer B, Bezard E (2009) Antagonizing L-type Ca(2+) channel reduces development of abnormal involuntary movement in the rat model of L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia. *Biol Psychiatry* 65:518–526.
- Shu SY, Ju G, Fan LZ (1988) The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci Lett* 85:169–171.
- Torres GE, Gainetdinov RR, Caron MG (2003) Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat Rev Neurosci* 4:13–25.
- Visanji NP, Fox SH, Johnston T, Reyes G, Millan MJ, Brotchie JM (2008) Dopamine D(3) receptor stimulation underlies the development of L-DOPA-induced dyskinesia in animal models of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. Advance online publication. Retrieved March 24, 2009. doi:10.1016/j.nbd.2008.11.010.
- Winkler C, Kirik D, Björklund A, Cenci MA (2002) L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of parkinson's disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiol Dis* 10:165–186.



Supplementary Figure 1. Validity of 6-OHDA unilateral lesion. (A) Effect of unilaterally 6-OHDA-induced lesion in the MFB on adjusting steps in forehand ($KW=52.31$; $p<0.0001$) and backhand ($KW=69.48$; $p<0.0001$) directions. Data are expressed as mean \pm S.E.M. * denotes a significant difference with the sham-operated animals ($p<0.0001$) while \diamond denotes a significant difference with the own right paw ($p<0.0001$); Mann-Whitney post-hoc test. (B) Representative example of striatal TH immunostaining of 6-OHDA-lesioned animals. The cut on the upper right cortex was made to identify the right hemisphere during section processing.

II.B.) Article 2 : L'altération de l'activité du protéasome médiée par le récepteur D1 de la dopamine dans les neurones épineux de taille moyenne contribue aux dyskinésies L-dopa induites

II.B.1) Résumé

L'objectif de ce second travail a été d'étudier les relations entre l'activité du protéasome dans le striatum et le comportement du récepteur D1 de la dopamine dans différents modèles approchant les conditions de l'apparition des dyskinésies chez le rat, la souris et chez le primate non-humain.

L'altération du protéasome a largement été décrite dans l'étiologie de la maladie de Parkinson, dans les mécanismes de dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta*, et notamment avec l'identification de différentes mutations localisées sur le gène de la parkine (Kitada et al., 1998), qui code pour l'enzyme E3 ubiquitine-ligase (Shimura et al., 2000) intervenant dans la voie du complexe ubiquitine-protéasome : la perte de fonction de la parkine entraîne l'accumulation de ces substrats entraînant la mort neuronale. Cependant, depuis quelques années, différents travaux indiquent que la protéolyse intracellulaire dépendante du protéasome joue un rôle majeur dans l'activité de populations neuronales dans des conditions physiologiques ou expérimentales qui n'entraînent pas leur dégénérescence (cf introduction). En particulier, on constate dans de nombreux travaux que l'activité du protéasome est capitale dans la modulation de l'expression de différents récepteurs aux neurotransmetteurs dans des conditions très diverses, normales, expérimentales et pathologiques (Patrick et al., 2003; Guo and Wang, 2007).

L'absence de données sur le rôle du protéasome dans le champ de la régulation de l'expression des récepteurs à dopamine et des dyskinésies L-dopa induites nous a amenés à nous interroger sur la contribution du protéasome à la régulation de l'expression du récepteur D1. Sur la base des travaux de la littérature, nous avons envisagé une possible déficience de l'activité catalytique du protéasome dans les mécanismes de régulation de l'abondance à la membrane du récepteur D1, susceptible de contribuer à cette accumulation anormale à la membrane plasmique des neurones striataux.

Pour aborder cette question, nous avons dans un premier temps mesuré l'activité catalytique du protéasome au niveau du striatum, en exploitant le modèle de référence de la maladie de Parkinson, le primate non-humain traité par le MPTP. Nous avons utilisé des peptides fluorogéniques spécifiques des trois activités catalytiques du protéasome : chymotrypsine-like, trypsine-like et peptidylglutamyl-peptide hydrolase. Nos résultats révèlent que chez des animaux dyskinétiques, l'activité catalytique du protéasome et plus particulièrement, l'activité chymotrypsine est fortement réduite, alors que les activités trypsine et PGPH ne sont pas modifiées (Figure 1). Cette diminution est bien spécifique au striatum : dans une autre région cérébrale, également innervée par la dopamine, le cortex préfrontal, aucun changement n'est observé (Figure supplémentaire 2). De plus, nous avons vérifié que cette baisse de l'activité chymotrypsine est due à l'association d'une déplétion dopaminergique et d'une stimulation dopaminergique. En effet, dans le modèle souris transgénique knock-out pour le transporteur de la dopamine (DAT^{-/-}) chez laquelle existe une hyperdopaminergie constitutionnelle, aucune anomalie de l'activité catalytique du protéasome n'est reportée (Figure supplémentaire 3).

Ainsi cette diminution d'activité du protéasome dans le striatum apparait bien due à la combinaison d'une déplétion dopaminergique et d'une hyperdopaminergie.

Pour visualiser et analyser plus en détailler cette déficience de l'activité chymotrypsine, nous avons exploité une souche de souris transgénique avec un gène marqueur de l'activité du protéasome, afin d'avoir un indice fonctionnel de l'activité protéasomale. Ces souris présentent un transgène Ub^{G76V}-GFP qui code pour une protéine GFP (green fluorescent protein) fusionnée à une ubiquitine mutée. Brièvement, lorsque l'activité catalytique du protéasome est réduite par l'administration d'un inhibiteur du protéasome ou par une altération de son activité catalytique, la protéine GFP s'accumule dans les cellules et devient détectable par immunohistochimie. Nous avons vérifié que ce modèle est bien fonctionnel car c'est la première fois que l'activité protéasomale du striatum est étudiée. Nous avons utilisé des nouveaux nés transgéniques, nous avons prélevé leur cerveau et coupé des tranches de striatum de 200µm que nous avons incubé avec un inhibiteur du protéasome, le bortezomib. Comme attendu, lorsque les tranches de striatum sont incubées avec l'inhibiteur du protéasome, la protéine GFP devient visible dans les neurones striataux (Figure 2a et Figure 2b). Nous avons ensuite effectué une lésion dopaminergique unilatérale par injection de 6-OHDA dans le faisceau médian du télencéphale chez des souris transgéniques adultes et un traitement chronique au bensérazide associé à la L-dopa dans des conditions connues pour entraîner des mouvements involontaires anormaux, analogues des dyskinésies. Ces souris

dyskinétiques présentent une forte accumulation de GFP dans les neurones épineux de taille moyenne au niveau du striatum, ce qui n'est pas le cas des souris lésées par la 6-OHDA et traitées uniquement au bensérazide (Figure 2c, Figure 2d, Figure 2f et Figure 2g).

Ces données indiquent que dans un striatum avec une déplétion dopaminergique, l'administration de L-dopa entraîne une inhibition fonctionnelle de l'activité catalytique du protéasome dans les neurones épineux de taille moyenne.

Puisque notre hypothèse de travail met en avant une relation entre récepteur D1 de la dopamine et altération de l'activité catalytique de protéasome, nous avons traité ces souris transgéniques lésées par la 6-OHDA avec un agoniste sélectif D1, le SKF-82958. Nous avons pu montrer que l'accumulation de GFP est encore plus intense dans les neurones épineux de taille moyenne par rapport aux souris traitées par la L-dopa (Figure 2e et Figure 2h). Nous sommes ensuite retournés vers notre modèle d'étude plus simple, le rat lésé par la 6-OHDA et traité par la L-dopa, présentant des dyskinésies où nous avons mesuré l'activité catalytique du protéasome au niveau du striatum. Nos résultats révèlent que l'activité chymotrypsine-like est diminuée d'environ de 30% chez les animaux dyskinétiques du côté lésé et chez les animaux lésés par la 6-OHDA et traités par l'agoniste sélectif D1 (Figure 2i). En utilisant des cultures primaires de striatum de rat, nous avons confirmé nos données : comme attendu, l'activité chymotrypsine est réduite de manière significative après un traitement par la dopamine, mais également après traitement avec un agoniste sélectif D1, le SKF 82958, alors qu'un agoniste D2 est sans effet (figure 2l et Figure 2m).

L'ensemble de ces données suggère un rôle spécifique pour le récepteur D1 de la dopamine dans la diminution de l'activité catalytique du protéasome.

Dans une dernière partie, nous avons effectué des immunomarquages du récepteur D1 de la dopamine sur des cultures primaires de striatum ainsi que des analyses d'immunohistochimie quantitative. Comme attendu, la stimulation par un agoniste D1 induit une redistribution spectaculaire de l'immunomarquage D1 de la membrane à l'intérieur du cytoplasme dans des endosomes précoces. Le co-traitement par un agoniste D1 et un inhibiteur du protéasome limite de manière importante cette internalisation du récepteur D1. En revanche, l'inhibition du protéasome seul, n'a eu aucun effet sur la répartition du récepteur D1 qui reste à la membrane (Figure 3).

Ces résultats confirment que la stimulation du récepteur D1 est le point de départ qui contribue à l'inhibition de l'activité chymotrypsine du protéasome. Cela suggère que

cette inhibition peut contribuer à une localisation anormale du récepteur D1 de la dopamine à la membrane plasmique des neurones striataux par une diminution de sa dégradation au cours des processus de désensibilisation homologue.

En conclusion, nous avons montré dans ce travail que les dyskinésies L-dopa induites sont associées à une réduction spécifique de l'activité catalytique du protéasome au niveau du striatum. Cette diminution peut être due à l'activation du récepteur D1 de la dopamine et participe à l'abondance anormale du récepteur à la membrane plasmique des neurones striataux. Une étude plus approfondie de la relation entre la signalisation dopaminergique et les mécanismes de régulation du protéasome dans les neurones épineux de taille moyenne du striatum est nécessaire et permettrait d'ouvrir de nouvelles perspectives pour réduire la sévérité des dyskinésies L-dopa induites.

II.B.2) Article 2

Dopamine D1 receptor-mediated alteration of proteasome activity in medium spiny neurons contributes to L-dopa-induced dyskinesia.

Amandine Berthet, Erwan Bezard¹, Gregory Porras, Stefania Fasano, Pedro Barroso-Chinea, Marie-Laure Thiolat, Marika Nosten, Jérôme Baufreton, Qin Li, Bertrand Bloch et Marie-Laure Martin-Negrier.

(soumis)

Dopamine D1 receptor-mediated alteration of proteasome activity in medium spiny neurons contributes to L-dopa-induced dyskinesia

Amandine Berthet¹, Erwan Bezard^{1,2#}, Gregory Porras¹, Stefania Fasano³, Pedro Barroso-Chinea¹, Marie-Laure Thiolat¹, Marika Nosten⁴, Jérôme Baufreton¹, Qin Li², Bertrand Bloch^{1#} and Marie-Laure Martin-Negrier¹

¹ Université Victor Segalen-Bordeaux 2, Centre National de la Recherche Scientifique, Bordeaux Institute of Neuroscience, UMR 5227, Bordeaux, France; ² Institute of Lab Animal Sciences, China Academy of Medical Sciences, Beijing, China; ³ Institute of Experimental Neurology, Division of Neuroscience, San Raffaele Foundation and University Milano, Italy; ⁴ INSERM UMRS-952/CNRS UMR 7224, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.

#: Corresponding authors Erwan Bezard and Bertrand Bloch, CNRS UMR 5227, Université Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France. E-mail : erwan.bezard@u-bordeaux2.fr; bertrand.bloch@u-bordeaux2.fr.

Manuscript information: 21 text pages; 3 figures; 4 supplementary data **Abstract:** 109 words;

Introduction: 220 words; **Text (intro to discussion):** 2098 words

Abstract

The proteasome plays a central role in modulating neuronal response through regulation of neurotransmitter receptor intraneuronal fate. The dysregulation of dopamine D1 receptor (D1R) trafficking is associated with L-dopa-induced dyskinesia (LID), a major complication of L-dopa treatment in Parkinson's disease. We here show that L-dopa-induced dyskinesia associated with chronic L-dopa treatment in experimental rodent and monkey parkinsonism is associated with a striatum-specific decrease in proteasome catalytic activity. We demonstrate that such decreased proteasome catalytic activity (i) results from D1R activation and (ii), in return, participates in D1R abnormal trafficking, i.e. its exaggerated cell surface abundance. Our data demonstrate the hitherto unknown contribution of impaired proteasomal activity during LID.

Introduction

In Parkinson's disease (PD), dyskinesia occur as a debilitating effect of long-term treatment by L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa)¹. Experimental evidence demonstrates that dyskinesia is due to complex alterations in dopamine (DA) signaling in neurons of DAdeprived striatum^{2, 3}, especially through dysregulation of DA D1 receptor (D1R) intraneuronal trafficking, subcellular localization and desensitization⁴⁻⁶.

Recent studies have demonstrated that modulation of proteasome activity dramatically influences the neuronal response to neurotransmitters and related drugs^{7, 8} through interactions with neurotransmitter receptor biosynthesis and activity^{8, 9}. Impaired proteasome activity has especially been demonstrated to contribute to pathological conditions involving chronic stimulation of neurotransmitter receptors such as opiate dependence and chronic pain. Interestingly, L-dopa-induced dyskinesia (LID) in PD, associated with chronic stimulation of DA receptors, correlates with a counterintuitive membranous localization of D1R^{5, 6}. Such impairment in receptor fate suggests the contribution of an altered proteasome function, a key feature that has yet to be explored. We sought whether interactions between DA signaling and proteasome may be part of the neuronal events that lead to dyskinesia. We used "in vitro" and "in vivo" models to demonstrate impaired proteasome activity under the control of DA signaling in animal models of dyskinesia, specifically in the striatal medium spiny neurons. Our findings demonstrate a hitherto unknown pathological mechanism linking DA receptor and proteasome catalytic activity.

Results

Striatum-specific impairment of proteasome activity in dyskinetic parkinsonian monkeys

Our central hypothesis posits that catalytic activity might be impaired in the L-dopa-treated DA-depleted striatum. We therefore measured the chymotrypsin-like, trypsin-like and peptidylglutamyl-peptide hydrolase (PGPH)-like activities of 20S proteasome, which cleave proteins at hydrophobic, basic and acidic residues, respectively, in the gold standard model of PD and LID. Catalytic activities were measured in striatal homogenates of normal and MPTP-treated macaque monkeys that received vehicle or L-dopa either acutely or chronically (Supplementary data 1). All assays were performed in the absence and presence of the proteasome inhibitor, MG132, to distinguish proteolysis by the proteasome from alterations by other co-purifying proteases. Chymotrypsin-like activity was decreased only in the dyskinetic MPTP-lesioned monkeys ($p < 0.05$; Fig. 1a) in the comparison to control animals,

that they were exposed or not to L-dopa ($p<0.05$ vs. vehicle-treated, acute L-dopa treated, chronic L-dopa treated). By contrast, trypsin-like activity showed a modest but significant increase after chronic L-dopa exposure in both control and MPTP-lesioned monkeys ($p<0.05$; Fig. 1b). The fact that chronic L-dopa administration in control monkeys also led to an increase in trypsin-like activity rules out a possible involvement of this increase in dyskinesia pathophysiology, as neither normal monkeys nor normal humans exhibit abnormal involuntary movements even after chronic administration. Finally, PGPH-like activity was not affected (Fig. 1C).

We wondered if such impairments were striatum-specific or if they could extend to other brain areas. The same assays performed in the very same monkey population demonstrated that this effect was restricted to the striatum since no change in chymotrypsin-like, trypsinlike or PGPH activities was observed in other DA-innervated brain regions, such as the superior frontal gyrus or prefrontal cortex (Supplementary data 2).

Next, we hypothesized that the dysfunctions in catalytic activities were due to the association of chronic L-dopa treatment with DA depletion. Since this hypothesis could not be directly tested, we tested the reverse hypothesis, i.e. that hyperdopaminergia in a non DA-depleted striatum would not affect catalytic activity. Proteasome catalytic activities were thus measured in a mouse model of hyperdopaminergia without degeneration of the nigrostriatal pathway, namely the DA transport knock-out mouse ($\text{DAT}^{-/-}$). Indeed $\text{DAT}^{-/-}$ mice are known to exhibit a 500% increase in DA extracellular content compared to $\text{DAT}^{+/+}$ mice^{10, 11}. As no change in proteasomal activity was observed in the striatum of $\text{DAT}^{-/-}$ mice compared to both $\text{DAT}^{+/+}$ and $\text{DAT}^{+/-}$ (Supplementary data 3), we concluded that the alterations observed in the monkey model of PD and LID were (i) striatum-specific and (ii) the consequence of the chronic L-dopa exposure superimposed upon DA depletion.

Dopamine receptor stimulation decreases proteasome catalytic activity in medium spiny neurons of hemiparkinsonian UbG76V-GFP transgenic mice

To confirm and localize chymotrypsin-like changes as a marker of proteasome impairment, we developed experiments to measure and visualize the functional index of proteasome activity. We used a proteasome activity reporter mouse line, the $\text{Ub}^{\text{G76V}}\text{-GFP}$ reporter¹², to address this question. The $\text{Ub}^{\text{G76V}}\text{-GFP}$ transgene was designed with a chicken beta-actin promoter upstream of a green fluorescent protein (GFP) fused to a mutant ubiquitin moiety (UbG76V)¹². Although transcripts of the $\text{Ub}^{\text{G76V}}\text{-GFP}$ fusion gene could be detected at baseline, the G76V substitution prevents removal of the ubiquitin moiety leading to efficient

ubiquitination and proteasomal degradation of the fusion protein in these tissues. Administration of proteasome inhibitors or any impairment of proteasome activity thus leads to GFP accumulation in the cells¹². We first checked that such impairment could be detected in the striatum. Control brain slices from newborn Ub^{G76V}-GFP mice were “ex vivo” treated with DMSO or bortezomib, a potent proteasome inhibitor in clinic use for multiple myeloma¹³. While DMSO treatment (Fig. 2a) showed no GFP accumulation, bortezomib treatment led to strong GFP accumulation in striatal medium spiny neurons (Fig. 2b).

Adult Ub^{G76V}-GFP mice were then made hemiparkinsonian by 6-OHDA injection in the medial forebrain bundle. Chronically L-dopa-treated 6-OHDA-lesioned Ub^{G76V}-GFP mice displayed severe abnormal involuntary movements, the rodent analog of dyskinesia¹⁴. These dyskinetic mice showed a strong accumulation of GFP in the medium spiny neurons of their DA-depleted striatum (Fig. 2d&g) while benserazide-treated 6-OHDA-lesioned Ub^{G76V}-GFP mice did not present any alteration of proteasome activity (Fig. 2c&f). This data set clearly indicates that L-dopa administration upon a DA-depleted striatum leads to a functional inhibition of proteasome catalytic activity in medium spiny neurons.

L-dopa-induced decrease in striatal proteasomal activity is mimicked by D1R agonist

As our working hypothesis involved an intricate relationship between DA D1R and impairment of proteasomal activity, we further investigated this question in the same 6-OHDA-lesioned Ub^{G76V}-GFP mice in which GFP accumulation in medium spiny neurons was even more intense when 6-OHDA-lesioned Ub^{G76V}-GFP mice were treated with the D1R full agonist SKF-82958 (Fig. 2e&h).

We then turned to the L-dopa-treated 6-OHDA-lesioned rat model of PD and LID, using the biochemical approach used in the monkey and DAT mouse models, to assay the chymotrypsin-like, trypsin-like and PGPH activities of 20S proteasome in striatal homogenates of vehicle-treated 6-OHDA-lesioned rats and L-dopa-treated 6-OHDA-lesioned rats. Interestingly, only the chymotrypsin-like activity was decreased in L-dopa-treated 6-OHDA-lesioned rats ($p<0.05$; Fig. 2i) but not the trypsin-like (Fig. 2j) and PGPH activities (Fig. 2k), thereby confirming the data collected in the Ub^{G76V}-GFP mice. A third group of 6-OHDA-lesioned rats was treated with the D1R full agonist SKF-82958. These SKF-82958-treated 6-OHDA-lesioned rats displayed the exact same impairment of catalytic activities with a significant decrease in chymotrypsin-like activity ($p<0.05$; Fig. 2i) compared to vehicle-treated 6-OHDA-lesioned animals, but not in trypsin-like (Fig. 2j) and PGPH (Fig. 2k) activities.

In our animal experiments, we primarily used L-dopa and not DA, as DA does not cross the blood-brain barrier. Using rat primary striatal cell cultures^{15, 16}, we now show that chymotrypsin-like activity is significantly impaired after DA treatment (Fig. 2l; p < 0.0001). Interestingly, while application of the D1R agonist SKF-82958 mimicked the DA-induced decrease in chymotrypsin-like activity (Fig. 2m; p < 0.05), application of the DA D2 receptor (D2R) agonist quinpirole failed to inhibit this activity (Fig. 2m) as well as the trypsin-like and PGPH-like activities (not shown). Altogether, these data therefore assign a key role to D1R in mediating the impairment of proteasome activity.

Proteasome inhibition dramatically limits D1R internalization

The hypothesis that proteasomal activity might be impaired arises from the observation that D1R is anchored on the membrane in dyskinetic L-dopa-treated 6-OHDA-lesioned rats⁶ and MPTP-treated monkeys⁵. In the same rat primary striatal cell culture, D1R stimulation by the D1R full agonist SKF-82958 induces a dramatic redistribution of D1R immunolabeling corresponding to an internalization of the receptor in early endosomes, as expected and previously reported^{15, 16} (Fig. 3b&d&e). Interestingly, however, such agonist-induced endocytosis was significantly impaired when proteasome activity was simultaneously inhibited by co-application of bortezomib, as evidenced by the reduced decrease in D1R immunopositive puncta density in neurites of striatal neurons (Fig. 3c&d&e). Proteasome inhibition alone, however, had no effect on the D1R distribution as compared to the control situation (Fig. 3d&e). These data therefore suggest that D1R stimulation is the “*primum movens*” in leading, first, to inhibition of the chymotrypsin-like catalytic activity of the proteasome. This may in turn contribute to a membrane localization of D1R through reduction of its degradation in the course of the homologous desensitization process.

Discussion

We show here that L-dopa-induced dyskinesia associated with chronic L-dopa treatment in rodent and monkey experimental parkinsonism is associated with a striatum-specific decrease in proteasome catalytic activity. We demonstrate that such decreased proteasome catalytic activity (i) results from D1R activation and (ii) participates in turn in D1R abnormal trafficking, i.e. its exaggerated cell surface abundance and signaling⁴⁻⁶.

Various studies have documented the contributions of proteasome activity in neurotransmission control. Conditions of interplay between proteasome and neurotransmission appear complex with multiple targets, variable with neurotransmitters and is still poorly

understood. For example, proteasome function affects synaptic plasticity such as LTP and LTD⁷ and regulates endocytosis, signaling and downregulation of various neurotransmitter receptors^{9, 17, 18}. It contributes to directly controlling neuronal electrical activity through regulation of the degradation of the presynaptic proteins involved in neurotransmitter release¹⁹. In our model, proteasome impairment resulted from D1R stimulation and internalization and thereby contributes to dopamine signaling. Interestingly, proteasome involvement in neuronal dysfunction after chronic stimulation by neurotransmitters or related drugs has been demonstrated in several models not only at the cellular level²⁰ but also at the network and behavioral levels^{17, 19}. For instance, in chronic pain, which is known to be maintained in part by long-lasting neuroplastic changes in synapses, several proteins critical for synaptic plasticity are degraded by the ubiquitin–proteasome system. In this condition, proteasome inhibitors prevented the development of nerve injury-induced pain behavior and reversed it, notably through abolishment of the enhanced capsaicin-evoked calcitonin gene-related peptide (CGRP) release and dynorphin A upregulation, which are both elicited by nerve injury²¹.

Particularly relevant to this work is the study by Sun et al.²⁰ who, in an attempt to broadly recapitulate the conditions of chronic cocaine use in a culture system, administered repeated DA treatments over several days (which is known to enhance surface expression of AMPA receptors²²) before performing synaptic scaling experiments. Intriguingly, they showed that the DA-induced increase in AMPA receptor expression occluded the increased expression more classically induced by scaling challenge. This was mimicked by proteasome inhibition, providing the first indirect evidence of a putative interplay between DA receptors and proteasome catalytic activity²⁰. As evidenced for glutamate receptors^{17, 20}, it may well be that in LID, proteasome activity is reduced after chronic DA receptor stimulation as part of a feedback mechanism that may directly or indirectly control DA receptor internalization, trafficking and/or metabolic half-life. Nevertheless, the targets of DA-dependent proteasome activity in striatal neurons remain to be identified. They involve D1R itself as evidenced here by the limitation of the agonist-induced D1R endocytosis while proteasome was blocked. Interestingly, the recessive form of parkinsonism due to parkin mutation presents clinical features of PD but with early onset and early appearance of disabling LID²³. Since parkin is an E3 ubiquitin-protein ligase²⁴, its functional loss might impair DA-dependent proteasome activity in striatal neurons, offering an explanation for the early appearance of LID in these patients. This clinical observation reinforces the hypothetic contribution of a specific D1R-proteasome crosstalk in the occurrence of dyskinesia, possibly through control of cell surface

receptor delivery, anchoring and abundance. Whether proteasome may also act on companion molecules involved in DA signaling such as arrestins, or on other receptors including D3R²⁵ or glutamate receptors that are associated with D1R²⁶ in striatal neurons, remains to be established.

Proteasome deregulation has now been demonstrated to play a key role in the initiation and progression of several human diseases. The control of its activity, almost exclusively through inhibitors, is an emerging challenge in clinical practice in humans, as demonstrated for multiple myeloma and related diseases²⁷. In LID, proteasome activity should instead be increased. Interestingly, the ubiquitin–proteasome system displays an increased activity in animals chronically exposed to nicotine²⁸, a drug that displays anti-dyskinetic activity^{29, 30}. Further exploration is now needed of the relationship between DA signaling, the mechanisms of proteasome regulation and proteasome targets in medium spiny striatal neurons. This may lead to new opportunities for controlling and preventing the severity of the disabling dyskinesia in PD.

Acknowledgments

We thank J. Li, H. Li and A. Fayoux for animal care, and A. Estager for general technical assistance. We are grateful to P. Jenner, B.Y Zeng, O. Coux and I. Sagot for their advices in setting up the proteasomal catalytic assay, and to J.J. Toulmé and N. Pierre (INSERM U896, France) for lending the spectrofluorimeter. The Université Victor-Segalen Bordeaux 2 and the Centre National de la Recherche Scientifique provided the infrastructural support. This work was supported by an Agence Nationale de la Recherche grant (BB & EB), by a Conseil Régional d'Aquitaine grant (AB) and by a Marie-Curie Fellowship (PBC).

Author contribution statement

EB and BB designed and organized the experiments; AB, GP, SF, PBC, MLT, MN, BG, JB, QL and MLMN performed experiments; AB, EB, BB and MLMN analyzed the data and wrote the paper.

Competing interests

The authors have no conflicting interests.

Materials/Methods

Monkey experiments

All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) for care of laboratory animals in an AAALAC accredited facility.

Housing

45 female rhesus monkeys (*Macaca mulatta*, Xierxin, Beijing, PR of China; mean age = 5 ± 1 years; mean weight = 5.3 ± 0.8 kg) were used. Animals were housed in individual primate cages (dimensions - 1.1 m x 0.8 m x 1 m) under controlled conditions of humidity ($50 \pm 5\%$), temperature ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), and light (12-h light/12-h dark cycle, lights on at 8:00 am); food and water were available ad libitum. Animal care was supervised by veterinarians skilled in the healthcare and maintenance of non-human primates.

Experimental protocol

Experiments were executed according to previously published procedures ³¹⁻³⁴. Animals were randomly assigned to a particular treatment group (Supplementary data 1). 6 animals were kept as untreated controls (control group), 6 monkeys received a single dose of 20 mg/kg L-dopa p.o (control acute L-dopa), and 6 monkeys received 20 mg/kg twice daily for three months (control chronic L-dopa). The remaining 27 animals were treated daily (9:00 am) with 1-methyl-4-phenyl 1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) hydrochloride (0.2 mg/kg, i.v., Sigma, St Louis, MO) dissolved in saline according to a previously described protocol ³¹. Following stabilization of the MPTP-induced syndrome, animals received twice daily either saline (MPTP: 6 monkeys), or a single dose of Modopar (p.o.; Roche, Basel, Switzerland, L-dopa/carbidopa, ratio 4:1) (MPTP acute L-dopa: 6 monkeys) for three months (MPTP chronic L-dopa: 15 monkeys) at a tailored dose designed to fully reverse the parkinsonian features and develop dyskinesia (20 mg/kg L-dopa). Nine of the 15 monkeys developed severe and reproducible dyskinesia (MPTP intoxicated, dyskinetic monkey group), whereas six did not (MPTP intoxicated, non-dyskinetic monkey group).

Animal behavior was assessed using videotape recordings of monkeys in their home cages as previously described ³²⁻³⁴. All observers were blinded with regard to the experimental protocol. During each session, two examiners evaluated the level of motor performance of each animal, coaxing them to perform various tasks by offering appetizing fruits. Animals received supplemental feeding from day 7 onwards to maintain their body weight as constant as possible. The degree of parkinsonism was scored daily using a validated parkinsonian

macaque clinical scale³²⁻³⁴ while the severity of dyskinesia was rated using the validated dyskinesia disability scale³²⁻³⁴.

At the end of the experiment, all animals were sacrificed by sodium pentobarbital overdose (150 mg/kg, i.v., Sanofi-Aventis, Paris, France), 60 min after the last vehicle or L-dopa/carbidopa dose, a time at which dyskinesia was maximal in the dyskinetic group. Brains were removed quickly after death. Each brain was bisected along the midline and the two hemispheres were immediately frozen by immersion in isopentane (-45°C) and then stored at -80°C. Tissue of one hemisphere was sectioned coronally at 20 µm in a cryostat at -17°C, thaw-mounted onto gelatin-coated slides, dried on a slide warmer and stored at -80°C for DA transporter binding experiments used to estimate the extent of the lesion in the MPTP-treated groups (Supplementary data 4)^{4, 31, 33-35}. For the other hemisphere, dorsal striatum and frontal cortex were dissected from 300µm-thick sections for the proteasome activity assays.

Rodent experiments

Experiments were performed in accordance with French (87-848, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt) and European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) for care of laboratory animals and were approved by the Ethical Committee of Centre National de la Recherche Scientifique, Région Aquitaine.

DAT knock-out mice

The DAT mutant mice were generated by *in vivo* homologous recombination as previously described³⁶. 15 female mice between the ages of 2–4 months were used for proteasome activity assays: 5 wild-type mice (DAT^{+/+}), 5 heterozygous mice (DAT^{-/+}) and 5 homozygous mice (DAT^{-/-}). Mice were euthanized by cervical dislocation followed by decapitation, their brains were removed quickly and immediately frozen by immersion in isopentane (-45°C), and stored at -80°C. 300 µm-thick striatal coronal sections were cryostat cut and used for the proteasome activity assays.

Ub^{G76V}-GFP transgenic mice

The Ub^{G76V}-GFP transgenic mice were used for *ex vivo* and *in vivo* brain experiments [B6.Cg-Tg(CAG-Ub*G76V/GFP)2Dant/J (The Jackson Laboratory)]. This transgenic mouse strain carries a green fluorescent protein Ub^{G76V}-GFP reporter with a constitutively active degradation signal¹². Ex vivo: 8 heterozygous 8-day post-natal mice were used to check whether proteasome inhibitor leads to GFP accumulation in striatal brain slices. Brain slices were performed as previously described³⁷. The effect of proteasomal inhibition on the GFP-tagged peptide was controlled by incubation of slices with bortezomib (10 nM, 20 nM,

Janssen-Cilag, Issy-les-Moulineaux, France)³⁸ for 6 hours. In vivo: 12 heterozygous male mice (20 - 33 g) were used to study the effect of D1R stimulation on proteasomal activity in dopamine-depleted striatum by detecting the accumulation the GFP-tagged peptide reporter of proteasomal activity. The 6-OHDA lesion was performed as described³⁹. Mice underwent stereotactic surgery under 1.2% - 1.5% isoflurane. Each mouse received a unilateral injection of 6-OHDA (1 µL/injection; 3 µg/µl, Sigma) into the right medial forebrain bundle at the following coordinates according to the mouse brain atlas : anteroposterior -0.7 mm, mediolateral -1.2 mm, dorsoventral -4.7 mm , relative to bregma and the dural surface. Animals were allowed to recover for 2 weeks before benserazide only (15 mg/kg, i.p., Sigma) (n=8) and L-dopa/benserazide (6 mg/kg / 15m g/kg, i.p., Sigma) (n=4) treatment for 7 days. In such conditions, L-dopa induces the gradual development of dyskinetic-like abnormal involuntary movements (AIMs). The penultimate day, for the benserazide group, a subset of the above animals (n=4) received three additional acute challenges of the D1R agonist SKF-82958 (2 mg/kg, ip; Sigma) every 12 hours. All mice were sacrificed 60 min after the last benserazide or L-dopa injection or 6 hours after the last SKF-82958 injection. Severity of nigrostriatal denervation was assessed using tyrosine hydroxylase (TH) immunohistochemistry (Supplementary data 4).

Wild-type Rats

In vivo : 30 adult male Sprague Dawley rats (Charles River Laboratories, Lyon, France) weighing 175 –200 g at the beginning of the experiment were used. On day 0 of the protocol, unilateral DA deprivation of the striatum was obtained by 6-OHDA (3 µg/µl) injection in the right medial forebrain bundle (2.5 µl at AP= -3.7 mm, ML= +1.7 mm and DV= -8 mm, relative to bregma) as previously described^{6, 40, 41}. Animals displaying a loss of TH-immunopositive fibers in the striatum greater than 95%^{31, 42}, as assessed after completion of all experiments (Supplementary data 4), were retained for final analysis. From day 21 post-surgery till day 30, rats were treated once daily with benserazide (15 mg/kg, i.p.) and either vehicle (n=20) or L-dopa (6 mg/kg, i.p.) (n=10). In such conditions, L-dopa induces a gradual development of AIMs. On day 29, 10 rats were scored as dyskinetic (score=12) after observation by a trained investigator as previously described^{40, 41, 43} using a validated rating scale^{44, 45}. On day 30, all animals received the last vehicle injection +/- L-dopa. A subset of the above benserazide-treated animals received an additional acute challenge of the D1R agonist SKF-82958 (2 mg/kg i.p.; 15 min after benserazide) 45 min before termination. All animals were killed 60 min after the last benserazide or L-dopa administration. A total of three experimental groups were thus tested. Four animals were randomly selected in each

group for measuring proteasome catalytic activity. Primary medium spiny neuron culture : Sprague Dawley rat striatal cultures were prepared as previously described^{15, 16, 46}. All the reagents for the culture were purchased from Sigma and Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). For immunohistochemistry, proteasome inhibition was achieved with bortezomib¹³, prepared as concentrated stock solution of 10 µM in dimethylsulfoxide (DMSO) and diluted to the final concentration of 10 nM, 0.1% DMSO³⁸. In all other conditions, incubation media contained 0.1% of DMSO. For the agonist-induced internalization of D1R, cells were incubated with 10 µM of the full D1R agonist SKF-82958^{15, 16}. To test the effect of the inhibition of proteasome activity on D1R trafficking, neurons were incubated with bortezomib for 60 min prior to 60 min incubation with SKF-82958. Throughout the incubation, cells were maintained at 37°C in a 5% CO₂ incubator. At the end of incubation, the medium was rapidly removed and replaced by fixative agent. For proteasomal activity assays, cells cultured for 14 days were incubated at 37°C in a 5% CO₂ incubator with either H₂O, or the full D1R agonist SKF-82958 (10 µM)^{15, 16}, or the D2R agonist Quinpirole (10 µM)⁴⁷, or both agonists, diluted in culture medium for 60 min. At the end of incubation, the medium was rapidly removed and cells were rinsed three times with PBS, detached mechanically and collected. After centrifugation 10 min at 800 rpm, PBS was removed and cells were resuspended in homogenization buffer.

Immunohistochemistry

D1R immunofluorescence detection

D1R was detected by immunofluorescence according to previously described and validated procedures^{15, 16} using a monoclonal antibody raised in mouse against a 126 aa sequence corresponding to the C terminus of the rat D1A receptor (Invitrogen)⁴⁸. Neurons were viewed and randomly selected with a Zeiss Axioplan 2 fluorescence microscope with an X 100, 1.4 N.A. lens and captured on a Micromax-cooled CCD camera (Princeton Instruments, Trenton, NJ) using Fluo Up imaging V1.00 software (Explora Nova, La Rochelle, France).

Quantitative analysis was performed in four different conditions: after 60 min of treatment with SKF-82958; after 60 min of treatment with bortezomib; with bortezomib for 60 min followed by 60 min of treatment with SKF-82958 and in control. Data are the results of counting three sets of independent experiments for the four conditions. In each experiment, the neurons were captured from at least three different coverslips for each condition. A total of 61, 54, 45 and 71 neurons respectively were analyzed for each condition described above. The analysis was performed using Morpho expert V1.00 software (Explora Nova, La Rochelle, France). Images were background subtracted and thresholded. Threshold value was

determined for each image as twofold above background. For each labeled neurite, the number of D1R labeled puncta per μm and the mean surface value of the D1R puncta were determined.

Immunohistochemical detection of GFP

The green fluorescent protein (GFP) was detected using a rabbit polyclonal antibody raised against GFP that was isolated directly from *A. victoria* and purified by ion-exchange to remove non-specific immunoglobulins (Invitrogen)⁴⁹. *Immunoperoxidase experiments*: The GFP immunodetection was performed as previously described³². *Immunofluorescence experiments*. For GFP immunodetection on slices, a rabbit primary antibody was used at the concentration of 1:1500. After one night of incubation at 4°C, the secondary antibody Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (1:400 in PBS, Molecular Probes, Invitrogen) concentration was applied for 2 hours.

Proteasomal activity assay

Brain structures or cells were placed on ice and homogenized in extraction buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1 mM dithiothreitol, 1 mM ATP, 10% Glycerol, 0.5 mM EDTA, 0.5% Igepal and 5 mM MgCl₂)⁵⁰. The lysates were centrifuged at 14000 g at 4°C for 15 min. The resulting supernatants were placed on ice and assayed for protein concentrations by the Lowry method (Bio-Rad DC Protein Assay, Marnes-la-Coquette, France). The three activities of the 20S proteasomes (chymotrypsin-like, trypsin-like, and peptidylglutamyl-peptide hydrolase (PGPH)-like activities) were analyzed using fluorogenic substrates: Suc-LLVY-MCA, Boc-LSTR-MCA, and Z-LLE-β-naphthylamide (Sigma). Five, ten, fifteen, forty or fifty μg of protein (depended on structures or cells) and the fluorogenic substrate (final concentration, 50 μM) were incubated together in a buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.8), 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT and 1 mM ATP. All assays were done in triplicate. The incubation took place at 37°C for 60 min in a 96-well plate. Fluorescence was determined at 355 nm excitation / 460 nm emission in a Microplate Spectrofluorometer (Twinkle LB970, Berthold). Proteasomal activity was expressed as arbitrary units. The specificity of the proteasomal assay was confirmed by the ability of 50 μM MG132 (Enzo Life Sciences, Villeurbanne, France), a selective inhibitor of proteasomal function, to nearly totally inhibit fluorescence change.

References

1. Cotzias, G.C., Papavasiliou, P.S. & Gellene, R. Modification of Parkinsonism—chronic treatment with L-dopa. *N Engl J Med* **280**, 337-345 (1969).
2. Bezard, E., Brotchie, J.M. & Gross, C.E. Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia : Potential for new therapies. *Nature Rev. Neurosci.* **2**, 577-588 (2001).
3. Jenner, P. Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat Rev Neurosci* **9**, 665-677 (2008).
4. Aubert, I., *et al.* Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia. *Ann Neurol* **57**, 17-26 (2005).
5. Guigoni, C., Doudnikoff, E., Li, Q., Bloch, B. & Bezard, E. Altered D(1) dopamine receptor trafficking in parkinsonian and dyskinetic non-human primates. *Neurobiol Dis* **26**, 452-463 (2007).
6. Berthet, A., *et al.* Pharmacological analysis demonstrates dramatic alteration of D1 Dopamine receptor neuronal distribution in the rat analog of L-DOPA-induced dyskinesia. *J Neurosci* **29**, 4829-4835 (2009).
7. DiAntonio, A. & Hicke, L. Ubiquitin-dependent regulation of the synapse. *Annu Rev Neurosci* **27**, 223-246 (2004).
8. Bingol, B. & Schuman, E.M. Activity-dependent dynamics and sequestration of proteasomes in dendritic spines. *Nature* **441**, 1144-1148 (2006).
9. Patrick, G.N., Bingol, B., Weld, H.A. & Schuman, E.M. Ubiquitin-mediated proteasome activity is required for agonist-induced endocytosis of GluRs. *Curr Biol* **13**, 2073-2081 (2003).
10. Benoit-Marand, M., Jaber, M. & Gonon, F. Release and elimination of dopamine in vivo in mice lacking the dopamine transporter: functional consequences. *Eur J Neurosci* **12**, 2985-2992 (2000).

11. Jones, S.R., *et al.* Profound neuronal plasticity in response to inactivation of the dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4029-4034 (1998).
12. Lindsten, K., Menendez-Benito, V., Masucci, M.G. & Dantuma, N.P. A transgenic mouse model of the ubiquitin/proteasome system. *Nat Biotechnol* **21**, 897-902 (2003).
13. Raab, M.S., Podar, K., Breitkreutz, I., Richardson, P.G. & Anderson, K.C. Multiple myeloma. *Lancet* **374**, 324-339 (2009).
14. Lundblad, M., *et al.* Pharmacological validation of a mouse model of l-DOPA-induced dyskinesia. *Exp Neurol* **194**, 66-75 (2005).
15. Martin-Negrier, M., Charron, G. & Bloch, B. Agonist stimulation provokes dendritic and axonal dopamine D(1) receptor redistribution in primary cultures of striatal neurons. *Neuroscience* **99**, 257-266 (2000).
16. Martin-Negrier, M.L., Charron, G. & Bloch, B. Receptor recycling mediates plasma membrane recovery of dopamine D1 receptors in dendrites and axons after agonist-induced endocytosis in primary cultures of striatal neurons. *Synapse* **60**, 194-204 (2006).
17. Citri, A., Soler-Llavina, G., Bhattacharyya, S. & Malenka, R.C. N-methyl-D-aspartate receptor- and metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression are differentially regulated by the ubiquitin-proteasome system. *Eur J Neurosci* **30**, 1443-1450 (2009).
18. Guo, L. & Wang, Y. Glutamate stimulates glutamate receptor interacting protein 1 degradation by ubiquitin-proteasome system to regulate surface expression of GluR2. *Neuroscience* **145**, 100-109 (2007).
19. Jiang, X., *et al.* A role for the ubiquitin-proteasome system in activity-dependent presynaptic silencing. *J Neurosci* **30**, 1798-1809 (2010).

20. Sun, X. & Wolf, M.E. Nucleus accumbens neurons exhibit synaptic scaling that is occluded by repeated dopamine pre-exposure. *Eur J Neurosci* **30**, 539-550 (2009).
21. Ossipov, M.H., *et al.* Control of chronic pain by the ubiquitin proteasome system in the spinal cord. *J Neurosci* **27**, 8226-8237 (2007).
22. Wolf, M.E., Sun, X., Mangiavacchi, S. & Chao, S.Z. Psychomotor stimulants and neuronal plasticity. *Neuropharmacology* **47 Suppl 1**, 61-79 (2004).
23. Kitada, T., *et al.* Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* **392**, 605-608 (1998).
24. Shimura, H., *et al.* Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitinprotein ligase. *Nat Genet* **25**, 302-305 (2000).
25. Fiorentini, C., *et al.* Reciprocal regulation of dopamine D1 and D3 receptor function and trafficking by heterodimerization. *Mol Pharmacol* (2008).
26. Lee, F.J., *et al.* Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell* **111**, 219-230 (2002).
27. Genin, E., Reboud-Ravaux, M. & Vidal, J. Proteasome inhibitors: recent advances and new perspectives in medicinal chemistry. *Curr Top Med Chem* **10**, 232-256 (2010).
28. Kane, J.K., Konu, O., Ma, J.Z. & Li, M.D. Nicotine coregulates multiple pathways involved in protein modification/degradation in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* **132**, 181-191 (2004).
29. Bordia, T., Campos, C., Huang, L. & Quik, M. Continuous and intermittent nicotine treatment reduces L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)-induced dyskinesias in a rat model of Parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther* **327**, 239-247 (2008).
30. Quik, M., *et al.* Nicotine reduces levodopa-induced dyskinesias in lesioned monkeys. *Ann Neurol* **62**, 588-596 (2007).

31. Bezard, E., *et al.* Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *J Neurosci* **21**, 6853-6861 (2001).
32. Ahmed, M.R., *et al.* Lentiviral overexpression of GRK6 alleviates L-dopa-induced dyskinesia in experimental Parkinson's disease. *Sci Transl Med* **2**, 28ra28 (2010).
33. Gold, S.J., *et al.* RGS9-2 negatively modulates L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia in experimental Parkinson's disease. *J Neurosci* **27**, 14338-14348 (2007).
34. Bezard, E., *et al.* Attenuation of levodopa-induced dyskinesia by normalizing dopamine D3 receptor function. *Nat Med* **9**, 762-767 (2003).
35. Bezard, E., *et al.* L-DOPA reverses the MPTP-induced elevation of the arrestin2 and GRK6 expression and enhanced ERK activation in monkey brain. *Neurobiol Dis* **18**, 323-335 (2005).
36. Giros, B., Jaber, M., Jones, S.R., Wightman, R.M. & Caron, M.G. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* **379**, 606-612 (1996).
37. Baufreton, J. & Bevan, M.D. D2-like dopamine receptor-mediated modulation of activity-dependent plasticity at GABAergic synapses in the subthalamic nucleus. *J Physiol* **586**, 2121-2142 (2008).
38. Crawford, L.J., *et al.* Comparative selectivity and specificity of the proteasome inhibitors BzLLLCOCHO, PS-341, and MG-132. *Cancer Res* **66**, 6379-6386 (2006).
39. Cenci, M.A. & Lundblad, M. Ratings of L-DOPA-induced dyskinesia in the unilateral 6-OHDA lesion model of Parkinson's disease in rats and mice. *Curr Protoc Neurosci Chapter 9*, Unit 9 25 (2007).

40. Meissner, W., *et al.* Increased slow oscillatory activity in substantia nigra pars reticulata triggers abnormal involuntary movements in the 6-OHDA-lesioned rat in the presence of excessive extracellular striatal dopamine. *Neurobiol Dis* **22**, 586-598 (2006).
41. Schuster, S., *et al.* 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 (2008).
42. Guigoni, C., *et al.* Involvement of sensorimotor, limbic, and associative basal ganglia domains in L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia. *J Neurosci* **25**, 2102-2107 (2005).
43. Schuster, S., *et al.* Antagonizing L-type Ca²⁺ channel reduces development of abnormal involuntary movement in the rat model of L-3,4-dihydroxyphenylalanine induced dyskinesia. *Biol Psychiatry* **65**, 518-526 (2009).
44. Cenci, M.A., Lee, C.S. & Bjorklund, A. 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 (1998).
45. Lundblad, M., *et al.* Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* **15**, 120-132 (2002).
46. Kowalski, C. & Giraud, P. Dopamine decreases striatal enkephalin turnover and proenkephalin messenger RNA abundance via D2 receptor activation in primary striatal cell cultures. *Neuroscience* **53**, 665-672 (1993).
47. Brami-Cherrier, K., *et al.* Dopamine induces a PI3-kinase-independent activation of Akt in striatal neurons: a new route to cAMP response element-binding protein phosphorylation. *J Neurosci* **22**, 8911-8921 (2002).

48. Lee, S.P., *et al.* Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *J Biol Chem* **279**, 35671-35678 (2004).
49. Franciosi, S., *et al.* Pepsin pretreatment allows collagen IV immunostaining of blood vessels in adult mouse brain. *J Neurosci Methods* **163**, 76-82 (2007).
50. Kisseelev, A.F. & Goldberg, A.L. Monitoring activity and inhibition of 26S proteasomes with fluorogenic peptide substrates. *Methods Enzymol* **398**, 364-378 (2005).

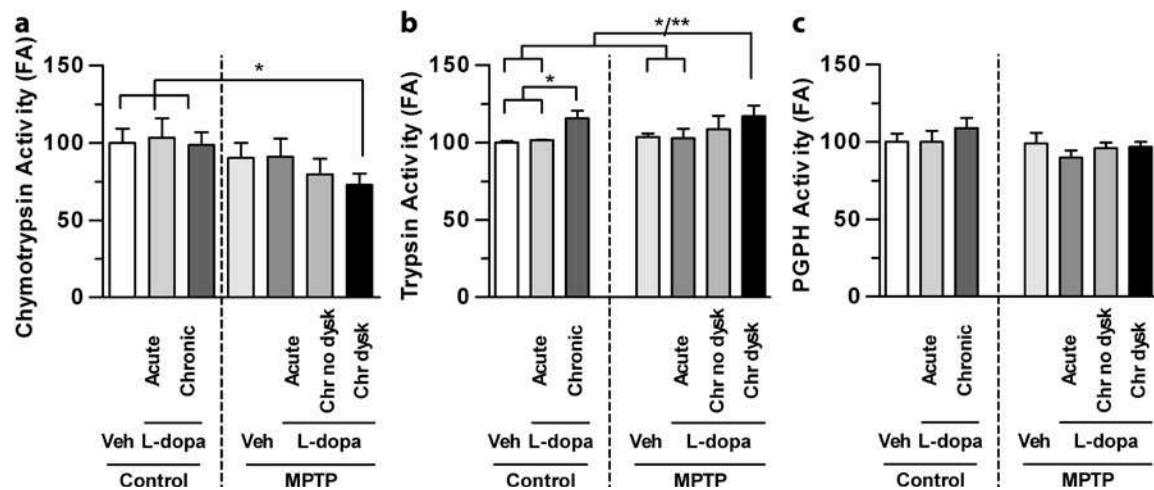
Figures

Figure 1. Decreased chymotrypsin catalytic activity in striatum of the dyskinetic MPTP-lesioned monkeys. Striatal homogenates of normal and MPTP-treated macaque monkey that were administered vehicle or L-dopa, acutely or chronically, were processed to evaluate 20S proteasomal chymotrypsin-like (One-way ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple *posthoc* test; $F_{6,14}=3.74$, $p<0.01$), trypsin-like ($F_{6,14}=5.323$, $p<0.001$), and peptidyl glutamylpeptide hydrolytic (PGPH) activities ($F_{6,14}=3.197$, $p<0.05$), using fluorogenic substrates: Suc-LLVY-AMC, Boc-LSTR-AMC, and Z-LLE- β -NA respectively. Reaction rates are expressed as fluorescence arbitrary units (FA) and standardized by comparison to normal animal values. Data are mean of triplicate measurements \pm S.E.M (n=6 animals for each group).

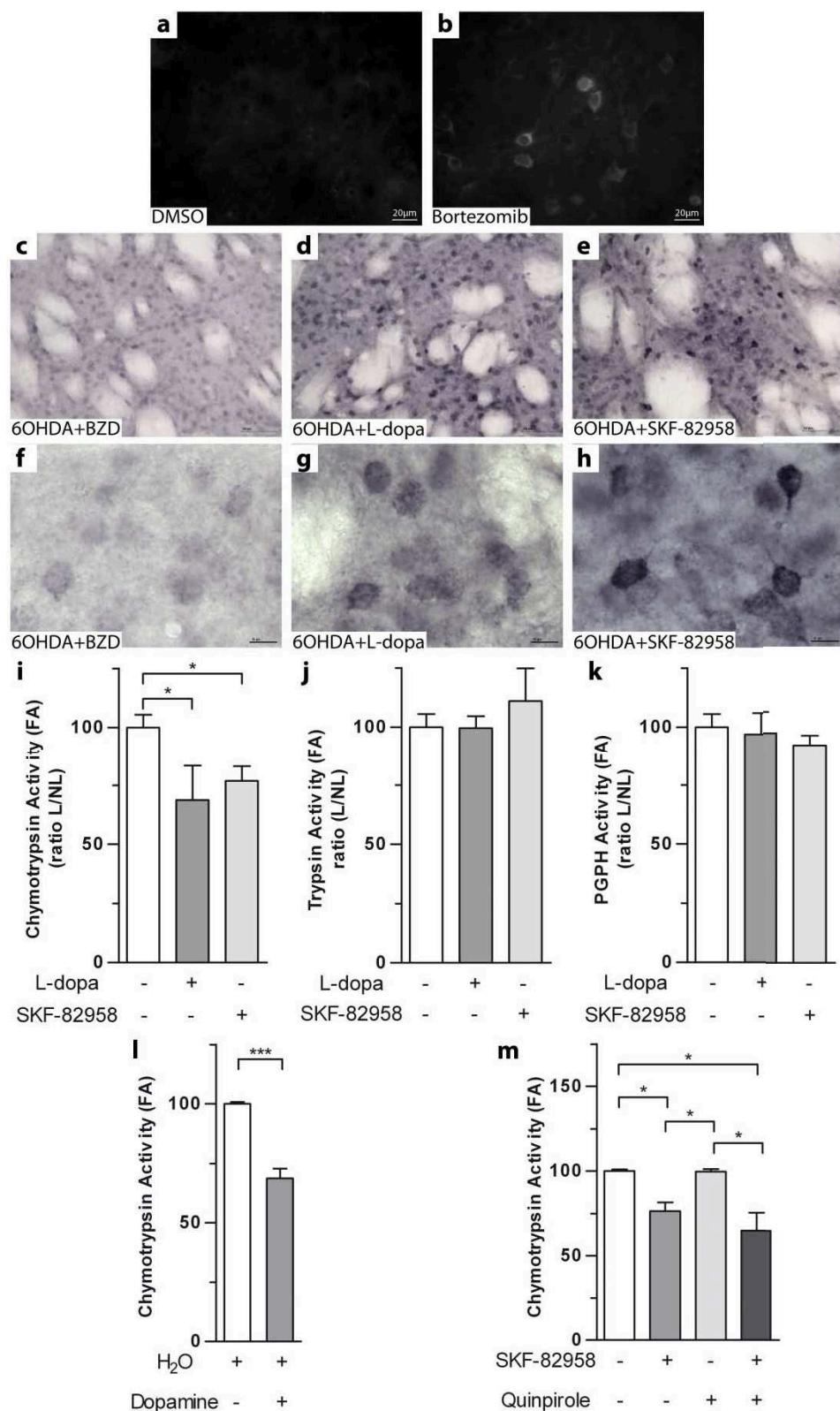


Figure 2. Proteasome catalytic activity is impaired in medium spiny neurons after D1 receptor stimulation. (a-h) *In vivo* GFP reporter accumulation after dopamine stimulation in striatum of Ub^{G76V} -GFP transgenic mice. Immunofluorescent labeling of

striatal sections of Ub^{G76V}-GFP mice demonstrates Ub^{G76V}-GFP positive neurons after bortezomib treatment (**b**) as compared to DMSO control (**a**). (**c-h**) Immunoperoxidase detection of GFP immunoreactivity (Avidin–biotin DAB Nickel technique) in striatal medium spiny neurons of unilateral 6-OHDA-lesioned mice (scale bar, 50 µm). (**c&f**) Control mice (benserazide only); (**d&g**) L-dopa-treated 6-OHDA-lesioned mice with AIMs; (**e and h**) SKF-82958-treated 6-OHDA-lesioned mice. Medium spiny neurons of L-dopa-treated 6-OHDA-lesioned mice (**d&g**) display a strong accumulation of GFP in comparison to benserazide group (**c&f**). More intense accumulation was observed when mice were treated with D1R full agonist SKF-82958 (**e&h**). (**i-k**) **L-dopa-induced decrease in striatal proteasomal activity is mimicked by D1R agonist.** 20S proteasomal chymotrypsin-like (**i**), trypsin-like (**j**), and peptidyl glutamyl-peptide hydrolytic (PGPH) (**k**) activities were evaluated using fluorogenic substrates in striatal homogenates of normal and 6-OHDA-lesioned rats that were administered vehicle or chronic L-dopa treatment or acute SKF-82958 injection. Reaction rates are expressed as fluorescence arbitrary units (FA) and standardized by comparison to normal animal values. Data are mean of triplicate measurements ± S.E.M (n=4 for each group). Ratio L/NL (mean±SEM) represents the FA on lesioned side (L) versus non-lesioned (NL) side. Chronic L-dopa or acute SKF-82958 treatments show a dramatic decrease only in chymotrypsin-like activity (One-way non-parametric ANOVA, Kruskal–Wallis, followed by Mann–Whitney *post-hoc* test; KW=8.766, p<0.05) (**i**). No changes in 20S proteasomal trypsin-like (KW=0.2413) (**j**) and PGPH (KW=3.136) (**k**) activities in striatum were observed. (**l-m**) **D1R agonist but not D2R decreases proteasomal activity.** (**l**) 20S proteasomal chymotrypsin-like activity is decreased in rat medium spiny primary culture after DA treatment (*t*-test; *p<0.001). (**m**) This decrease is specifically induced by the D1R agonist SKF-82958 but not by the D2R agonist quinpirole (*t*-test; *p<0.05).

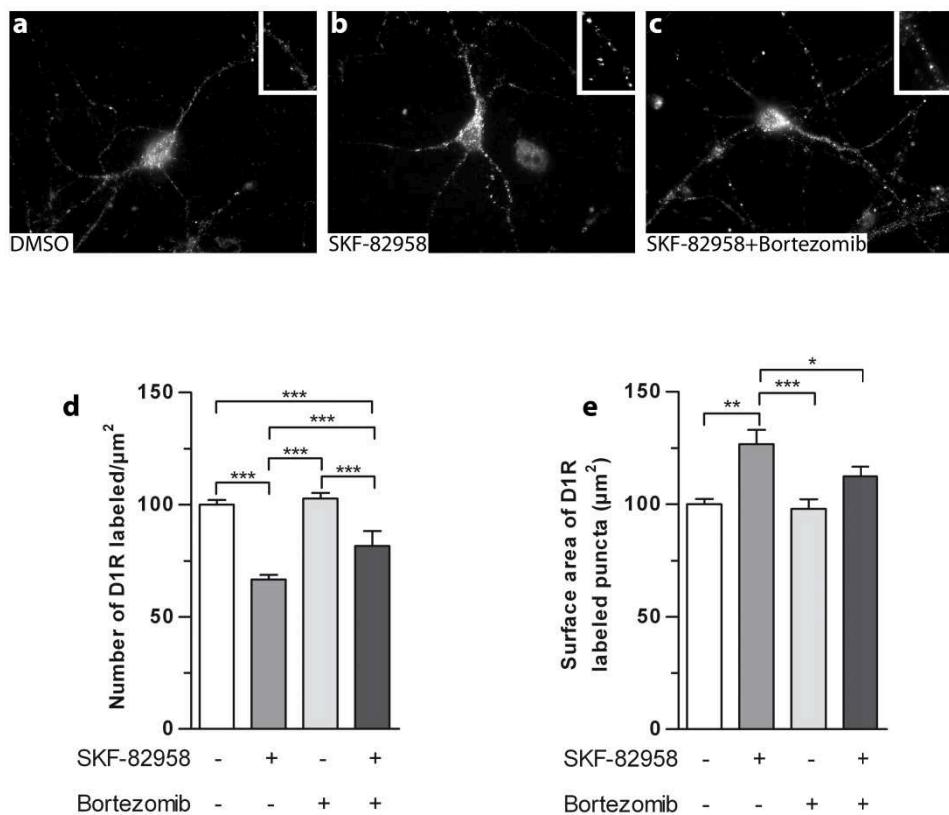
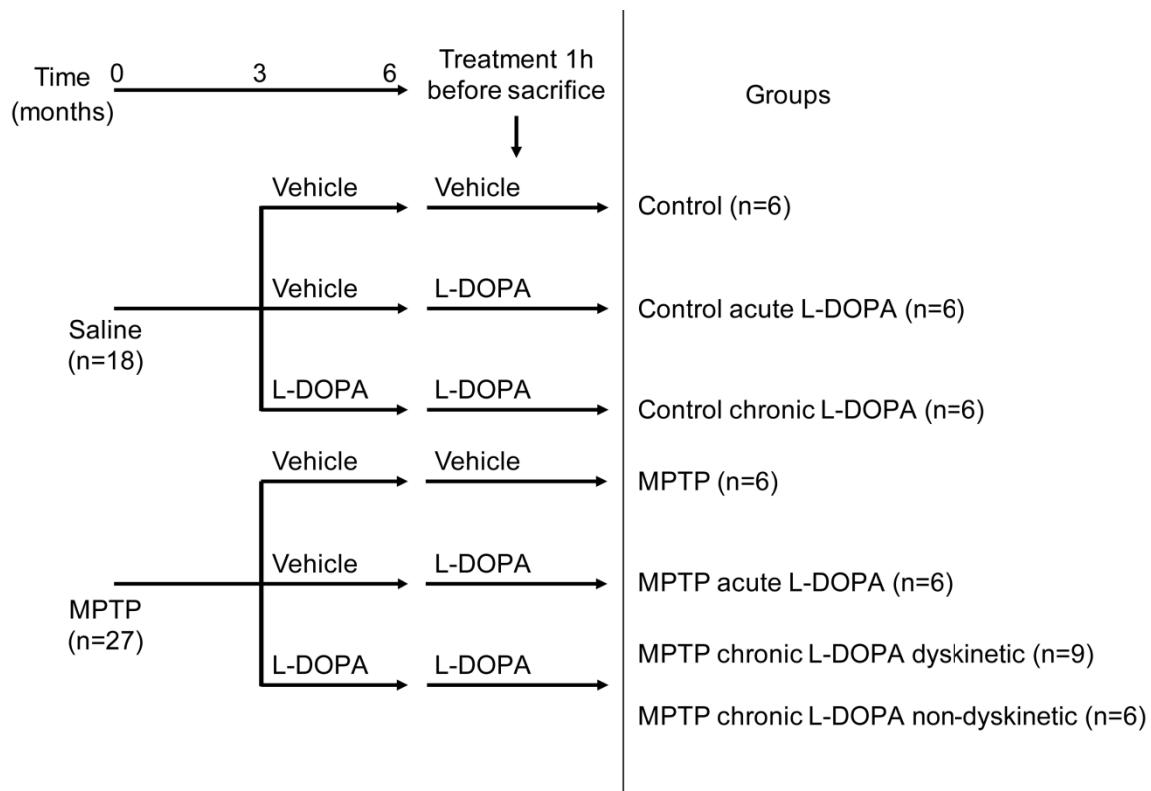
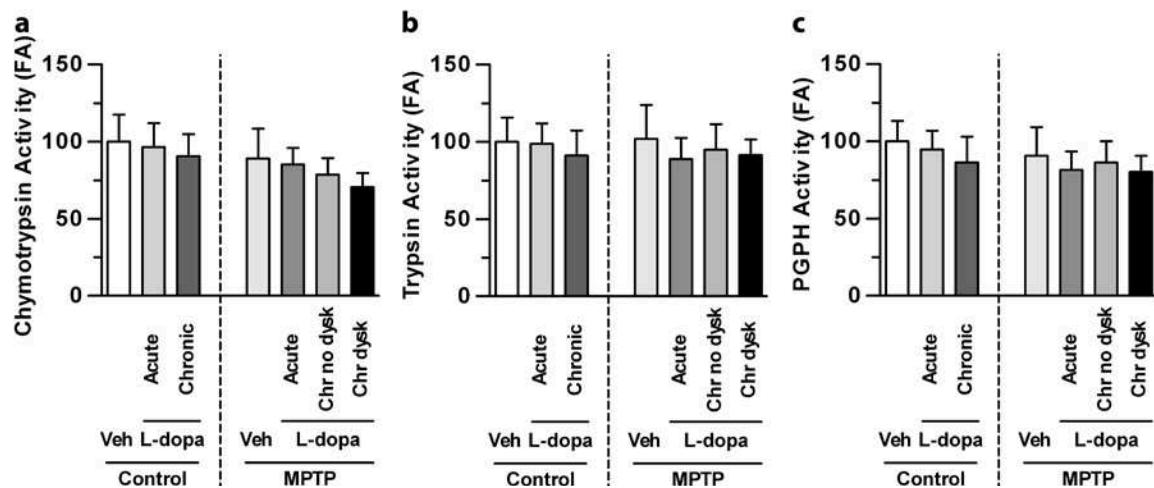


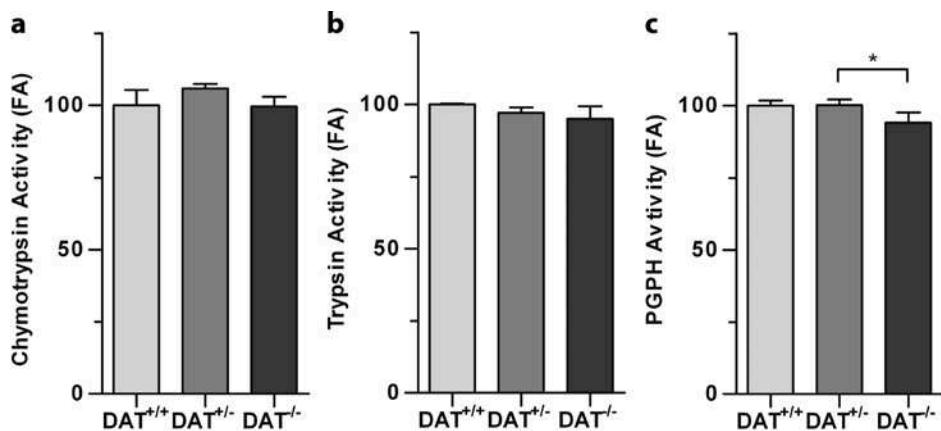
Figure 3. Proteasome inhibition reduces D1R internalization in neurites in 15-day rat striatal cultured neurons. In control condition (a), D1R immunofluorescent staining is punctated at the surface of the neurites. (b) SKF-82958 treatment (60 min) reveals larger and brighter fluorescent spots in the neurites in a compartment corresponding to endosome¹⁶. (c) Proteasome inhibition impairs this agonist-induced endocytosis, with reduced modifications of the density and the size of fluorescent puncta. Scale Bar 20 μm . (d-e) D1R immunolabeling was quantified in the different experimental conditions as (d) the mean number of D1R labeled puncta per 100 μm of neurites \pm S.E.M and (e) the mean value of the surface of D1R labeled puncta \pm S.E.M. Number of D1R puncta decreases (One-way ANOVA followed by Tukey-Kramer *post-hoc* test; $F_{3,226}=59,15$, $p<0.0001$) while the area of D1R puncta in neurites increases ($F_{3,185}=7,12$, $p<0.001$) after 60 min of D1R agonist stimulation in neurites in comparison to control, as previously described¹⁶. By contrast, there was no change when neurons were treated with bortezomib (60 min). Combined SKF-82958 / bortezomib treatments reduced the decrease in density in D1R labeled in neurites as compared to SKF-82958 treatment alone.

Supplementary data

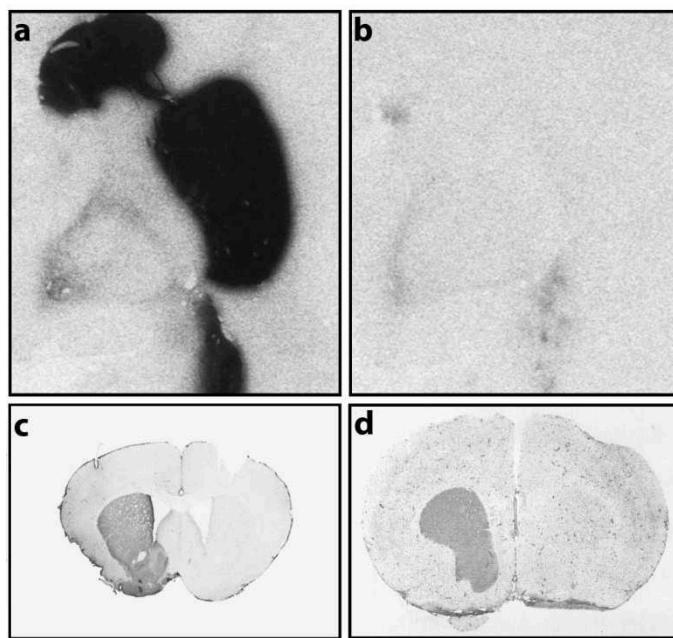
Supplementary data 1. Experimental protocol with timelines, drug treatments, and behavioral consequences.



Supplementary data 2. Dysfunctions in catalytic activities are striatum-specific. Superior frontal gyrus (SFG) homogenates of normal and MPTP-treated macaque monkey that were administered vehicle or L-dopa, acutely or chronically, were processed to evaluate 20S proteasomal chymotrypsin-like (One-way ANOVA ; ($F_{6,14}=0.9912$, not significant (ns)), trypsin-like ($F_{6,14}=0.2084$, ns), and peptidyl glutamyl-peptide hydrolytic (PGPH) activities ($F_{6,14}=0.15074$, ns), using fluorogenic substrates: Suc-LLVY-AMC, Boc-LSTR-AMC, and Z-LLE- β -NA respectively. No change in 20S proteasomal activities was observed in SFG of the dyskinetic MPTP-lesioned monkeys. Reaction rates are expressed as fluorescence arbitrary units (FA) and standardized by comparison to normal animal values. Data are mean of triplicate measurements \pm S.E.M (n=6 animals for each group).



Supplementary data 3. Dysfunctions in catalytic activities are due to the association of chronic L-dopa treatment with dopamine depletion. Striatal homogenates of a mouse model of hyperdopaminergia without degeneration of the nigrostriatal pathway, the dopamine transport knock-out mice (DAT^{-/-}), normal (DAT^{+/+}) and heterozygous (DAT^{+/-}) mice, were processed to evaluate 20S proteasomal chymotrypsin-like (One-way ANOVA ; ($F_{2,6}=1.731$, not significant (ns)), trypsin-like ($F_{2,6}=2.174$, ns), and peptidyl glutamyl-peptide hydrolytic (PGPH) activities ($F_{2,6}=4.838$, $p<0.05$), using fluorogenic substrates: Suc-LLVY-AMC, Boc-LSTR-AMC, and Z-LLE-β-NA respectively. No change in 20S proteasomal activities was observed in the striatum of DAT^{-/-} mice compared to both DAT^{+/+} and DAT^{+/-}. Reaction rates are expressed as fluorescence arbitrary units (FA) and standardized by comparison to normal animal values. Data are mean of triplicate measurements ± S.E.M (n=4 animals for each group).



Supplementary data 4. Validation of the striatum denervation in monkey, mice and rat models. (a&b) Representative examples of striatal DAT binding autoradiograph in the control (a) and the MPTP-treated groups (b). (c) Representative example of striatal tyrosine hydroxylase (TH) immunostaining of 6-OHDA-lesioned mice. The cut on the upper right cortex was made to identify the right hemisphere during section processing. (d) Representative example of striatal TH immunostaining of 6-OHDA-lesioned rat.

II.C.) Article 3 : La surexpression de GRK6 par un vecteur lentiviral améliore les dyskinésies L-dopa induites dans les modèles expérimentaux de la maladie de Parkinson.

II.C.1) Résumé

L'objectif de ce dernier travail a été d'étudier les conséquences de la surexpression de la protéine GRK6 *via* l'injection d'un vecteur lentiviral dans le striatum sur la sévérité des dyskinésies L-dopa induites.

Actuellement, il n'existe aucun traitement efficace pour réduire la sévérité des dyskinésies L-dopa induites, mais seulement des stratégies visant à retarder au maximum leur survenue. Il a été démontré au cours des dyskinésies une réduction de l'expression de deux protéines impliquées dans le processus de désensibilisation homologue : GRK6 (G protein-coupled receptor kinase 6), une kinase qui phosphoryle le récepteur couplé aux protéines G, et l'arrestine 2, qui empêche le couplage du récepteur à une nouvelle protéine G et entraîne son internalisation (Bezard et al., 2005).

C'est dans ce contexte que nous avons eu pour objectif de corriger ce déficit en GRK6 dans le but de restaurer une désensibilisation homologue du récepteur D1 et d'en mesurer les conséquences comportementales pour ouvrir la voie à de nouvelles pistes thérapeutiques pour réduire les dyskinésies. En collaboration avec l'équipe américaine de E.V. Gurevich (Université Vanderbilt de Nashville), nous avons choisi d'induire la surexpression de GRK6 par transfert du gène codant GRK6 *via* un vecteur lentiviral injecté par voie intracérébrale.

Dans un premier temps, nous avons choisi d'étudier les effets comportementaux de cette surexpression de GRK6 dans le modèle hémiparkinsonien. Nous avons réalisé deux groupes expérimentaux : des rats hémiparkinsoniens avec une injection intrastriatale d'un lentivirus contenant uniquement de la GFP qui sont utilisés comme « contrôles » (groupe GFP) et des rats hémiparkinsoniens avec une injection intrastriatale d'un lentivirus contenant GRK6 (groupe GRK6). Nous avons d'abord testé l'effet de la surexpression de GRK6 sur les rotations controlatérales à la lésion dopaminergique, en réponse à une stimulation en aiguë par un agoniste dopaminergique, l'apomorphine (une seule injection et mesures à 5min et 60min) et un traitement chronique par la L-dopa (9 jours de traitement et mesures au pic de dose de la L-dopa, à 60min). Le nombre de rotations controlatérales à la lésion dopaminergique diminue

significativement après sensibilisation à l’apomorphine (Figure 2A) et traitement chronique par la L-dopa (Figure 2B), chez les rats GRK6, en comparaison avec les rats « contrôles » GFP. Nous avons ensuite montré que la surexpression de GRK6 diminue significativement la sévérité des mouvements involontaires anormaux, les dyskinésies, en comparaison aux animaux « contrôles » (Figures 2D et 2F).

Cette transfection virale qui conduit à la surexpression de GRK6 permet de diminuer significativement à la fois les comportements de sensibilisation, et la sévérité des mouvements involontaires anormaux de types dyskinésies.

Nous avons vérifié nos résultats, en diminuant l’expression de GRK6 en injectant un lentivirus contenant un micro ARN dirigé contre GRK6 : le nombre de rotations controlatérales à la lésion augmente significativement en comparaison aux rats GFP (Figures 2E et 2F).

Nous avons ensuite vérifié la surexpression de GRK6 par immunofluorescence et western blot au niveau du striatum dorsal. La transfection lentivirale induit une augmentation de la quantité totale de GRK6 d’environ de 50% (Figure 1G). De plus, GRK6 est exprimé dans les neurones épineux de taille moyenne du striatum et co-localise avec DARPP-32 (Figure 1D)

Nous avons ensuite regardé chez ces animaux l’effet de cette surexpression sur la localisation du récepteur D1 de la dopamine dans les neurones striataux par immunohistochimie. **Le rétablissement du niveau d’expression de la protéine GRK6 permet d’internaliser spécifiquement le récepteur D1 après stimulation par son ligand naturel, la dopamine,** sans que la localisation subcellulaire d’autres récepteurs, comme les récepteurs de type D2 et les récepteurs au glutamate (mGluR5), ne soit affectée (Figure 3).

Des études autoradiographiques d’hybridation *in situ* et de binding ont mis en évidence que la surexpression de GRK6 diminue les niveaux d’expression de la dynorphine, qui est coexprimée dans les neurones striataux portant les récepteurs D1 (Figures 4A et 4B), du récepteur D3 (Figures 4C et 4D) et de l’enképhaline qui est co-exprimée dans les neurones striataux portant le récepteur D2 (Figures 4E et 4F), dans le striatum dorsal.

L’ensemble de nos résultats suggère que la surexpression de GRK6 normalise la signalisation médiée par le récepteur D1 en rétablissant la machinerie de désensibilisation. GRK6 normalise aussi la signalisation médiée par le récepteur D2, porté par les neurones de la voie indirecte.

Nous avons répété nos investigations dans le modèle de référence de la maladie de Parkinson et des dyskinésies, le primate non-humain intoxiqué au MPTP traité par la L-dopa. Nous avons également analysé deux groupes expérimentaux traités par la L-dopa : des primates non-humains parkinsoniens avec injection intrastriatale bilatérale d'un lentivirus contenant uniquement de la GFP qui sont utilisés comme « contrôles » (groupe GFP) et des primates non-humains parkinsoniens avec injection intrastriatale bilatérale d'un lentivirus contenant GRK6 (groupe GRK6). La surexpression de GRK6 dans le striatum réduit significativement la sévérité des dyskinésies, sans interférer avec l'effet antiparkinsonien de la L-dopa (Figure 6). Cette surexpression de GRK6 dans le striatum diminue également les dyskinésies induites par des agonistes sélectifs D1 et D2 (Figure 7). De même que pour le rat, des expériences d'hybridation *in situ* ont montré que le niveau d'expression de la dynorphine est réduit dans le striatum chez le groupe GRK6 en comparaison au groupe GFP (Figure 5E). Ces résultats indiquent également que GRK6 réduit la sévérité des dyskinésies en normalisant la signalisation médiée par le récepteur D1. Une des stratégies pour réduire les dyskinésies est de diminuer les doses de L-dopa. Dans le groupe GRK6, une dose de 50% de L-dopa a les mêmes effets antiparkinsoniens qu'une dose de 100% (Figure 7A et 7C), sans développement de dyskinésies (Figure 7B et 7D). De plus, le groupe GRK6 montre une baisse de l'activité locomotrice moins prononcée due à l'effet plus long de la L-dopa (Figure 7E).

De manière spectaculaire, dans ce modèle, la surexpression de GRK6 dans le striatum permet de réduire la sévérité des dyskinésies et de restaurer les effets thérapeutiques de la L-dopa. En effet, cela prolonge l'effet antiparkinsonien de la L-dopa, ce qui permet aux primates non-humains de bénéficier plus longtemps de faibles doses. Ces effets bénéfiques sont la conséquence de la restauration de la machinerie de désensibilisation homologue.

En conclusion, l'ensemble de ce travail met en avant l'importance du rôle fonctionnel de la protéine GRK6 dans la physiopathologie des dyskinésies. La surexpression de GRK6 permet de réduire considérablement les dyskinésies tout en préservant l'action antiparkinsonienne de la L-dopa. Ces données valident GRK6 en tant que nouvelle cible thérapeutique pour tenter de traiter les dyskinésies et les fluctuations de la réponse thérapeutique à la L-dopa.

II.C.2) Article 3

Lentiviral Overexpression of GRK6 Alleviates L-dopa-Induced Dyskinesia in Experimental Parkinson's Disease

Mohamed R. Ahmed, Amandine Berthet, Evgeny Bychkov, Gregory Porras, Qin Li, Bernard H. Bioulac, Yonatan T. Carl, Bertrand Bloch,² Seunghyi Kook, Incarnation Aubert, Sandra Dovero, Evelyne Doudnikoff, Vsevolod V. Gurevich, Eugenia V. Gurevich, et Erwan Bezard.

Science Translational Medicine, Volume 2, Issue 28, Avril 2010, 28ra28.

doi: 10.1126/scitranslmed.3000664

RESEARCH ARTICLE

PARKINSON'S DISEASE

Lentiviral Overexpression of GRK6 Alleviates L-Dopa-Induced Dyskinesia in Experimental Parkinson's Disease

Mohamed R. Ahmed,¹ Amandine Berthet,² Evgeny Bychkov,¹ Gregory Porras,² Qin Li,³ Bernard H. Bioulac,² Yonatan T. Carl,¹ Bertrand Bloch,² Seunghyi Kook,¹ Incarnation Aubert,² Sandra Dovero,² Evelyne Doudnikoff,² Vsevolod V. Gurevich,¹ Eugenia V. Gurevich,^{1,*†} Erwan Bezard^{2,3,*†}

(Published 21 April 2010; Volume 2 Issue 28 28ra28)

Parkinson's disease is caused primarily by degeneration of brain dopaminergic neurons in the substantia nigra and the consequent deficit of dopamine in the striatum. Dopamine replacement therapy with the dopamine precursor L-dopa is the mainstay of current treatment. After several years, however, the patients develop L-dopa-induced dyskinesia, or abnormal involuntary movements, thought to be due to excessive signaling via dopamine receptors. G protein-coupled receptor kinases (GRKs) control desensitization of dopamine receptors. We found that dyskinesia is attenuated by lentivirus-mediated overexpression of GRK6 in the striatum in rodent and primate models of Parkinson's disease. Conversely, reduction of GRK6 concentration by microRNA delivered with lentiviral vector exacerbated dyskinesia in parkinsonian rats. GRK6 suppressed dyskinesia in monkeys without compromising the anti-parkinsonian effects of L-dopa and even prolonged the antiparkinsonian effect of a lower dose of L-dopa. Our finding that increased availability of GRK6 ameliorates dyskinesia and increases duration of the antiparkinsonian action of L-dopa suggests a promising approach for controlling both dyskinesia and motor fluctuations in Parkinson's disease.

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder primarily caused by the degeneration of nigral dopaminergic neurons that provide dopamine to the striatum. The best symptomatic therapeutic agent is the dopamine precursor L-dopa. Long-term treatment leads to L-dopa-induced dyskinesia (LID) or involuntary aimless movements (1). Loss of dopamine in PD causes complex alterations in cellular signaling. Numerous pathways in the dopamine-depleted striatum show exaggerated responses to stimulation by dopaminergic drugs. The signaling is further distorted by chronic L-dopa treatment (2–4). Super-sensitivity of the D1 (5) and D2 (6, 7) dopamine receptors is thought to be among the molecular mechanisms underlying LID. Because both the dyskinetic and antiparkinsonian actions of L-dopa are mediated by signaling through dopamine receptors, the molecular mechanisms of these effects are likely intertwined. Previous attempts to dissociate the detrimental and beneficial effects of the drug with pharmacological or molecular tools that inhibit the former while preserving the latter have been only moderately successful (7, 8). Underlying molecular mechanisms must be identified and selectively targeted to effectively manage LID.

A conserved desensitization mechanism terminates signaling by G protein-coupled receptors (GPCRs). The first rate-limiting step in this process is activation-dependent receptor phosphorylation by GPCR kinases (GRKs). Binding of arrestins (regulatory proteins) to phosphorylated receptors blocks further G protein activation and ini-

tiates receptor internalization (9, 10). GPCR signaling is strictly controlled by this process, and the rate and extent of desensitization depend on the availability of GRKs (11–14). In rats with dopamine depletion in one hemisphere, the concentration of GRKs in the dopamine-depleted motor striatum is reduced, and L-dopa fails to alter the GRK expression (15). In parkinsonian monkeys, loss of dopamine leads to the up-regulation of several GRKs (2), which may temper dopaminergic signaling on initial L-dopa administration and ensure a therapeutic response to the drug. However, chronic L-dopa treatment suppresses the GRK expression (2). Previously, we demonstrated elevated membrane expression and reduced internalization of D1 receptors in the striatum of dyskinetic monkeys (16), suggesting that LID is associated with deficits in D1 receptor desensitization and trafficking. Reduced GRK availability likely contributes to the exaggerated dopaminergic signaling in the dyskinetic brain. Collectively, these results suggest that increasing the capacity of the desensitization machinery in the parkinsonian striatum may ameliorate LID.

Five GRK isoforms are expressed in the brain (2, 17–19). GRK6 has been implicated in the regulation of dopaminergic signaling in the striatum (13). Here, we demonstrate that overexpression of GRK6 in the striatum facilitates receptor desensitization and ameliorates LID while preserving or even enhancing the antiparkinsonian effects of L-dopa.

RESULTS

Overexpression of GRK6 ameliorates behavioral sensitization to L-dopa in 6-hydroxydopamine-lesioned rats

We constructed lentiviruses encoding green fluorescent protein (GFP) (control) or rat GRK6 [GRK6A splice variant, which is the major messenger RNA (mRNA) variant in the brain] (20) tagged with GFP for easy detection (fig. S1A). Using an *in vitro* rhodopsin

¹Department of Pharmacology, Vanderbilt University, 2200 Pierce Avenue, PRB422, Nashville, TN 37232, USA. ²Université Victor Segalen Bordeaux 2, Centre National de la Recherche Scientifique, Bordeaux Institute of Neuroscience, CNRS UMR 5227, Université Bordeaux 2, 146 Rue Leo Saignat, Bordeaux 33076, France. ³Institute of Lab Animal Sciences, China Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China.

*These authors contributed equally to this work.

†To whom correspondence should be addressed. E-mail: Eugenia.Gurevich@vanderbilt.edu (E.V.G.); Erwan.bezard@u-bordeaux2.fr (E.B.)

phosphorylation assay, we ascertained that GFP-tagged rat and human GRK6 is functional (fig. S1B). By subcellular fractionation, we found that the exogenous GRK6-GFP was enriched in synaptic membranes, similarly to the endogenous GRK6 (fig. S1C).

First, we tested whether overexpression of GRK6 in the dopamine-depleted striatum would suppress contralateral rotations in response to dopamine agonists in 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-hemileioned rats. We measured the rotation frequency induced by apomorphine in rats injected with either GFP (control) or GRK6 virus into the striatum on the lesioned side. Both the control and GRK6 groups had similarly extensive lesions (Fig. 1A). Fewer than 3% of the tyrosine hydroxylase (TH)-positive terminals remained in the lesioned caudate putamen (CPu) (Fig. 1B). The GRK6-GFP lentivirus induced GRK6 expression throughout the CPu (Fig. 1C). GRK6 expression was detected in medium spiny neurons as determined by double immunohistochemistry for GFP and the marker of these neurons, DARPP-32 (21) (Fig. 1D). Western blots (Fig. 1D) demonstrated the presence of the transgenic GRK6-GFP in the infected striatum. We used rabbit polyclonal antibody to label both endogenous and overexpressed GRK6A (Fig. 1F). The antibody specificity was demonstrated in a separate experiment (fig. S2). Quantification of the transgenic GRK6A demonstrated that the gene transfer increased the total amount of GRK6A in the lesioned striatum by a factor of ~2 (Fig. 1G).

Drug-naïve rats overexpressing GRK6 displayed significantly less frequent apomorphine-induced rotations than control animals (Fig. 2A). Rodents with unilateral 6-OHDA lesion respond to repeated administration of L-dopa with a progressive increase in the rotation frequency (3, 15, 22). Overexpression of GRK6 significantly reduced the rotation frequency after repeated L-dopa treatment as compared to the control group [$P = 0.0014$ by two-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA)] (Fig. 2B), although it did not prevent the increase in the rotation frequency from session to session.

GRK6 suppresses the sensitized rotational response to L-dopa and abnormal involuntary movements in 6-OHDA-lesioned rats
Because antidykinetic therapy is required for already dyskinetic PD patients, we tested whether overexpression of GRK6 would influence preexisting sensitization or dyskinesia. We treated 6-OHDA-lesioned rats with L-dopa for 5 days before injection of GRK6 or control viruses (Fig. 2C). The preinjection rotation frequencies were the same in the control and GRK6 groups, with both groups showing marked behavioral sensitization. However, after the injection, rotation frequencies in the GRK6 group were reduced ($P = 0.0247$) (Fig. 1C).

We also studied the effect of GRK6 overexpression on a rodent analog of dyskinesia, abnormal involuntary movements (AIMs) (23, 24). Repeated administration of L-dopa to 6-OHDA-lesioned rats leads to a progressive increase in the AIM score (Fig. 2D). The score was markedly reduced in animals expressing GRK6 (Fig. 2D). Thus, the increased availability of GRK6 alleviates already established dyskinesia.

GRK6 knockdown augments the sensitized rotational response to L-dopa and AIMs in 6-OHDA-lesioned rats

To evaluate the role of endogenous GRK6, we tested whether knockdown of GRK6 with lentivirus-delivered microRNA (miRNA) would influence the behavioral effects of L-dopa. We have constructed a lentivirus carrying two miRNA sequences directed against different regions of GRK6 and co-cistronic GFP to label infected cells (fig. S3A). A lentivirus encoding nonsense miRNA and GFP served as control.

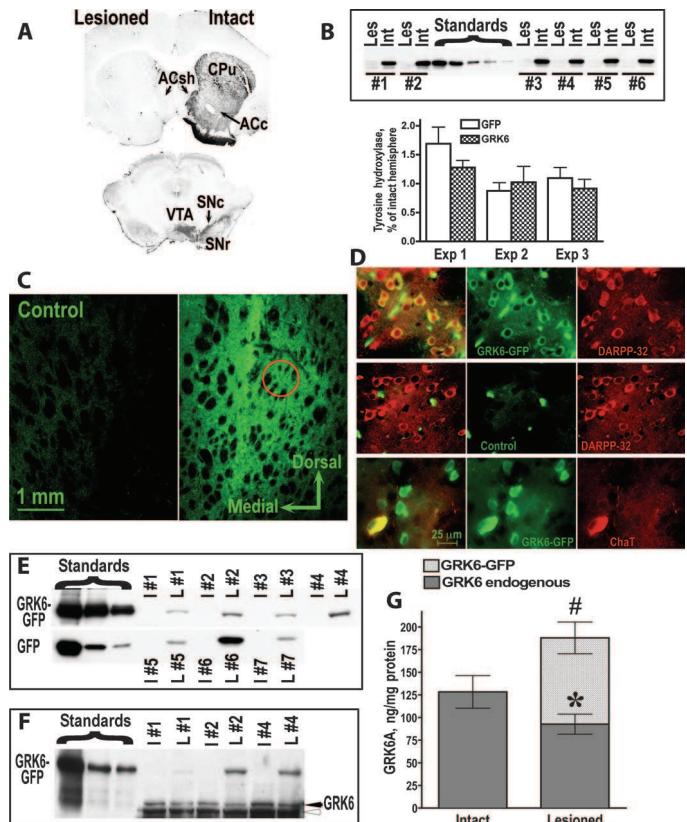


Fig. 1. Lentivirus-induced GRK6 expression in the rat dopamine-depleted striatum. **(A)** Loss of dopaminergic innervation in the striatum and dopaminergic neurons in the substantia nigra was detected by immunohistochemistry for TH. ACsh, shell of the accumbens; ACC, core of the accumbens; SNC, substantia nigra pars compacta; SNR, substantia nigra pars reticulata; VTA, ventral tegmental area. **(B)** Quantification of the Western blots for TH in the lesioned (Les) and intact (Int) striatum in animals expressing GFP or GRK6. The inset shows a representative Western blot for TH. Numbers refer to individual animals. $n \geq 8$ in each group displayed in lower panel. **(C)** Photomicrograph of the intact striatum (left panel) and the striatum infected with the GRK6-GFP lentivirus (right panel) immunostained for GFP. **(D)** Expression of GRK6-GFP in striatal neurons. The upper row of images demonstrates the expression of GRK6 in medium spiny neurons by double staining for GFP and DARPP-32. The circle in (C) (right panel) indicates the approximate position where these photographs were taken. The middle row of images shows photomicrographs taken from similar positions in the control uninfected hemisphere [left image in (C)]. The lower row of images demonstrates the expression of GRK6 in cholinergic interneurons by double staining for GFP and choline acetyltransferase (ChAT). **(E)** Detection of the GRK6-GFP expression by Western blot. The expression of the GRK6 transgene in four animals in the intact and lesioned injected hemisphere detected with antibody to GFP is shown. The lower row shows expression of GFP in control animals. **(F)** Detection of the endogenous GRK6 and GRK6-GFP transgene expression by Western blot. Black arrowhead, GRK6A; white arrowhead, nonspecific band. **(G)** Quantification of the Western blot data for the expression of GRK6-GFP and endogenous GRK6A in the intact and lesioned hemisphere. Serial dilutions of purified human GRK6A were used as standards (15). The expression of endogenous GRK6A and total GRK6A (endogenous plus transgenic) in the intact and lesioned (infected) hemisphere was compared by paired *t* test. * $P < 0.05$ to the intact striatum, total GRK6A; # $P < 0.05$ to the intact striatum, total GRK6A.

6-OHDA–lesioned rats were treated with L-dopa for 5 days before virus injection. The preinjection rotation frequencies were the same in the control and knockdown groups, but after the virus injection, the rotation frequencies in the GRK6 knockdown group were significantly increased ($P = 0.0057$ by two-way repeated-measures ANOVA) (Fig. 2E). The effect was most evident on the last testing days because there was a significant increase in the sensitization slope in the knockdown group ($P = 0.001$). Similarly, GRK6 knockdown increased the frequency of AIMs and exacerbated the progressive increase in AIM score (Fig. 2F).

Postmortem examination of the infected striatum revealed miRNA expression in DARPP-32–positive medium spiny striatal neurons (fig. S4A). The expression of GRK6A was significantly decreased in the lesioned as compared to the intact striatum (fig. S4, B and C), in agreement with our previous report (15). We found that the decrease was largely due to the GRK6A variant, whereas the change in GRK6B was much smaller, albeit significant (fig. S4, D and E). The GRK6 concentration was significantly decreased by the GRK6 miRNA as compared to the control lentivirus (fig. S4, B to E). Because the miRNA sequences were directed against the regions common to GRK6A and GRK8B isoforms (fig. S3B), both isoforms were down-regulated to a similar extent (38.5% GRK6A and 36% GRK6B) (fig. S4, C and E). Thus, decreased availability of GRK6 exacerbates dyskinesia.

GRK6 promotes internalization of D1 receptors and attenuates the signaling effects of L-dopa in 6-OHDA rats

We examined the subcellular localization of three GPCRs, D1 and D2 dopamine receptors and mGluR5 glutamate receptor, after acute L-dopa challenge in rats expressing GRK6 or GFP (Fig. 3). Although D1 immunostaining was restricted to the plasma membrane in the GFP group (Fig. 3, top right panel) (16, 25), it was clearly intracellular in GRK6 animals (Fig. 3, top left panel), indicating greater D1 receptor internalization. Conversely, as a substantial proportion of the D2 receptor was already internalized in GFP-expressing animals

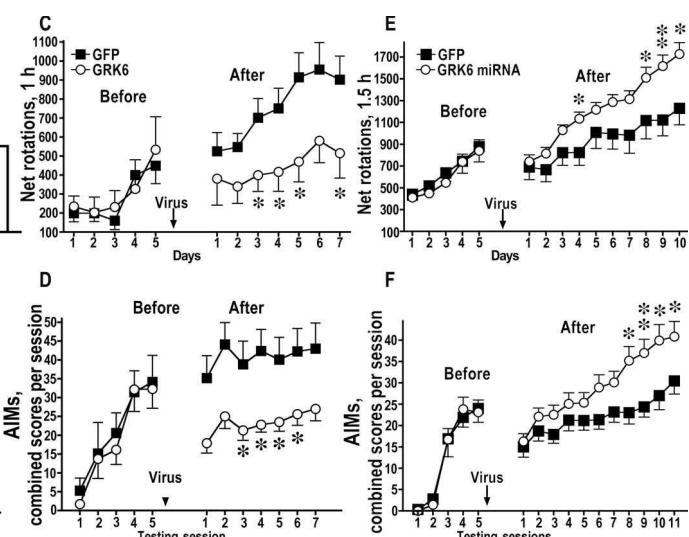
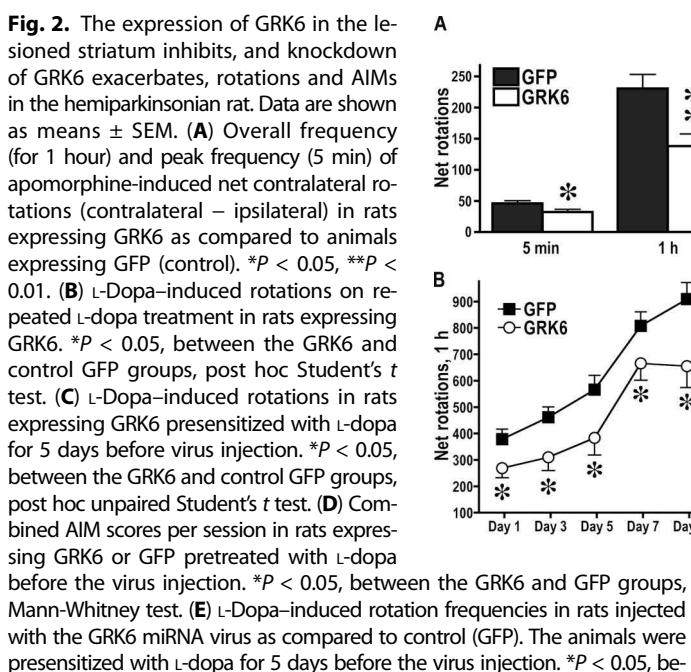
(Fig. 3, right middle panel) (16), GRK6 did not further promote the D2 receptor internalization (Fig. 3, left middle panel). For comparison, we examined internalization of the mGluR5 receptor in both D1- and D2-expressing medium spiny neurons and found no differences in mGluR5 internalization between the GFP- and GRK6-expressing animals (Fig. 3, lower panels).

Next, we tested whether overexpression of GRK6 in the lesioned striatum blunted dopaminergic signaling after L-dopa administration. The amount of dynorphin, which is largely coexpressed with D1 receptors (26, 27), is reduced by the loss of dopamine but significantly up-regulated by subsequent chronic L-dopa treatment (3, 22). Similarly, D3 receptors are reduced by dopamine depletion but up-regulated by chronic L-dopa in the CPu (3, 22). GRK6 expression suppressed L-dopa-induced up-regulation of prodynorphin mRNA (Fig. 4, A and B) and D3 receptor binding (Fig. 4, C and D) in the CPu. Collectively, these data suggest that expressed GRK6 normalizes the D1 signaling by promoting receptor desensitization.

Enkephalin, which is usually coexpressed with D2 receptors (26, 27), is up-regulated in the dopamine-depleted striatum (3, 28). GRK6 significantly reduced the expression of preproenkephalin mRNA in the striatum in both saline- and L-dopa-treated lesioned rats (Fig. 4, E and F). Thus, GRK6 also normalizes the signaling in D2 receptor-bearing indirect pathway neurons.

GRK6 alleviates LID in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine–lesioned macaques

Next, we investigated the effectiveness of GRK6 in the gold standard model of LID, L-dopa–treated, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)–lesioned macaque monkeys (29). L-Dopa–treated dyskinetic macaques received GFP ($n = 6$) or GRK6-GFP ($n = 6$) virus in the motor striatum. Upon completion of the behavioral experiments, all monkeys were tested to evaluate the lesion and GRK6 expression. Both groups had similar extensive dopamine depletion, as evidenced by the marked decrease in the TH immunoreactivity and dopamine



tween the GRK6 miRNA and GFP groups, post hoc unpaired Student's *t* test. (F) Combined AIM scores per session in rats with GRK6 knockdown as compared to control. Both groups were pretreated with L-dopa before the virus injection. * $P < 0.05$, between the GRK6 miRNA and GFP groups, Mann-Whitney test.

transporter (DAT) binding (Fig. 5, A and B). GRK6-GFP was readily detectable in the motor putamen by immunohistochemistry (Fig. 5C). Using Western blotting, we further confirmed the presence of GRK6-GFP at the level targeted during surgery [anterior commissural, 0 mm (AC0)], whereas there was no expression in the adjacent nontargeted area (AC + 3 mm) (Fig. 5D).

Before GRK6 administration, parkinsonian disability scores in both OFF (before L-dopa administration) and ON (after L-dopa administration) states (Fig. 6A), LID scores in the ON state (Fig. 6B), and the time course of L-dopa-induced locomotor activity (Fig. 6C) were indistinguishable between the two groups. Starting at 6 weeks after sur-

gery, when behavioral experiments resumed, the antiparkinsonian efficacy of L-dopa was comparable in GRK6 and GFP animals (Fig. 6, A and D). There was an overall positive effect of GRK6 on the parkinsonian disability score, suggesting that GRK6 animals benefited longer from L-dopa than controls (Fig. 6, A and D). In agreement with our rodent data, monkeys expressing GRK6 had significantly less intense LID (Fig. 6, B and E). There was also a significant decrease in

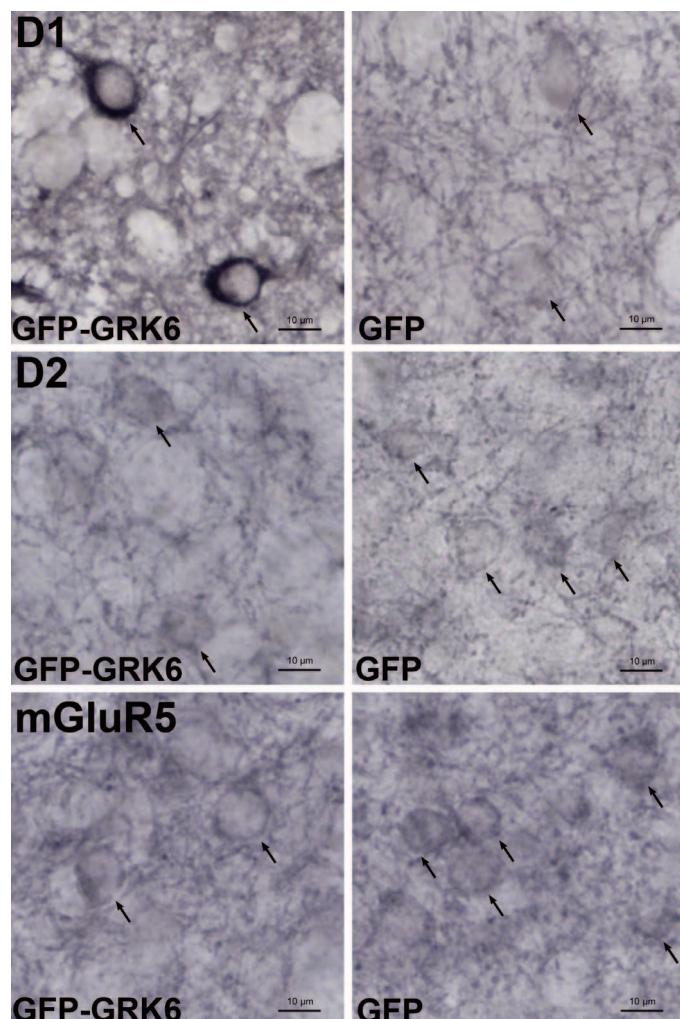


Fig. 3. GRK6 promotes D1 dopamine receptor internalization in the lesioned striatum but does not affect D2 dopamine and mGluR5 glutamate receptor localization. In an area delineated by GFP immunohistochemistry, medium spiny neurons immunopositive for the D1 receptor showed plasma membrane and neuropil D1 receptor localization in GFP animals (top right) and prominent cytoplasmic localization in GRK6-expressing animals (top left; arrows). This effect was specific for the D1 receptor, as two other GPCRs, D2 receptor (middle) expressed in different medium spiny neurons and mGluR5 (lower) expressed in both D1- and D2-bearing neurons, remained cytoplasmic (D2, arrows) and both membranous and cytoplasmic (mGluR5, arrows) in both groups.

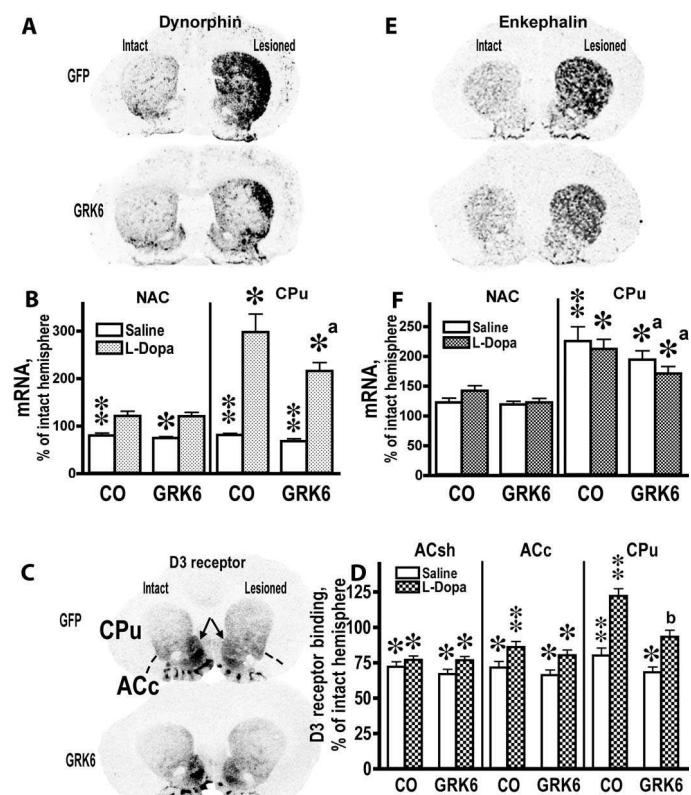


Fig. 4. The expression of GRK6 in the lesioned striatum inhibits D1 receptor- and D2 receptor-mediated signaling. Rats lesioned with 6-OHDA and treated with L-dopa for 10 days expressed either GFP (control) or GRK6 in the lesioned striatum. (A) Representative autoradiograms showing the expression of prodynorphin mRNA. (B) Quantification of the prodynorphin *in situ* hybridization. Data are shown for the lesioned hemisphere as percentages of the intact hemisphere values (means \pm SEM). *P < 0.001, **P < 0.01, as compared to the intact hemisphere by repeated-measures ANOVA; ^aP < 0.05, as compared to the L-dopa-treated GFP-expressing group (CO), Mann-Whitney test. (C) Representative autoradiograms showing the D3 receptor binding in the lesioned striatum. Note the reduction of the D3 receptor concentration in the shell (arrows) and core (approximate borders indicated by dashed lines) of the nucleus accumbens. Also note the up-regulation of the D3 receptor in the lesioned striatum caused by L-dopa and the reduction of the D3 receptor in the CPu of GRK6-expressing rats. (D) Quantification of the D3 receptor binding data (means \pm SEM). *P < 0.001, **P < 0.01, as compared to the intact hemisphere by repeated-measures ANOVA; ^bP < 0.01, as compared to the L-dopa-treated GFP-expressing group, Mann-Whitney test. (E) Representative autoradiograms showing the expression of preproenkephalin mRNA in the lesioned striatum. (F) Quantification of the preproenkephalin *in situ* hybridization data (mean \pm SEM). *P < 0.001, **P < 0.01, as compared to the intact hemisphere by repeated-measures ANOVA; ^aP < 0.05, as compared to the GFP-expressing group, Mann-Whitney test.

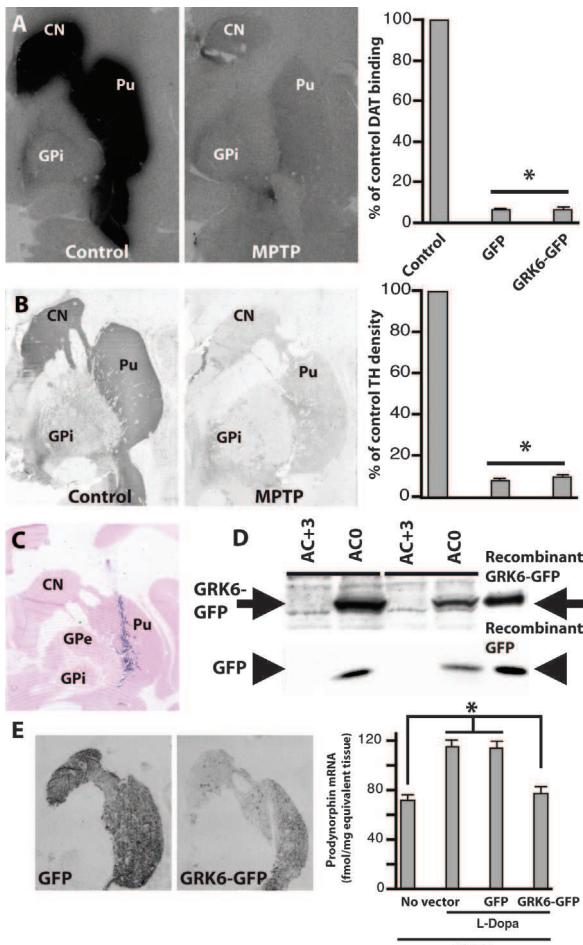


Fig. 5. Extent of dopaminergic lesion and lentivirus-mediated expression of GRK6 in the motor striatum of MPTP-lesioned monkeys. (**A** and **B**) Representative examples and quantification (right panel) of DAT binding (A) and TH immunohistochemistry (B) in the motor striatum show marked dopamine denervation in both the caudate nucleus (CN) and the putamen (Pu) (37) with a faint signal around the globus pallidus (GPI), as reported (38). Both GFP and GRK6-GFP groups showed lesions of comparable extent [DAT: $F(2,17) = 3828, P < 0.0001$; TH: $F(2,17) = 3331, P < 0.0001$; * $P < 0.001$ versus control animals, one-way ANOVA followed by Bonferroni; means \pm SEM]. (**C**) Representative GFP immunostaining at the most caudal level targeted in the striatum [globus pallidus pars externalis (GPe)] with a needle track. (**D**) Detection of the GRK6-GFP expression by Western blot. Samples of the monkey putamen were collected at the most rostral injection site (AC0) and 3 mm further rostrally to the injection site (AC+3). Total protein (5 μ g) was loaded per lane, and GRK6-GFP and GFP were detected with mouse antibody to GFP (Clontech). Expression of the GRK6 and GFP transgenes in two GRK6-GFP-injected and two GFP-injected monkeys is shown. Recombinant proteins were loaded for comparison (right side of the blot). (**E**) Prodynorphin mRNA in situ detection in non-L-dopa-treated MPTP, L-dopa-treated MPTP, (L-dopa-treated MPTP) GFP, and (L-dopa-treated MPTP) GRK6-GFP monkeys. Quantitative analysis (right panel) showed that prodynorphin mRNA is reduced in the GRK6-GFP group to a level comparable to that of the non-L-dopa-treated situation [$F(3,23) = 14.01, P < 0.0001$; * $P < 0.01$ versus non-L-dopa-treated MPTP and (L-dopa-treated MPTP) GRK6-GFP monkeys, one-way ANOVA followed by Bonferroni correction; means \pm SEM].

locomotor activity during the ON state in GRK6 animals in comparison to the GFP group (Fig. 6, C and F). Thus, GRK6 expression in the macaque motor striatum diminished LID intensity without interfering with the antiparkinsonian action of L-dopa.

As in the rat, prodynorphin mRNA expression detected by in situ hybridization was reduced in the GRK6-GFP group in comparison to the GFP group (Fig. 5E), with the latter showing the enhanced prodynorphin expression typical for dyskinetic animals in comparison with non-L-dopa-treated MPTP monkeys (Fig. 5E) (30). Collectively, these data indicate that expressed GRK6 improves LID by normalizing D1 receptor signaling.

GRK6 prolongs the antiparkinsonian action of a lower L-dopa dose

One strategy for controlling LID severity is to decrease the L-dopa dosage. In the L-dopa-treated, MPTP-lesioned macaque monkey, a dose corresponding to 50% of the optimal yields shorter antiparkinsonian effect. Control monkeys displayed this phenomenon (Fig. 7, A and C), with the corresponding decrease in LID severity and duration (Fig. 7, B and D). In contrast, in GRK6-expressing monkeys treated with the 50% L-dopa dose, the duration of the antiparkinsonian effect was comparable to that of the 100% dose (Fig. 7, A and C) but without LID (Fig. 7, B and D). The overall locomotor activity of control animals treated with the 50% dose of L-dopa was reduced by 50%, reflecting shorter duration of L-dopa effect. The GRK6-expressing monkeys showed a less pronounced decrease in locomotor activity due to longer L-dopa effect (Fig. 7E).

GRK6 reduces LID induced by selective D1 and D2 agonists

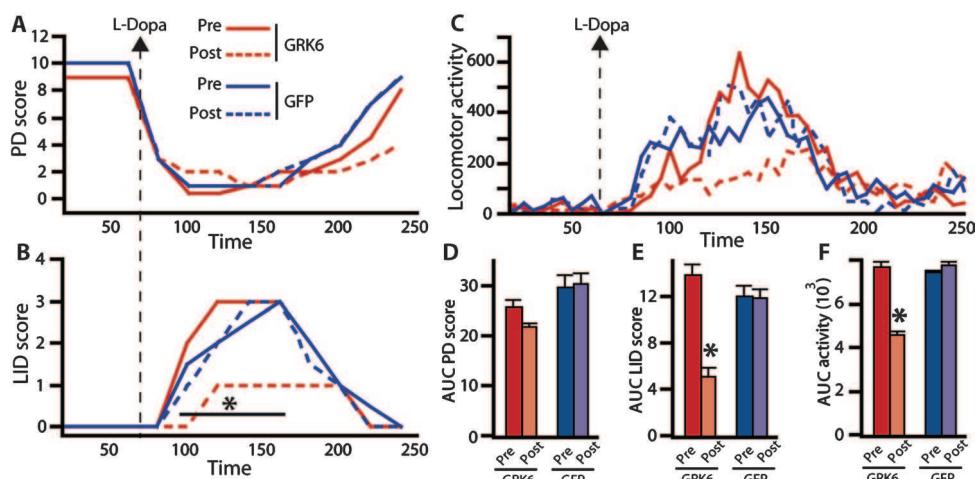
Because L-dopa is a D1 or D2 indirect agonist, we investigated how GRK6 expression modifies the effects of D1 and D2 agonists. GRK6 monkeys displayed a shortening of the D1 agonist-mediated antiparkinsonian action compared to controls ($P < 0.05$) (Fig. 7, F and H), which was accompanied by a significant reduction in LID severity and duration ($P < 0.05$) (Fig. 7, G and I). We also detected a significant difference in the antiparkinsonian action of a D2 agonist between the two groups ($P < 0.05$) (Fig. 7, F and H), with GRK6 monkeys displaying lower LID intensity than controls ($P < 0.05$) (Fig. 7, G and I). Thus, the anti-LID effect of GRK6 is mediated by reduced supersensitivity of both D1 and D2 receptors.

DISCUSSION

Loss of dopamine in PD causes multiple changes in the dopamine-mediated signaling (2, 3, 26). The initial dysregulation of signaling pathways is further aggravated by chronic L-dopa treatment, eventually leading to dyskinesia and other motor complications. Although the exact molecular mechanisms of LID remain to be elucidated, exaggerated signaling of the striatal D1 (4, 5, 23), D2 (7), and D3 (3, 8, 22) receptors has been implicated in LID in rodents and primates, suggesting that normalization of this excessive signaling may be beneficial. The challenge is to reduce the signaling in a way that alleviates LID while preserving the antiparkinsonian activity of the drug, which is also mediated by dopamine receptors.

Our data demonstrate that promoting GPCR desensitization in the dopamine-depleted striatum via virus-mediated overexpression of GRK6 attenuates LID in both primate and rodent models. GRK6

Fig. 6. Virus-mediated GRK6 expression in the macaque motor striatum decreases LID intensity. (**A** and **B**) Only the median scores are shown, without ranges for readability. The dashed vertical line indicates the administration of L-dopa (L-dopa-carbidopa, 4:1; see Materials and Methods). (**A**) GRK6 expression had no impact on parkinsonian disability (PD) score at any time point. (**D**) Analysis of the area under the curve (AUC) of PD scores revealed a trend for a positive effect (mean \pm SEM). The data for pretesting and posttesting sessions were analyzed separately by two-way repeated-measures ANOVA, with Group (GRK6 versus GFP) as the between-group factor and Session (before and after surgery) as the repeated-measures factor [Group effect: $F(1,21) = 6.85, P = 0.027$; Session effect: $F(1,21) = 5.69, P = 0.04$; Interaction: $F(1,21) = 13.83, P = 0.004$]. The significant interaction suggests that the GRK6 animals benefit longer from L-dopa than the GFP animals. (**B**) GRK6 expression reduced L-dopa-induced LID from 100 min until 160 min in comparison with the presurgery situation (median scores; $*P < 0.05$, Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test). (**E**) The overall positive effect on LID severity is further exemplified by the AUC data [means \pm SEM; Group effect: $F(1,21) = 11.09, P = 0.008$; Session effect: $F(1,21) = 30.23, P = 0.0003$; Interaction: $F(1,21) = 11.09, P = 0.008$], which show a significant difference in LID severity in GRK6 animals after surgery compared to their scores before surgery and to the GFP animals. $*P < 0.05$ versus all others. (**C** and **F**) Consequently, locomotor activity was lower in GRK6 animals [Group effect: $F(1,21) = 31.82, P = 0.0003$; Session effect: $F(1,21) = 157.41, P < 0.0001$; Interaction: $F(1,21) = 206.75, P < 0.0001$]. $*P < 0.05$ versus all others.



suppresses LID in dyskinetic monkeys without compromising the antiparkinsonian effects of L-dopa. GRK6 prolongs the antiparkinsonian effect, especially at the lower L-dopa dose. The duration of the antiparkinsonian effect of the half-dose in GRK6-expressing animals was even slightly longer than that of the full L-dopa dose in controls. The additional time afforded by GRK6 was LID-free. In the rodent model, GRK6 consistently reduced the rotation frequency and the appearance of AIMs. The inhibition of the rotations and AIMs in rats by GRK6 parallels its potent antidykinetic activity in the primate model of PD, suggesting an overlap between the molecular mechanisms underlying LID in primates and dyskinetic behaviors in rodents. Collectively, these data demonstrate that increased availability of GRK6 helps to control LID without sacrificing the antiparkinsonian benefits of L-dopa.

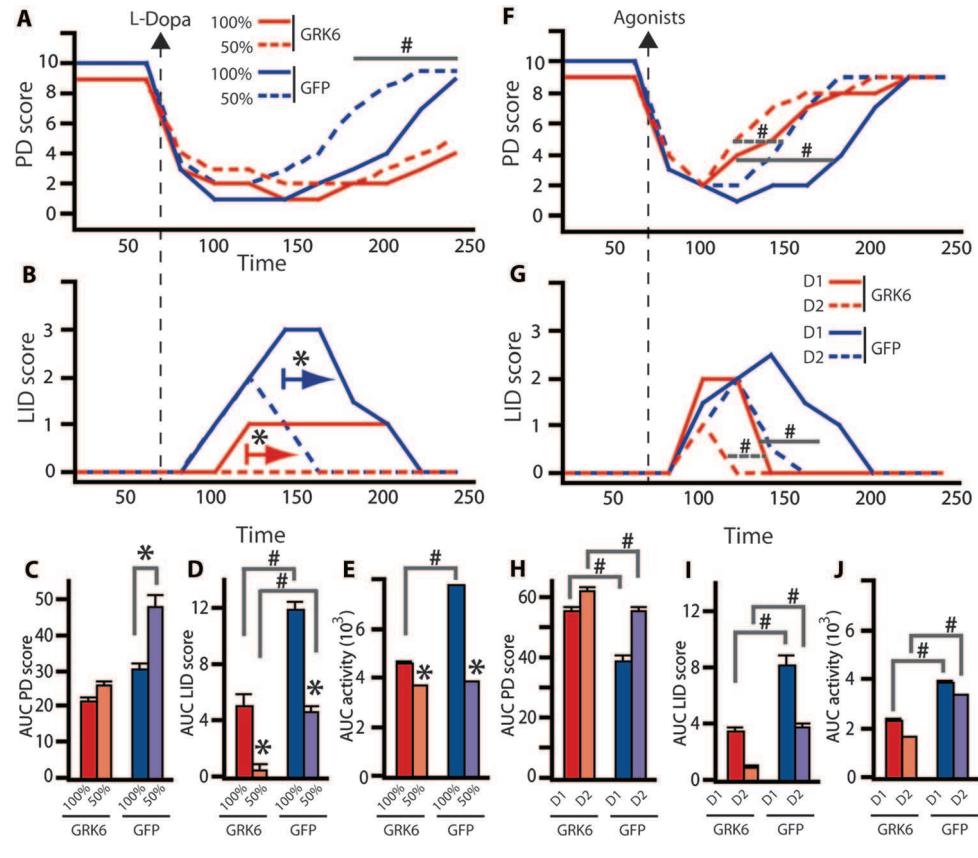
The rat knockdown studies demonstrated that reduced availability of GRK6 promoted rotational behavior and increased AIM scores, in agreement with our finding (15) that dopamine depletion reduces the expression of GRK6 and L-dopa treatment does not reverse this reduction. Here, we showed that GRK6A splice variant is most affected by the lesion. The loss of GRK6 in the lesioned hemisphere suggests a link between lower GRK6 availability and dyskinesia. MiRNA-mediated GRK6 knockdown exacerbated the decrease in the GRK6 expression in the lesioned hemisphere and aggravated the behavioral consequences of dopamine depletion and L-dopa treatment, supporting the role of low GRK6 in dyskinesia. Conversely, via overexpression of GRK6A, the splice variant most affected by the lesion, we significantly ameliorated dyskinetic behavior. The lesion reduced the GRK6 concentration by ~40%, and lentiviral knockdown further reduced it by 36 to 40%, whereas overexpression doubled GRK6 concentration. These numbers are in good agreement with the work by Gainetdinov *et al.* (13), who found in GRK6 hemizygous mice (with ~50% reduction in the GRK6 concentration) a behavioral phenotype close to that of knockout animals. Thus, even a modest modulation of GRK6 concentration seems to have critical impact on dopaminergic signaling

and dopamine-dependent behavior. These data underscore an important functional role of GRK6 in signaling mechanisms underlying dyskinesia.

GRK6 likely alters dopamine-dependent behavior by facilitating desensitization of dopamine receptors. Previous work with mice has demonstrated that behavioral supersensitivity to psychostimulants caused by GRK6 knockout is due to modified signaling through the D2 but not the D1 receptor (13). However, dopamine depletion and subsequent development of LID in the course of L-dopa treatment precipitates multiple marked changes in the striatal signaling pathways (29, 31). Although both receptor subtypes are involved in LID, the D1 receptor seems to play a particularly important role (5, 16, 25). Thus, we expected that in the dyskinetic brain, GRK6 might act on both major dopamine receptor subtypes, which proved to be the case. GRK6 reduced LID caused by selective D1 and D2 agonists, indicating that desensitization of both receptor subtypes was facilitated. In this respect, the effect of GRK6 is qualitatively different from our previous results with RGS9-2 (7), which affected D2 receptors coupled to its target Gα_{i/o} but not D1 receptors coupled to Gα_s (32). In hemiparkinsonian rats, GRK6 promoted D1 receptor internalization and suppressed the L-dopa-induced up-regulation of prodynorphin and D3 receptor attributed to the enhanced D1 receptor signaling (22). Similarly, GRK6 reduced the prodynorphin expression in dyskinetic monkeys. Although we did not detect any increase in D2 receptor internalization, GRK6 reduced the up-regulation of preproenkephalin mRNA expressed in D2 receptor-bearing neurons (26–28). Thus, the pattern of behavioral and molecular effects is consistent with the conclusion that GRK6 alleviated LID by facilitating the desensitization of both major dopamine receptor subtypes.

In animals treated with selective D1 or D2/D3 agonists, GRK6 not only suppressed LID but also shortened the overall duration of their effects, including the antiparkinsonian activity, which is consistent with faster receptor desensitization due to increased GRK6 availability.

Fig. 7. Virus-mediated GRK6 expression in the macaque motor striatum prolongs L-dopa action and reduces the dyskinesia elicited by D1 and D2 agonists. **(A)** Parkinsonian scores as function of time after administration of full or 50% L-dopa dose in GFP- or GRK6-expressing animals (#, scores not statistically different from baseline from 180 min onward in the GFP group treated with 50% dose). **(C)** AUC data of PD scores. The GFP group displayed worse PD scores with the 50% dose as compared to the full dose (* $P < 0.05$, Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test), whereas the GRK6 group did not. **(B)** Dyskinesia scores as function of time after administration of full or 50% L-dopa dose in GFP- or GRK6-expressing animals. Dyskinesia is reduced with 50% dose in GFP from 140 min onward (blue arrow; * $P < 0.05$ to 100% dose, Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test) and GRK6 from 120 min (red arrow). **(D)** Analysis of the AUC of LID scores shows significant reduction in LID in both groups (* $P < 0.05$, between 100 and 50% doses, Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test). GRK6 animals display less severe LID than their GFP counterparts (# $P < 0.05$, Mann-Whitney test). **(E)** GRK6 animals show lower AUC of activity counts than the GFP group (# $P < 0.05$) with the full dose but the same AUC at 50% dose. Both groups show a significant reduction in activity counts at the 50% dose in comparison with their respective 100% dose (* $P < 0.05$). **(F)** GRK6 animals displayed reduced duration of antiparkinsonian effects of D1- and D2-selective agonists, with PD scores worsening from 120 min until 180 min (solid gray line) and from 120 min until 140 min (dashed gray line), respectively (median scores; # $P < 0.05$, Mann-Whitney test). **(G)** AUC analysis shows shorter effects of D1 and D2 agonists in GRK6 than in GFP animals [$\#P = 0.004$ (D1 agonist) and 0.03 (D2 agonist), Mann-Whitney test]. **(H)**



at 50% dose. Both groups show a significant reduction in activity counts at the 50% dose in comparison with their respective 100% dose (* $P < 0.05$). **(F)** GRK6 animals displayed reduced duration of antiparkinsonian effects of D1- and D2-selective agonists, with PD scores worsening from 120 min until 180 min (solid gray line) and from 120 min until 140 min (dashed gray line), respectively (median scores; # $P < 0.05$, Mann-Whitney test). **(G)** AUC analysis shows shorter effects of D1 and D2 agonists in GRK6 than in GFP animals [$\#P = 0.004$ (D1 agonist) and 0.03 (D2 agonist), Mann-Whitney test]. **(H)**

Conversely, in GRK6-expressing animals, L-dopa-induced antiparkinsonian effect lasted longer than in control monkeys. Because of the high selectivity of GRKs for active receptors (33), we expected the anti-LID effect of GRK6 to be coupled with the preservation of the antiparkinsonian activity. The receptor must be activated, allowing the signal to go through, before it is desensitized by GRK-mediated phosphorylation. Apparently, this initial signaling is sufficient for the antiparkinsonian effect but not for LID. Unique effects of L-dopa might arise from its simultaneous action at both D1 and D2 receptors. The presence of GRK6 is likely to shift the balance in favor of D2-like receptors because they do not desensitize as readily as D1 receptors (34, 35). This conclusion is consistent with our finding that in monkeys GRK6 had only a modest effect on the duration of D2-mediated effects, whereas it substantially shortened that of the D1 agonist (Fig. 7). Such rebalancing of the activity of D1 and D2 receptors and, consequently, of the direct and indirect pathways might contribute to extended antiparkinsonian benefits.

Our results demonstrate that a targeted enhancement of GPCR desensitization machinery substantially relieves dyskinesia in two animal models. This amelioration of LID is combined with a longer

GRK6 animals displayed a reduced duration of D1 agonist- and D2 agonist-induced dyskinesia from 140 min until 160 min (solid gray line) and around 120 min (dashed gray line), respectively (median scores; # $P < 0.05$, Mann-Whitney test). **(I)** AUC analysis shows reduced duration of D1 agonist- and D2 agonist-induced dyskinesia in GRK6 animals [$\#P = 0.004$ (D1 agonist) and 0.004 (D2 agonist), Mann-Whitney test]. **(J)** AUC of activity counts is reduced in GRK6 animals as compared to GFP animals after both D1 and D2 agonist administration (# $P < 0.05$, unpaired t test).

duration of the antiparkinsonian benefits of L-dopa, offering the hope of achieving the elusive goal of controlling both LID and motor fluctuations. These results pave the way for the development of treatments for dyskinesia in Parkinson's patients based on judicious manipulation of receptor signaling. Our data identify the receptor desensitization machinery as a therapeutic target in numerous disorders associated with aberrant signaling via GPCRs, including schizophrenia and drug abuse.

MATERIALS AND METHODS

Virus construction and preparation

The full-length coding sequence of the rat or human GRK6A C-terminally tagged with GFP or GFP alone (control) was cloned into the lentiviral vector pLenti6/V5-DEST, and the virus was produced using ViraPower system (Invitrogen) (fig. S1A). MiRNA sequences targeting rat GRK6 were selected with Invitrogen Block-iT RNAi Designer software (fig. S3), and miRNA-encoding viruses were produced with Block-iT HiPerform Lentiviral Pol II RNAi expression system (Invitrogen).

Rat experiments

Adult Sprague-Dawley rats (Charles River) were used. The animals were housed at the Vanderbilt University animal facility in a 12:12 light-dark cycle with free access to food and water. All procedures followed the National Institutes of Health guidelines and were approved by the Vanderbilt University Institutional Animal Care and Use Committee. The 6-OHDA lesion was performed as described (3, 15). The viruses were injected either at the time of the 6-OHDA lesion or after the behavioral pretesting. The animals were tested for rotations in an automated rotometer (AccuScan Instruments) as described (3, 15). In the experiments with AIMs, rats were assessed for AIMs on a 0 to 4 AIM rating scale (24).

Monkey experiments

All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) for the care of laboratory animals in an American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care–accredited facility. Veterinarians skilled in the healthcare and maintenance of nonhuman primates supervised animal care. Experiments followed published procedures (5, 7, 8, 31). After parkinsonian syndrome stabilized, all 12 MPTP-treated monkeys were treated with Modopar for 6 months to develop dyskinesia. The improved Horsley-Clarke stereotactic technique was used as described (2, 5, 7, 8, 36, 37). Either GRK6-GFP ($n = 6$) or GFP ($n = 6$) lentivirus was injected into the dorsolateral putamen as described (7). The response of monkeys to L-dopa was assessed as described (7, 8, 31, 36).

Data analysis

The rotation data were analyzed by two-way repeated-measures ANOVA, with Group (GFP versus GRK6) as the between-group factor and Session as the repeated-measures factor. If the significant effect of Group was observed, the data for individual sessions were compared by unpaired Student's *t* test. The AIM scores were compared for each session with the Mann-Whitney nonparametric test. Neurochemical data were analyzed by repeated-measures ANOVA, with Hemisphere (intact versus lesioned) as the within-group factor and Group (GRK6 versus GFP) as the between-group factor, or by Mann-Whitney test where appropriate. The value of $P < 0.05$ was considered significant. Detailed description of rat experiments is given in Supplementary Material. Monkey behavioral data were analyzed by two-way repeated-measures ANOVA, with Group (GRK6 versus GFP) as the between-group factor and Session (before and after surgery) as the within-group factor. Additional analysis was performed with Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test or Mann-Whitney test where appropriate.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

www.scientifictranslationalmedicine.org/cgi/content/full/2/28/28ra28/DC1

Materials and Methods

Fig. S1. The GFP-tagged GRK6 is functional and has the subcellular localization of the endogenous GRK6.

Fig. S2. Antibodies to GRK6 selectively recognize GRK6A or GRK6B splicing variants.

Fig. S3. The lentivirus carrying two chained miRNAs targets both GRK6A and GRK6B splice variants.

Fig. S4. Infection of the rat striatum with the miRNA lentivirus induces the GRK6 knockdown. References

REFERENCES AND NOTES

1. S. Fahn, How do you treat motor complications in Parkinson's disease: Medicine, surgery, or both? *Ann. Neurol.* **64** (Suppl. 2), S56–S64 (2008).
2. E. Bezard, C. E. Gross, L. Qin, V. V. Gurevich, J. L. Benovic, E. V. Gurevich, L-DOPA reverses the MPTP-induced elevation of the arrestin2 and GRK6 expression and enhanced ERK activation in monkey brain. *Neurobiol. Dis.* **18**, 323–335 (2005).
3. E. Bychkov, M. R. Ahmed, K. N. Dalby, E. V. Gurevich, Dopamine depletion and subsequent treatment with L-DOPA, but not the long-lived dopamine agonist pergolide, enhances activity of the Akt pathway in the rat striatum. *J. Neurochem.* **102**, 699–711 (2007).
4. V. Sgambato-Faure, V. Buggia, F. Gilbert, D. Lévesque, A. L. Benabid, F. Berger, Coordinated and spatial upregulation of arc in striatonigral neurons correlates with L-dopa-induced behavioral sensitization in dyskinetic rats. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **64**, 936–947 (2005).
5. I. Aubert, C. Guigoni, K. Håkansson, Q. Li, S. Dovero, N. Barthe, B. H. Bioulac, C. E. Gross, G. Fisone, B. Bloch, E. Bezard, Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia. *Ann. Neurol.* **57**, 17–26 (2005).
6. A. Kovoor, P. Seyfarth, J. Ebert, S. Barghshoon, C. K. Chen, S. Schwarz, J. D. Axelrod, B. N. Cheyette, M. I. Simon, H. A. Lester, J. Schwarz, D2 dopamine receptors colocalize regulator of G-protein signaling 9-2 (RG59-2) via the RG59 DEP domain, and RG59 knock-out mice develop dyskinesias associated with dopamine pathways. *J. Neurosci.* **25**, 2157–2165 (2005).
7. S. J. Gold, C. V. Hoang, B. W. Potts, G. Porras, E. Pioli, K. W. Kim, A. Nadjar, C. Qin, G. J. LaHoste, Q. Li, B. H. Bioulac, J. L. Waugh, E. Gurevich, R. L. Neve, E. Bezard, RG59-2 negatively modulates L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia in experimental Parkinson's disease. *J. Neurosci.* **27**, 14338–14348 (2007).
8. E. Bézard, S. Ferry, U. Mach, H. Stark, L. Leriche, T. Boraud, C. Gross, P. Sokoloff, Attenuation of levodopa-induced dyskinesia by normalizing dopamine D3 receptor function. *Nat. Med.* **9**, 762–767 (2003).
9. S. M. DeWire, S. Ahn, R. J. Lefkowitz, S. K. Shenoy, β -Arrestins and cell signaling. *Annu. Rev. Physiol.* **69**, 483–510 (2007).
10. E. V. Gurevich, V. V. Gurevich, Arrestins: Ubiquitous regulators of cellular signaling pathways. *Genome Biol.* **7**, 236 (2006).
11. L. M. Bohn, R. R. Gainetdinov, T. D. Sotnikova, I. O. Medvedev, R. J. Lefkowitz, L. A. Dykstra, M. G. Caron, Enhanced rewarding properties of morphine, but not cocaine, in β arrestin-2 knock-out mice. *J. Neurosci.* **23**, 10265–10273 (2003).
12. L. M. Bohn, R. J. Lefkowitz, R. R. Gainetdinov, K. Peppe, M. G. Caron, F. T. Lin, Enhanced morphine analgesia in mice lacking β -arrestin 2. *Science* **286**, 2495–2498 (1999).
13. R. R. Gainetdinov, L. M. Bohn, T. D. Sotnikova, M. Cyr, A. Laakso, A. D. Macrae, G. E. Torres, K. M. Kim, R. J. Lefkowitz, M. G. Caron, R. T. Premont, Dopaminergic supersensitivity in G protein-coupled receptor kinase 6-deficient mice. *Neuron* **38**, 291–303 (2003).
14. R. R. Gainetdinov, L. M. Bohn, J. K. Walker, S. A. Laporte, A. D. Macrae, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, R. T. Premont, Muscarinic supersensitivity and impaired receptor desensitization in G protein-coupled receptor kinase 5-deficient mice. *Neuron* **24**, 1029–1036 (1999).
15. M. R. Ahmed, E. Bychkov, V. V. Gurevich, J. L. Benovic, E. V. Gurevich, Altered expression and subcellular distribution of GRK subtypes in the dopamine-depleted rat basal ganglia is not normalized by L-DOPA treatment. *J. Neurochem.* **104**, 1622–1636 (2008).
16. C. Guigoni, E. Doudnikoff, Q. Li, B. Bloch, E. Bezard, Altered D1 dopamine receptor trafficking in parkinsonian and dyskinetic non-human primates. *Neurobiol. Dis.* **26**, 452–463 (2007).
17. J. L. Arriza, T. M. Dawson, R. B. Simerly, L. J. Martin, M. G. Caron, S. H. Snyder, R. J. Lefkowitz, The G-protein-coupled receptor kinases β ARK1 and β ARK2 are widely distributed at synapses in rat brain. *J. Neurosci.* **12**, 4045–4055 (1992).
18. E. V. Gurevich, J. L. Benovic, V. V. Gurevich, Arrestin2 expression selectively increases during neural differentiation. *J. Neurochem.* **91**, 1404–1416 (2004).
19. E. R. Bychkov, V. V. Gurevich, J. N. Joyce, J. L. Benovic, E. V. Gurevich, Arrestins and two receptor kinases are upregulated in Parkinson's disease with dementia. *Neurobiol. Aging* **29**, 379–396 (2008).
20. D. Firsov, J.-M. Elalouf, Molecular cloning of two rat GRK6 splice variants. *Am. J. Physiol.* **273**, C953–C961 (1997).
21. A. A. Fienberg, N. Hiroi, P. G. Mermelstein, W. Song, G. L. Snyder, A. Nishi, A. Cheramy, J. P. O'Callaghan, D. B. Miller, D. G. Cole, R. Corbett, C. N. Haile, D. C. Cooper, S. P. Onn, A. A. Grace, C. C. Ouimet, F. J. White, S. E. Hyman, D. J. Surmeier, J. Girault, E. J. Nestler, P. Greengard, DARPP-32: Regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. *Science* **281**, 838–842 (1998).
22. R. Bordet, S. Ridray, S. Carboni, J. Diaz, P. Sokoloff, J. C. Schwartz, Induction of dopamine D3 receptor expression as a mechanism of behavioral sensitization to levodopa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 3363–3367 (1997).
23. M. A. Cenci, C. S. Lee, A. Björklund, 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 (1998).
24. M. Lundblad, M. Andersson, C. Winkler, D. Kirik, N. Wierup, M. A. Cenci, Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* **15**, 120–132 (2002).

25. A. Berthet, G. Porras, E. Doudnikoff, H. Stark, M. Cadot, E. Bezard, B. Bloch, Pharmacological analysis demonstrates dramatic alteration of D₁ dopamine receptor neuronal distribution in the rat analog of L-DOPA-induced dyskinesia. *J. Neurosci.* **29**, 4829–4835 (2009).
26. C. R. Gerfen, S. Miyachi, R. Paletzki, P. Brown, 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 (2002).
27. C. Le Moine, B. Bloch, 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 (1995).
28. M. Morissette, R. Grondin, M. Goulet, P. J. Bédard, T. Di Paolo, Differential regulation of striatal preproenkephalin and preprotachykinin mRNA levels in MPTP-lesioned monkeys chronically treated with dopamine D1 or D2 receptor agonists. *J. Neurochem.* **72**, 682–692 (1999).
29. E. Bezard, J. M. Brotchie, C. E. Gross, Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesias: Potential for new therapies. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 577–588 (2001).
30. I. Aubert, C. Guigoni, Q. Li, S. Dovero, B. H. Bioulac, C. E. Gross, A. R. Crossman, B. Bloch, E. Bezard, Enhanced preproenkephalin-B-derived opioid transmission in striatum and subthalamic nucleus converges upon globus pallidus internalis in L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia. *Biol. Psychiatry* **61**, 836–844 (2007).
31. C. Guigoni, I. Aubert, Q. Li, V. V. Gurevich, J. L. Benovic, S. Ferry, U. Mach, H. Stark, L. Leriche, K. Häkansson, B. H. Bioulac, C. E. Gross, P. Sokoloff, G. Fisone, E. V. Gurevich, B. Bloch, E. Bezard, Pathogenesis of levodopa-induced dyskinesia: Focus on D1 and D3 dopamine receptors. *Parkinsonism Relat. Disord.* **11** (Suppl. 1), S25–S29 (2005).
32. S. Hollinger, J. R. Hepler, Cellular regulation of RGS proteins: Modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol. Rev.* **54**, 527–559 (2002).
33. C. A. Moore, S. K. Milano, J. L. Benovic, Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu. Rev. Physiol.* **69**, 451–482 (2007).
34. K. M. Kim, K. J. Valenzano, S. R. Robinson, W. D. Yao, L. S. Barak, M. G. Caron, Differential regulation of the dopamine D₂ and D₃ receptors by G protein-coupled receptor kinases and β-arrestins. *J. Biol. Chem.* **276**, 37409–37414 (2001).
35. M. Tiberi, S. R. Nash, L. Bertrand, R. J. Lefkowitz, M. G. Caron, Differential regulation of dopamine D1A receptor responsiveness by various G protein-coupled receptor kinases. *J. Biol. Chem.* **271**, 3771–3778 (1996).
36. T. Boraud, E. Bezard, B. Bioulac, C. E. Gross, Dopamine agonist-induced dyskinesias are correlated to both firing pattern and frequency alterations of pallidal neurones in the MPTP-treated monkey. *Brain* **124**, 546–557 (2001).
37. E. Bezard, S. Dovero, C. Prunier, P. Ravenscroft, S. Chalon, D. Guilloteau, A. R. Crossman, B. Bioulac, J. M. Brotchie, C. E. Gross, Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* **21**, 6853–6861 (2001).
38. E. Bezard, T. Boraud, S. Chalon, J. M. Brotchie, D. Guilloteau, C. E. Gross, Pallidal border cells: An anatomical and electrophysiological study in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated monkey. *Neuroscience* **103**, 117–123 (2001).
39. **Acknowledgments:** We thank R. Baishen, J. Li, and H. Li for excellent technical assistance; J.-M. Elalouf and J. L. Benovic for rat and human GRK6 cDNAs; D. Levesque and S. Sabol (NIH, Bethesda, MD) for prodynorphin and preproenkephalin RNA probes; and J. L. Benovic for purified human GRK6 protein. **Funding:** Agence Nationale de la Recherche, France (E. Bezard); Biothèque Primate—Centre National de la Recherche Scientifique Life Sciences Department (E. Bezard); NIH grants EY011500 (V.V.G.), NS45117 and NS065868 (E.V.G.), and GM077561 and GM081756 (V.V.G.); and Michael J. Fox Foundation for Parkinson Research (E. Bezard and E.V.G.). **Author contributions:** E. Bezard and E.V.G. designed and organized the experiments; E.V.G., V.V.G., M.R.A., Y.T.C., and S.K. designed, cloned, and produced viral vectors and viruses; E.V.G., M.R.A., Y.T.C., E. Bychkov, S.K., A.B., and G.P. performed rat behavioral, neurochemical, and histological experiments; E. Bezard, A.B., G.P., Q.L., B.H.B., B.B., I.A., S.D., and E.D. performed monkey behavioral, neurochemical, and histological experiments; E. Bezard and E.V.G. analyzed the data; E. Bezard, V.V.G., and E.V.G. wrote the paper. **Competing interests:** The authors have declared no competing interests.

Submitted 23 November 2009

Accepted 2 April 2010

Published 21 April 2010

10.1126/scitranslmed.3000664

Citation: M. R. Ahmed, A. Berthet, E. Bychkov, G. Porras, Q. Li, B. H. Bioulac, Y. T. Carl, B. Bloch, S. Kook, I. Aubert, S. Dovero, E. Doudnikoff, V. V. Gurevich, E. V. Gurevich, E. Bezard, Lentiviral overexpression of GRK6 alleviates L-dopa-induced dyskinesia in experimental Parkinson's disease. *Sci. Transl. Med.* **2**, 28ra28 (2010).

Supplementary Materials for

Lentiviral Overexpression of GRK6 Alleviates L-Dopa–Induced Dyskinesia in Experimental Parkinson’s Disease

Mohamed R. Ahmed, Amandine Berthet, Evgeny Bychkov, Gregory Porras, Qin Li, Bernard H. Bioulac, Yonatan T. Carl, Bertrand Bloch, Seunghyi Kook, Incarnation Aubert, Sandra Dovero, Evelyne Doudnikoff, Vsevolod V. Gurevich, Eugenia V. Gurevich,* Erwan Bezard*

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: Eugenia.Gurevich@vanderbilt.edu (E.V.G.); Erwan.bezard@u-bordeaux2.fr (E.B.)

Published 21 April 2010, *Sci. Transl. Med.* **2**, 28ra28 (2010)
DOI: 10.1126/scitranslmed.3000664

This PDF file includes:

Materials and Methods

Fig. S1. The GFP-tagged GRK6 is functional and has the subcellular localization of the endogenous GRK6.

Fig. S2. Antibodies to GRK6 selectively recognize GRK6A or GRK6B splicing variants.

Fig. S3. The lentivirus carrying two chained miRNAs targets both GRK6A and GRK6B splice variants.

Fig. S4. Infection of the rat striatum with the miRNA lentivirus induces the GRK6 knockdown.

References

SUPPLEMENTARY MATERIAL

MATERIALS AND METHODS

Virus construction and preparation.

The viruses encoding rat or human GRK6-GFP or GFP (control) were prepared using ViraPower system (Invitrogen) as described by the manufacturer. The miRNA oligonucleotide sequences targeting all splice variants of rat GRK6 selected with Invitrogen's Block-iT RNAi Designer software were tested for the knockdown efficacy in cultured cells, and two most effective oligonucleotides were chained in pLenti6.4/R4R2/V5-DEST lentiviral vector (Fig. S4A), which is a component of the Block-iT HiPerform Lentiviral Pol II RNAi expression system (Invitrogen). The nonsense control oligonucleotide was used as control. MiRNAs are expressed under the control of elongation factor 1 α promoter (EF1 α). Both control and GRK6 miRNA vectors contained co-cistronically expressed GFP to facilitate detection of infected cells. To produce the viruses, the vectors were transfected into FT-HEK293 cells (Invitrogen,) using Lipofectamine2000. The virus-containing supernatant was collected 72 h after transfection and filtered through Millex-HV 0.45 μ m filters (Millipore). The viruses were purified and concentrated ~1000-fold by sequential centrifugation twice at 90,000 g.

RAT EXPERIMENTS

Rat surgery and virus injection

For the dopaminergic lesion and virus injection, rats were deeply anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg i.p.) and mounted on a stereotactic apparatus. Rats were treated with desimipramine (25 mg/kg i.p.) 30 min. prior to infusion of 6-hydroxydopamine (6-OHDA). 6-OHDA (8 μ g in 4 μ l of 0.05% ascorbic acid) was infused unilaterally into the medial forebrain bundle at coordinates A=-4.3 mm, L=1.2 mm, H = -8.5 mm. At the time of the 6-OHDA lesion,

the rats received the virus injections (5 μ l of the concentrated virus in saline per striatum 0.3 μ l/min) at coordinates AP 0.2; ML 3.5; DV 5.7. Alternatively, in pre-sensitization experiments, guide steel cannulae were implanted at coordinates AP 0.2; ML 3.5; DV 5.7 and fixed to the scull by dental cement and two small screws. After the pre-injection behavioral testing, the rats were anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg i.p.), mounted on a stereotactic surgery, and viruses were injected into the lesioned striata via the guide cannulae.

Rat behavior

Three weeks after the 6-OHDA lesion, the animals were tested for rotational response to apomorphine (0.05 mg/kg s.c.) in a Plexiglas cylinder 30 cm in diameter for 1 h using an automated rotometer (AccuScan Instruments). Both ipsilateral and contralateral 360° turns were recorded, and the net rotational asymmetry (contralateral minus ipsilateral turns) was calculated. The animals were then treated with L-DOPA (L-3,4-Dihydroxyphenylalanine methyl ester hydrochloride, 25 mg/kg i.p. twice daily) for 10 days. For the receptor binding/*in situ* hybridization experiment, an additional group of rats was treated with saline for 10 days. The rats were tested for rotations for 1 h every other day after the morning injections, starting 15 min after the drug injection. In the first experiment, rats were injected with the viruses simultaneously with the 6-OHDA lesion and tested for rotations 3 weeks later. In the second set of experiments, the rats were first treated with L-DOPA for 5 days with daily testing for rotations. The virus was injected on day 6, and the rats were allowed to recover for 5 days before resuming the injection schedule, and then tested for rotations for 7 days. In the experiments with AIMs, rats were treated with increasing doses of L-DOPA (2-10 mg/kg day) for 15 days, starting 3 weeks after the 6-OHDA lesion. The dose regimen was adjusted for each individual animal until substantial AIMs scores were achieved. The virus injection via implanted guide cannulae was performed on

day 14, and the rats were allowed to recover for 5 days before resuming the testing for 18 more days. During the post-virus injection testing, the rats received the highest L-DOPA dose that had been used during pre-testing daily and were assessed for AIMs on a 0-4 AIM rating scale (*SI*) on every third day. AIMs of four categories were scored (limb, axial, orolingual, and rotations) for 1 min every 20 min for 2 h (total 6 observations; maximal score for each observation 16, maximal total score per session 96).

Tissue preparation

Upon completion of the drug administration and behavioral testing, the rats were decapitated under pentobarbital anesthesia, and their brains were collected and rapidly frozen on dry ice. The midbrain containing the substantia nigra was dissected and post-fixed in 4% paraformaldehyde for TH immunohistochemistry to determine the loss of dopaminergic neurons. The position of the virus injection track was identified, and 15 μm -thick sections just rostral of the track were collected on Probe-On Plus slides for receptor binding and *in situ* hybridization histochemistry. The sections for receptor binding were kept fresh-frozen at -70°C until needed. The sections intended for *in situ* hybridization were post-fixed in 4% paraformaldehyde for 1 h at 4°C, washed, dehydrated, and stored at -70°C until needed. The tissue around and caudal to the injection track was collected for Western blot to determine the GRK6 transgene expression and TH concentration. Randomly selected animals were overdosed with pentobarbital and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde. The brains were removed, post-fixed in 4% paraformaldehyde, cryoprotected, and frozen, to be used for determination of injected cells by immunohistochemistry.

For D1, D2 and mGluR5 immunohistochemistry experiments, the rats were deeply anesthetized with sodium chloral hydrate (150 mg/kg) 1h after L-DOPA injection and perfused

transcardiacally with 50–100 ml of 0.9% NaCl followed by 250 ml of fixative consisting of 2% (S2, 3) paraformaldehyde (PFA) with 0.2% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. The brains were quickly removed and left overnight in 2% PFA at 4°C. Brains were cut into 60µm frontal sections with vibratome (Leica, VT1000S). Striatal sections were collected in PBS (0.01 M phosphate, pH 7.4). To enhance the penetration of the immunoreagents in the preembedding procedures, the sections were equilibrated in a cryoprotectant solution (0.05 M PB, pH 7.4, containing 25% sucrose and 10% glycerol), freeze-thawed by freezing in isopentane cooled to -45°C in a Snap Frost 80 Specimen Freezing System, thawed in PBS, and stored in PBS with 0.03% sodium azide until needed.

Receptor binding and *in situ* hybridization,

The D3 receptor binding was performed with [¹²⁵I] 7-hydroxy-PIPAT (Perkin Elmer) as a radioligand as described (S3). Non-specific binding was determined using 7-hydroxy-DPAT (10 µM). Four sections were used for total and three for non-specific binding. The labeled sections were exposed to Kodak Biomax MR film for 36 h. *In situ* hybridization was performed as described (S3). For *in situ* hybridization, the ³³P-labeled antisense mRNA probes corresponding to 348-604 nucleotides of rat prodynorphin and to 318-735 nucleotides of rat preproenkephalin were synthesized in *in vitro* transcription reactions using the appropriate DNA templates (the prodynorphin cDNA was a gift from D. Levesque, and the preproenkephalin cDNA was kindly provided by S. Sabol). Sections hybridized with sense riboprobes were used as controls for hybridization specificity and gave negligible hybridization signal. Four sections per animal were used for the antisense and two for the sense hybridization. The sections were exposed to Kodak Biomax MR for 6 days for dynorphin and 2 days for enkephalin.

Immunohistochemistry and Western blot. The lesion quality was determined by TH

immunohistochemistry and Western blot for TH. The midbrain sections containing the substantia nigra were stained with rabbit anti-TH antibody (Chemicon) at 1:1000 dilution (overnight at 4°C) followed by ABC amplification system (Vector Laboratories) with DAB chromogen. The expression of the GRK6 transgene in the rat striatum was determined by immunohistochemistry and Western blot with mouse anti-GFP antibody (Clontech). For immunohistochemistry, the sections were incubated with the primary antibody (1:500 dilution) overnight at 4°C followed by goat anti-rabbit biotinylated secondary antibody and streptavidin conjugated with Alexa Fluor 488 (Molecular Probes). For double labeling with DARPP-32, the sections were labeled with mouse anti-GFP antibody and rabbit anti-DARPP-32 antibody and detected by biotinylated secondary antibody/streptavidin-Alexa Fluor 488 (GFP; green) and anti-rabbit-Alexa Fluor 568 (DARPP-32; red). Western blot for GRK6-GFP was performed with mouse anti-GFP antibody (Clontech) at 1:2,000 dilution. To quantify the GRK6 overexpression in comparison with the endogenous level, the GRK6 concentration was measured by Western blot using rabbit polyclonal anti-GRK6 antibody directed against the C-terminus of human GRK6 (sc-566; Santa Cruz Biotechnology) at 1:500 dilution and with mouse monoclonal antibody (sc-100380; Santa Cruz Biotechnology) directed against full-length recombinant human GRK6.

Immunohistochemical detection of D1, D2 and mGluR5 receptors.

The D1 receptor was detected by immunochemistry with a monoclonal antibody raised in the rat against a 97 amino acid sequence corresponding to the C-terminus of the human D1 receptor (Sigma) (S4). D2R was detected with an affinity-purified rabbit polyclonal antiserum directed against a 28 amino acid sequence within the third cytoplasmic loop from the human D2 receptor corresponding to anti D2-284 peptide (Millipore) that recognizes both short and long isoforms of D2R (S5). mGluR5 receptor was detected with a rabbit polyclonal antibody (Chemicon

International) (S6). Tissue sections of striatum were treated by immunoperoxidase technique using the avidin-biotin complex revealed by the glucose oxidase-DAB-nickel method (S7). The sections of striatum were incubated in 4% normal goat serum (NGS) or in normal donkey serum (NDS) in PBS for 1h at room temperature (RT) and then in the antibodies against D1 (1:1000) or D2 (1:500) or mGluR5 receptors (1:100) supplemented with 1% NGS or NDS overnight at RT. After washing (3 x 10min) in PBS, the sections were incubated in goat anti-rat IgG or donkey anti-rabbit coupled to biotin (Amersham; 1:200 in PBS for 1h30). After three rinses (3 x 10min) in PBS, the sections were then incubated in avidin-biotin complex (Vector ABC Elite, Vector Laboratories) (1:200) in PBS for 1h30 at RT and again rinsed (3 x 10 min) in PBS. The immunoreactive sites were revealed by a combination of the glucose oxidase-diaminobenzidine (DAB; Sigma, 0.05% in TB) method and the DAB-nickel method (S7). The reaction was stopped by several washes in H₂O. The sections were mounted on glass slides, dehydrated, and mounted in Eukitt (Electron Microscopy Sciences). Negative immunohistological control demonstrated the absence of signal when omitting the first antibody.

Data Analysis

For Western blots and autoradiograms, the gray values of the bands were measured on X-ray film with a Versadoc imaging system (Bio-Rad). StatView software (SAS Institute) was used for the statistical analysis. The rotation data were analyzed by two-way repeated measure ANOVA with Group (GFP versus GRK6) as a between group and Session as a repeated measure factor. If the significant effect of Group was observed, the data for individual sessions were compared by unpaired Student's test. The AIMs scores were compared for each session with the Mann-Whitney non-parametric test. The value of p<0.05 was considered significant.

MONKEY EXPERIMENTS

Housing

We used 12 female rhesus monkeys (*Macaca mulatta*, Xierxin, China). Tissue from 18 additional animals were used for post-mortem experiments when needed (TH immunohistochemistry, DA transporter binding, *in situ* hybridization). Those animals had been used in former studies and prepared as the present 12 animals (S10, S14). Animals were housed in individual primate cages (dimensions - 1.1m x 0.8m x 1m) under controlled conditions of humidity, temperature, and light (12-h light/12-h dark cycle, lights on at 8.00 am); food and water were available ad libitum.

Experimental parkinsonism and dyskinesia

All 12 monkeys received once daily i.v. injections of 1-methyl-4-phenyl 1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) hydrochloride (0.2 mg/kg) until they displayed parkinsonian symptoms (mean number of injections = 15±1). It took an average of 8 wk for the bilateral parkinsonian syndrome to stabilize (i.e., constant disability score over 2 consecutive wk). All 12 MPTP-treated monkeys were then treated chronically with twice-daily administration of Modopar (p.o.; Roche, L-dopa/carbipoda, ratio 4:1) for 6 months at a tailored dose designed to fully reverse the parkinsonian features and developed dyskinesia.

Stereotaxic surgery

The 12 MPTP/dyskinetic monkeys were used to assess whether viral-mediated GRK6 expression in the motor striatum could attenuate LID. The standard Horsley-Clarke stereotactic technique has been improved by using sagittal and frontal ventriculography to locate with accuracy the borders of the third ventricles and the edges of the anterior and posterior commissurae. Intracerebral injection of either LV-GRK6-GFP (n=6) or LV-GFP (n=6) was then

performed with a 25 µl Hamilton syringe mounted into a Unimecanique microinjector system at four rostro-caudal levels (10 µl at each level) from the anterior commissure (AC; AC0 mm) to 5 mm caudal to AC (AC-5 mm) 1.5 mm apart, 1 mm above the virtual horizontal line passing through the AC and posterior commissural. After each injection, the syringe was left in place for 5 min to prevent leakage of the vector along the needle track. The Hamilton syringe was refilled between each track. The total injected volume per hemisphere was 40 µl. Monkeys recovered from surgery for 6 weeks before the behavioural experiments began.

Behavioral experiments

Monkeys' response to their tailored dose of L-dopa/carbidopa (ranging between 15-20 mg/kg for maximal reversal of PD symptoms) was defined prior to LV intracerebral injections. Starting at 8 weeks post-surgery, animals were assayed 2 days apart for behavioral responses to 100% of the tailored dose of L-dopa (p.o.), 50% of the tailored dose of L-dopa (p.o.), the D1 agonist SKF 38393 (s.c. 2.0 mg/kg) (S8) and the D2/D3 agonist ropinirole (s.c. 0.6 mg/kg)(S9). The monkeys' behavior was first recorded in the OFF state for 60 min in an observation cage (dimensions - 1.1m x 1.5m x 1.1m). Drugs were then administered, and the monkeys' behavior was recorded for a further 180 min in the observation cage. The total duration of observation was 250 min including drug administration.

The parkinsonian condition (and its reversal) was assessed on a parkinsonian monkey rating scale using videotape recordings of monkeys. A score of 0 corresponds to a normal animal and a score above 6 to a parkinsonian animal. The severity of dyskinesia was rated using the Dyskinesia Disability Scale: 0, dyskinesia absent; 1, mild, fleeting, and rare dyskinetic postures and movements; 2, moderate, more prominent abnormal movements, but not interfering significantly with normal behavior; 3, marked, frequent and, at times, continuous dyskinesia

intruding on the normal repertoire of activity; or, 4, severe, virtually continuous dyskinetic activity replacing normal behavior and disabling to the animal. Locomotor activity was concomitantly monitored with infrared activity monitors, providing a mobility count every 5 min.

Post-mortem processing

The monkeys were killed by sodium pentobarbital overdose (150 mg/kg, i.v.) 1 h after the last vehicle or L-dopa/carbidopa dose. The brains were removed quickly, and the two hemispheres were separated, immediately frozen by immersion in isopentane, and then stored at -80°C. Cryostat-cut 300 μ m and 20 μ m-thick sections were then prepared for each hemisphere. 300 μ m-thick sections were taken at AC+3mm and AC0mm, i.e. at levels corresponding to non-motor, non-injected striatum and to the first track of LV injection, respectively. Between those two levels (with at least 5 sections discarded) and everywhere else, 20 μ m-thick sections were collected and used for binding, *in situ* hybridization, and immunohistochemical procedures.

Extent of lesion. The lesion quality was determined by TH immunohistochemistry and DA transporter binding in the striatum. For TH immunohistochemistry, 20 μ m-thick striatal sections were post-fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer saline (PBS), incubated with 3% NDS and 0.1% triton x100 in PBS for 1 hour and then stained with rabbit anti-TH antibody (Chemicon) at 1:1000 dilution (overnight at 4°C) followed by ABC amplification system (Vector Laboratories) with DAB chromogen (S11). DA transporter binding using [¹²⁵I]-(E)-N-(3-iodoprop-2-enyl)-2 β -carboxymethyl-3 β -(4'-methylphenyl)-nortropane (PE2I; Chelatec, France) was measured as previously described (S9-13). The slides were then exposed to Biomax film (Kodak) with an autoradiographic microscale standard (Amersham).

In situ hybridization. The *in situ* hybridization procedure was performed as described (S9-14)

with probes designed to recognize the human preproenkephalin-B. [^{35}S]–labelled antisense and sense cRNA probes were prepared by in vitro transcription. After alkaline hydrolysis to obtain 0.25 Kb cRNA fragments, the probes were purified on G50-Sephadex and precipitated in sodium acetate (0.1 vol)/absolute ethanol (2.5 vol). The sections were hybridized as described (S10, 14). The slides were then exposed to Biomax film with an autoradiographic microscale standard (Amersham).

Image analysis. Densitometric analysis of TH immunohistochemistry and autoradiographs (*in situ* hybridization and binding) was performed using an image analysis system (Mercator, Explora Nova). Three sections per striatal level per animal (i.e. 9 sections per marker) were analysed by an examiner blind with regard to the experimental condition. Optical densities were averaged for each region in each animal and converted to percentage of control signal (TH; mean \pm S.E.M) or amount of radioactivity bound by comparison to the autoradiographic standards (*in situ* hybridization and binding; mean \pm S.E.M).

Post-hoc verification of infection sites by immunoperoxidase detection of GFP. 20 μm -thick sections were post-fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer saline (PBS) for 10 minutes. After 3 washes in PBS, the tissue slices were incubated with 3% NDS and 0.1% triton x100 in PBS for 1 hour. The fixed slices were then incubated with a rabbit anti-GFP primary antibody (1:500) supplemented with 1% NDS and 0.1% triton x100 in PBS overnight at RT in a damp chamber. The sections were then washed [3x PBS/Tween 0.05%] and incubated in goat anti-rabbit IgG coupled to biotin (Amersham; 1:200 in PBS for 2h) supplemented with 1% NGS. After washing [3x PBS/Tween], the sections were incubated in Streptavidin–horseradish peroxidase (Strept-HRP) (1:100 in PBS for 30 min), then in Biotinyl Tyramide (1:50 in amplification diluent for 7 min), and again in Strept-HRP (1:100 in PBS for 30 min). After

washing [2x PBS/Tween, 1x Tris buffer (TB) 0.05 M, pH 7.6], the immunoreactive sites were revealed by incubation in 3,3-diaminobenzidine (DAB; Sigma, 0.05% in TB) in the presence of H₂O₂ (0.01%). The reaction was stopped by several washes in TB. The sections were mounted on glass slides, dehydrated, and mounted in Eukitt. Negative immunohistological control demonstrated the absence of signal when omitting the first antibody.

Post-hoc verification of transfection magnitude by Western blot analysis. For Western blot analysis, the monkey putamen tissue was scraped into Lysis solution (Ambion). The protein concentration was determined by Bradford method (Bio-Rad). The protein was precipitated with methanol and dissolved in SDS buffer at 0.5 mg total protein/ml as described (S13).. The expression of GFP (control) and GRK6-GFP was analyzed with mouse monoclonal anti-GFP antibody (Clontech) at 1:2,000 dilution. Recombinant GFP and GRK6-GFP were used as standards to determine the positions of the appropriate bands on the blot (Fig. S2E).

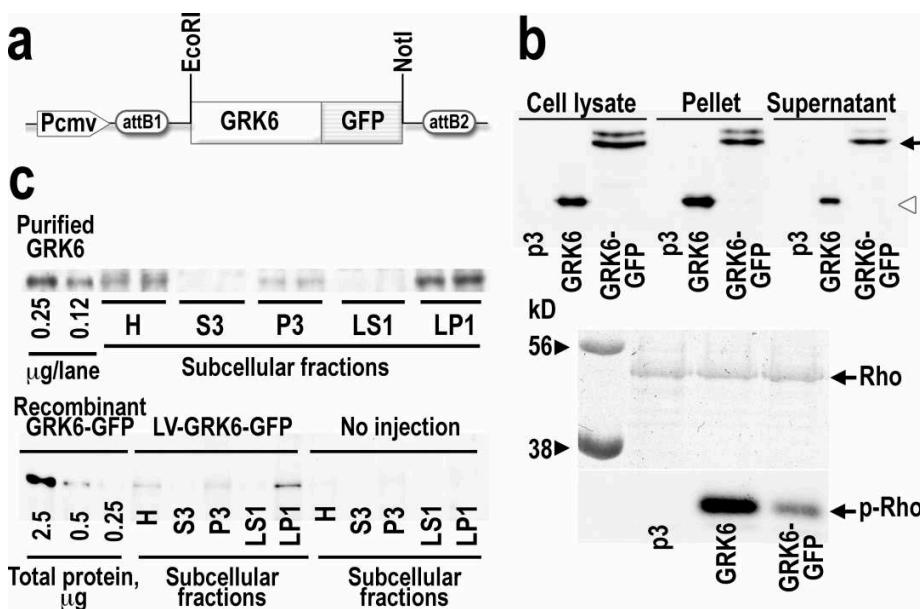


Fig. S1. The GFP-tagged GRK6 is functional and has the subcellular localization of the endogenous GRK6. (A) Rat and human wild type GRK6A proteins were tagged at the C-terminus with GFP by removing the stop codon via PCR and subcloning the resulting fragments into the pEGFP-N1 vector (Clontech, Mountain View, CA). The GRK6A-GFP sequences were transferred into the pENTR1A vector using EcoR1-NotI sites, and finally into the pLenti6/V5-DEST vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) via *attL*-*attR* recombination. The resulting Lentivirus-GRK6A-GFP clone was used to transfect cells for virus production. (B) GRK6A tagged with GFP at the C-terminus is functional. The kinase activity of wild type rat GRK6A and GRK6A-GFP was compared *in vitro* using purified rhodopsin as a substrate. HEK293 cells were transiently transfected with pcDNA3, GRK6A, or GRK6A-GFP. Cells were lysed 48 h post-transfection in a hypotonic buffer (100 mM Tris-HCl, 2 mM EGTA, 2 mM EGTA, 2 mM benzamidine, 0.5 mM PMSF), and the lysates were centrifuged in a microcentrifuge at maximum speed for 30 min. The supernatant was used as a source of GRK6A and GRK6A-GFP. The upper panel shows comparative expression of GRK6A and GRK6A-GFP and distribution of both

kinases between the pellet and supernatant in HEK293 cells as determined by Western blot. Equal amounts of protein (1.25 mg/lane) from the whole cell lysate, pellet, and supernatant were loaded on 10% polyacrylamide gel and blotted with rabbit anti-GRK6 antibody (sc-566; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) at 1:1000 dilution. The lower panel shows the level of rhodopsin in vitro phosphorylation by rat GRK6A and GRK6A-GFP. The in vitro phosphorylation was performed with 100 ng/sample of purified rhodopsin, [γ -³²P]ATP, and an equal amount of the supernatants. Rhodopsin was added in the dark, and the reaction mixture was exposed to light at 30°C for 10 min. The rhodopsin was pelleted through 0.2M sucrose at 28,000g for 20 min. The pellet was dissolved in SDS sample buffer and resolved on 10% polyacrylamide gel. The gel was stained with Coomassie blue to visualize rhodopsin (upper panel), dried, and exposed to X-ray film (lower panel). (C) The exogenous GRK6A-GFP has the same subcellular distribution as endogenous GRK6A. The upper panel shows the enrichment of endogenous rat GRK6A, as compared to homogenate (H), in the synaptic membrane fraction (LP1) and some presence in the light membrane fraction (P3), whereas the cytosol (S3) and crude synaptic vesicle fractions (LS1) contain little or no GRK6. Purified human GRK6A serves as the standard. The data obtained from two rats are shown. To examine the subcellular distribution of the lentivirally induced GRK6A-GFP, rats were injected with LV-GRK6A-GFP, and the striata were collected, combined, and subjected to subcellular fractionations as described previously (S2). Lower panel shows that the subcellular targeting of the exogenous GRK6A-GFP mirrors that of endogenous wild type GRK6A. Recombinant rat GRK6A-GFP expressed in HEK293 cells served as the standard.

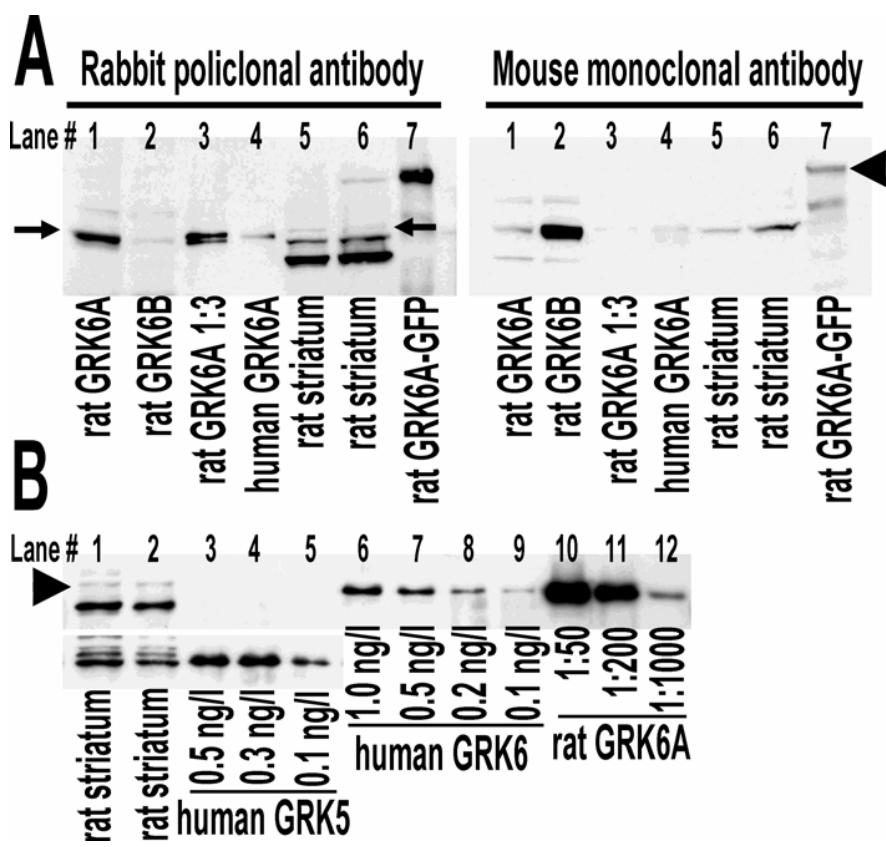


Fig. S2. Antibodies to GRK6 selectively recognize GRK6A or GRK6B splicing variants.

(A) To determine the specificity of anti-GRK6 antibodies, several samples of recombinant proteins and rat striatum were examined by Western blot. Left panel shows samples detected with the rabbit polyclonal anti-GRK6 antibody directed against the C-terminal region of the human GRK6 protein (catalog #sc-566; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) at 1:1000 dilution. Right panel shows the same samples detected with mouse monoclonal anti-GRK6 antibody directed against the full-length human recombinant GRK6 (catalog #sc-100380; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) at 1:500 dilution. Rat GRK6A and GRK6B are recombinant proteins produced by transfecting HEK293 cells with rat GRK6A and GRK6B clones (in pcDNA3 vector). Cell lysates were collected, and 5 µg of total protein were loaded on the gel (lane 3 on each gel – 1.67 µg of total protein of GRK6A-transfected cells). Lane 4 on

each gel shows the purified recombinant human GRK6A protein (1.6 ng/lane). Lanes 5 and 6 show the samples of the rat striatum: lane 5 – intact uninfected striatum and lane 6 – lesioned striatum infected with the GRK6A-GFP lentivirus. Lane 7 shows the recombinant rat GRK6A-GFP produced by transfecting HEK293 cells (5 µg of total protein loaded per lane). Small arrows indicate the bands corresponding to GRK6A; arrowhead – GRK6A-GFP. Note much higher sensitivity of the rabbit antibody to the GRK6A variant and the mouse antibody to GRK6B (compare lanes 1&3 to lane 2 on both gels). Since the GFP-tagged GRK6 we used for infection is the GRK6A variant, the mouse antibody does not detect transgenic GRK6A-GFP in the mouse striatum (lane 6) and shows significantly lower signal with recombinant GRK6A-GFP (lane 7). Thick bands in the rat samples are nonspecific. Note that no conclusion as to the relative abundance of GRK6A and GRK6B splice variant can be made based on these data, since we do not have purified GRK6B standard of known concentration. (B) We have previously demonstrated using pan-GRK4 family antibody that GRK5 runs lower than GRK6 (S13). We tested whether anti-GRK6 antibodies recognize related GRK5 protein using recombinant purified GRK5 and GRK6. The upper blot was developed with rabbit anti-GRK6 antibody (Santa Cruz, cat. # sc-566), and the lower blot – with anti-GRK5 antibody (Santa Cruz, cat. # sc-565). Human GRK6A and GRK5 are purified proteins. Rat GRK6A is the lysate (at various dilutions) of HEK cells transfected with rat GRK6A. Left two lanes – samples for the rat striatum. Note that anti-GRK6 antibody does not recognize GRK5.

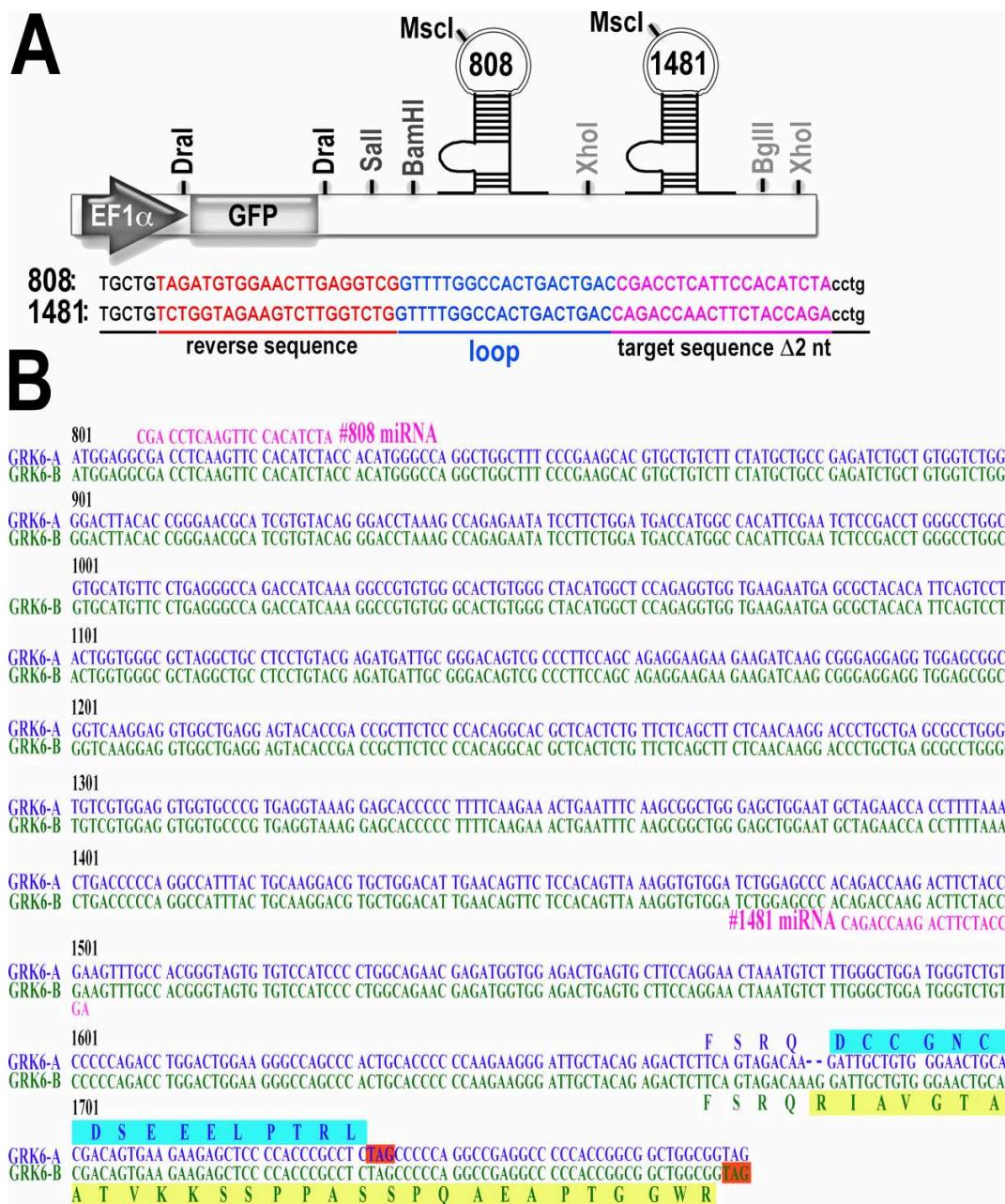


Fig. S3. The lentivirus carrying two chained miRNAs targets both GRK6A and GRK6B

splice variants. (A) Potential miRNA sequences were chosen using Block-iT RNAi Designer software (Invitrogen). The double-stranded oligonucleotides were subcloned into pcDNA6.2-GW/EGFP-miR mammalian expression clone, which is a part of Block-iT HiPerform Lentiviral Pol II RNAi expression system (Invitrogen). The pcDNA clones were used to transfect rat

fibroblast Rat1 and rat pheochromacytoma PC12 cells to test for knockdown of endogenous GRK6. We also used HEK293 cells expressing lentivirally transferred rat GRK6 for testing. Several oligonucleotide sequences were tested, and the two most active (#815 and #1489) were chained using BamHI-BglIII restriction sites. The miRNA-GFP construct was transferred into pLenti6.4/R4R2/V5-DEST vector in a double recombination reaction. The resulting Lenti-GRK6 miRNA-GFP clone was used to transfect cells for the virus production as described in Methods.

(B) The regions of the GRK6A and GRK6B sequences targeted by miRNAs. The GRK6A splice variant misses 2 nucleotides after 1678 (due to missed exon 17) as compared to GRK6B, resulting in the frame shift and yielding a protein 13 amino acids shorter than GRK6B. MiRNA sequences (shown in pink) are directed against regions common to both splice variants. The C-tail amino acid sequences for GRK6A (in blue) and 6B (in green) are indicated. Red highlighting marks stop codons. Numbers on the left are the nucleotide numbers in cDNA starting from the start codon.

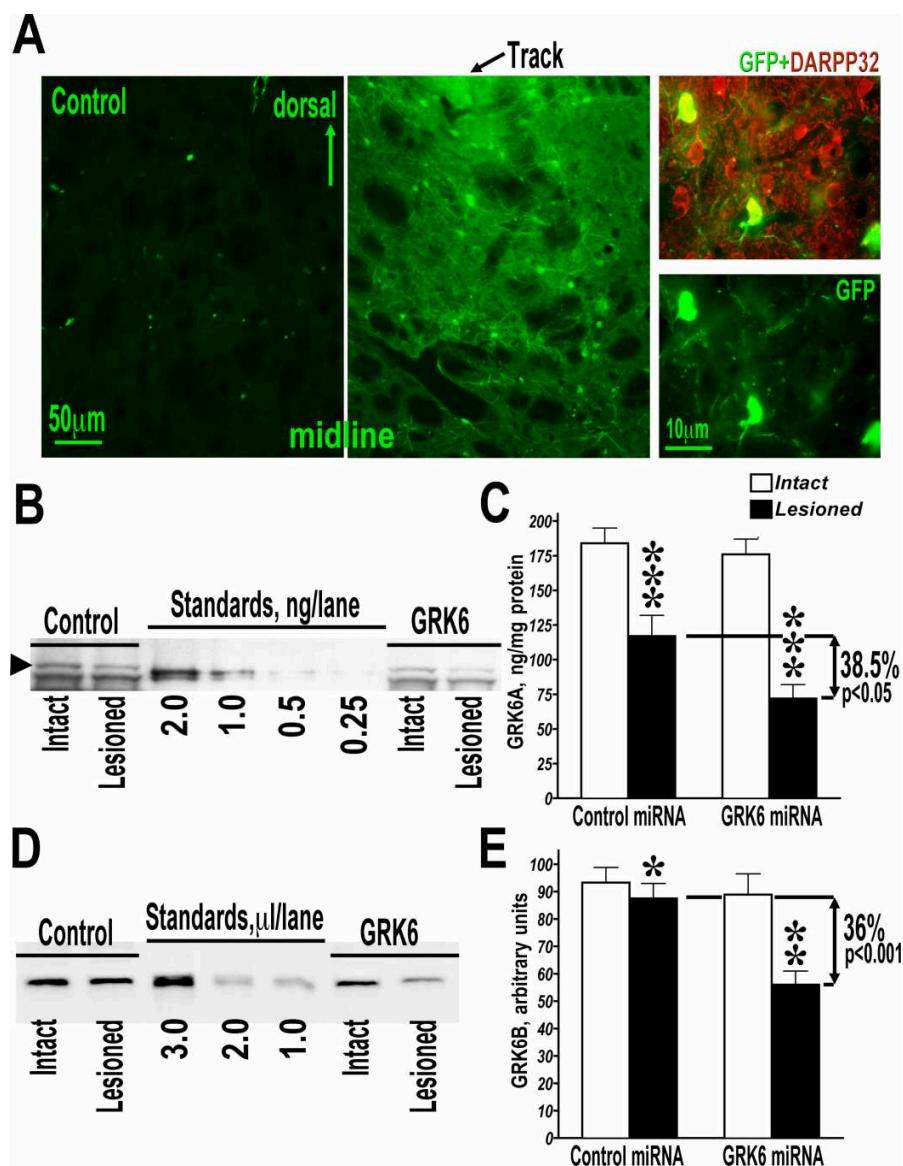


Fig. S4. Infection of the rat striatum with the miRNA lentivirus induces the GRK6 knockdown. (A) Representative low magnification photomicrograph of the rat intact control striatum (left panel) and the striatum infected with the GRK6-GFP lentivirus (middle panel). GFP is expressed co-cistronically with GRK6 miRNA in medium spiny striatal neurons as demonstrated by double staining for GFP and DARPP-32 (left panel) as described in Methods. (B) Detection of the GRK6A expression by Western blot in the lesioned hemisphere infected

with the GRK6 miRNA (GRK6) or control miRNA (Control) virus in comparison with the intact (uninfected) hemisphere. Four middle lanes are different dilutions of purified recombinant human GRK6A used as standards. The arrowhead points to the GRK6A band. **(C)** Quantification of the Western blot data for the expression of GRK6A in the intact and lesioned hemisphere. The expression of endogenous GRK6A and in the intact and lesioned (infected) hemisphere was compared by paired t-test: *** - p<0.001 to the intact striatum. The expression of endogenous GRK6A in the lesioned (infected) hemispheres of rats infected with the control (Control miRNA) and GRK6 miRNA viruses was compared by unpaired t-test (p<0.05). **(D)** Detection of the GRK6B expression by Western blot in the lesioned hemisphere infected with the GRK6 miRNA (GRK6) or nonsense miRNA (Control) virus in comparison with the intact (uninfected) hemisphere. Three middle lanes are different dilutions of recombinant GRK6B used as standards (the lysate of HEK293 cells transfected with rat GRK6B). **(E)** The expression of endogenous GRK6B in the intact and lesioned (infected) hemisphere was compared by paired t-test: * - p<0.05; ** - p<0.01 to the intact striatum. The expression of endogenous GRK6B in the lesioned (infected) hemispheres of rats infected with the control (Control miRNA) and GRK6 miRNA viruses was compared by unpaired t-test (p<0.001).

REFERENCES

1. M. Lundblad *et al.*, Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* 15, 120-132 (2002).
2. M. R. Ahmed, E. Bychkov, V. V. Gurevich, J. L. Benovic, E. V. Gurevich, Altered expression and subcellular distribution of GRK subtypes in the dopamine-depleted rat

- basal ganglia is not normalized by l-DOPA treatment. *J. Neurochem.* 104, 1622-1636 (2007).
3. E. Bychkov, M. R. Ahmed, K. N. Dalby, E. V. Gurevich, Dopamine depletion and subsequent treatment with L-DOPA, but not the long-lived dopamine agonist pergolide, enhances activity of the Akt pathway in the rat striatum. *J. Neurochem.* 102, 699-711 (2007).
 4. S. M. Hersch *et al.*, Electron microscopic analysis of D1 and D2 dopamine receptor proteins in the dorsal striatum and their synaptic relationships with motor corticostriatal afferents. *J. Neurosci.* 15, 5222-5237 (1995).
 5. V. A. Boundy, R. R. Luedtke, R. P. Artymyshyn, T. M. Filtz, P. B. Molinoff, Development of polyclonal anti-D2 dopamine receptor antibodies using sequence-specific peptides. *Mol Pharmacol* 43, 666-676 (1993).
 6. P. J. Kammermeier, P. F. Worley, Homer 1a uncouples metabotropic glutamate receptor 5 from postsynaptic effectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 6055-6060 (2007).
 7. S. Y. Shu, G. Ju, L. Z. Fan, The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci Lett* 85, 169-171 (1988).
 8. T. Boraud, E. Bezard, B. Bioulac, C. E. Gross, Dopamine agonist-induced dyskinesias are correlated to both firing pattern and frequency alterations of pallidal neurones in the MPTP-treated monkey. *Brain* 124, 546-557 (2001).
 9. S. J. Gold *et al.*, RGS9 2 negatively modulates l-3,4-dihydroxyphenylalanine-Induced dyskinesia in experimental Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 27, 14338-14348 (2007).
 10. I. Aubert *et al.*, Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia. *Ann. Neurol.* 57, 17-26 (2005).

11. E. Bezard *et al.*, Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive MPTP-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 21, 6853-6861 (2001).
12. E. Bezard *et al.*, Attenuation of levodopa-induced dyskinesia by normalizing dopamine D3 receptor function. *Nature Med.* 9, 762-767 (2003).
13. E. Bezard *et al.*, L-DOPA reverses the MPTP-induced elevation of the arrestin2 and GRK6 expression and enhanced ERK activation in monkey brain. *Neurobiol. Dis.* 18, 323-335 (2005).
14. I. Aubert *et al.*, Enhanced preproenkephalin-B-derived opioid transmission in striatum and subthalamic nucleus converges upon globus pallidus internalis in L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia. *Biol. Psychiatry* 61, 836-844 (2007).

Discussion

III) Discussion

III.A.) Synthèse générale des résultats

L'ensemble de nos résultats s'inscrit dans une démarche de recherche translationnelle menée depuis plusieurs années au laboratoire allant de la cellule au patient, avec pour but de transposer la compréhension des données expérimentales concernant les anomalies de l'expression du récepteur D1 de la dopamine en objectifs et en stratégies thérapeutiques dans les dyskinésies L-dopa induites.

Nous avons montré ou confirmé que l'expression anormale du récepteur D1 de la dopamine dans les neurones cibles striataux au cours des dyskinésies L-dopa-induites correspond pour l'essentiel à une surexpression au niveau de la membrane plasmique, associée à des troubles de la désensibilisation et du trafic intraneuronal. Nous avons montré que cette surexpression est sous la dépendance de plusieurs acteurs moléculaires associés : le récepteur D3 à la dopamine, le système du protéasome et la protéine GRK6. Nos investigations ont permis d'apporter de nouvelles connaissances sur ces co-acteurs, d'éclaircir certains de leurs rôles, et de montrer qu'il est possible d'agir sur l'expression du récepteur D1 de la dopamine à la membrane plasmique des neurones striataux de manière « non-conventionnelle », indirecte, sans toucher le récepteur D1, pour réduire « in fine » la sévérité des dyskinésies dans un contexte expérimental. Nos travaux permettent de nourrir une réflexion sur plusieurs pistes thérapeutiques nouvelles, peu ou pas explorées, chez l'homme, notamment l'utilisation d'antagonistes D3, la stimulation du protéasome et la surexpression de GRK6.

Au cours de mon travail, dans un premier temps, nous avons confirmé les résultats obtenus précédemment au sein de notre équipe dans le modèle primate non-humain analogue des dyskinésies dans un modèle expérimental plus simple et plus facile à analyser, le rat traité par la 6-OHDA : le récepteur D1 de la dopamine est anormalement abondant à la membrane plasmique des neurones épineux de taille moyenne du striatum, alors qu'il devrait être internalisé après stimulation par son ligand naturel, la dopamine, si les mécanismes de désensibilisation fonctionnaient normalement. Néanmoins, les mécanismes d'internalisation restent toujours fonctionnels puisque après stimulation par un agoniste sélectif du récepteur D1, le récepteur est internalisé dans le cytoplasme. Après administration de l'agoniste D1, chez les animaux dyskinétiques, l'abondance des récepteurs D1 à la dopamine augmente dans

les compartiments subcellulaires impliqués dans les mécanismes d'internalisation de désensibilisation et de transport (les vésicules), de dégradation (les corps multivésiculaires), mais aussi dans les compartiments de synthèse protéique (le réticulum endoplasmique) et de transformation métabolique (l'appareil de Golgi). Nous avons apporté une explication possible à cette abondance membranaire et à ce défaut d'internalisation, en montrant qu'ils pourraient être dus à une interaction physique entre les récepteurs D1 et D3. Après traitement par la L-dopa, la co-activation des récepteurs D1 et D3 par la dopamine favorisera l'ancre du récepteur D1 à la membrane plasmique des neurones striataux (Figure 23).

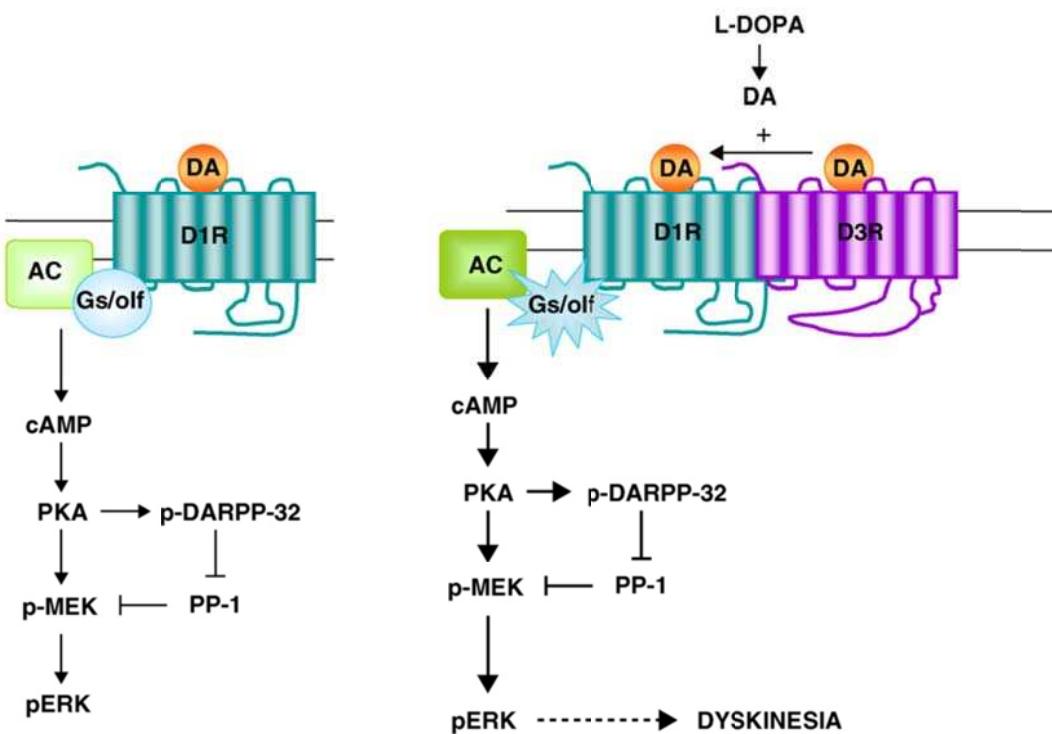


Figure 23 : Illustration schématique de l'hétérodimérisation des récepteurs D1 et D3 de la dopamine dans les neurones striataux. (Fiorentini et al., 2010)

(A) En situation normale, la dopamine se lie au récepteur D1 de la dopamine et active la cascade de signalisation.

(B) En situation dyskinétique, la stimulation par la L-dopa entraîne l'augmentation de l'abondance des récepteurs D3 dans les neurones striataux. Les récepteurs D1 sont maintenus à la membrane plasmique à cause de l'hétérodimérisation avec les récepteurs D3, entraînant l'amplification de la signalisation médiée par le récepteur D1. La co-stimulation des récepteurs D1 et D3 par la L-dopa favorisera l'ancre du récepteur D1 à la membrane plasmique des neurones striataux.

Dans ce cadre, l'abord de l'étude de l'implication du protéasome dans la régulation de l'expression du récepteur D1 de la dopamine nous a semblé particulièrement importante, sur la base des premières études soulignant la participation de ce système catalytique dans le contrôle de l'activité et du métabolisme des récepteurs aux neurotransmetteurs et partant dans le contrôle de la réactivité de neurones cibles à des modifications de leur environnement. Nous avons pu montrer des liens entre l'activité du protéasome et la dynamique intraneuronale du récepteur D1 de la dopamine et tout particulièrement nous avons montré pour la première fois que l'activité catalytique du protéasome, plus particulièrement son activité chymotrypsine-like, est réduite de façon spécifique dans le striatum d'animaux dyskinétiques, comme une conséquence directe d'une disparition de l'innervation dopaminergique associée à une stimulation dopaminergique. Cette altération est bien récepteur D1 spécifique puisque dans des cultures de neurones striataux, le co-traitement par un agoniste D1 et un inhibiteur du protéasome limite de manière importante l'internalisation du récepteur D1. La poursuite de ces travaux, la compréhension des mécanismes associant activité du protéasome, contrôle de l'abondance du récepteur D1 à la membrane et dyskinésies devrait contribuer à fournir de nouveaux outils pharmacologiques pour comprendre et traiter les dyskinésies L-dopa induites. Pour ce faire, il faudra en particulier déterminer directement les cibles du protéasome dans les neurones striataux au cours des dyskinésies et les relations entre son inhibition et la perturbation des mécanismes de désensibilisation. L'utilisation d'antagonistes du récepteur D3 laisse espérer la possibilité de moduler l'ancrage du récepteur D1 à la membrane, la compréhension de l'implication du protéasome laisse entrevoir la possibilité d'agir sur des mécanismes catalytiques associés ou non à l'endocytose de ce récepteur.

La stratégie mise en place en collaboration avec l'équipe américaine de E. V. Gurevich (Université Vanderbilt de Nashville) a permis, sur la base de la compréhension de certains des mécanismes moléculaires de désensibilisation de tester en situation expérimentale une stratégie thérapeutique nouvelle. Nous avons pu restaurer le mécanisme de désensibilisation homologue du récepteur D1 de la dopamine, par correction du déficit de la kinase GRK6 par transfert du gène correspondant *via* un vecteur lentiviral injecté par voie intracérébrale. Nous avons montré que cette approche permet de réduire considérablement la sévérité des dyskinésies et de restaurer les effets thérapeutiques de la L-dopa. Ces effets sont la conséquence de la restauration des mécanismes de désensibilisation homologue : en effet, la surexpression de GRK6 entraîne l'internalisation spécifique des récepteurs D1. L'ensemble

de ce travail souligne l'importance du rôle fonctionnel de GRK6 dans la chaîne des dysfonctionnements intraneuronaux conduisant aux dyskinésies.

III.B.) Transduction, mécanisme de désensibilisation du récepteur D1, protéasome et dyskinésies L-dopa induites comme cibles thérapeutiques

III.B.1) Signification physiopathologique

Nos résultats apportent des arguments qui confortent de manière dynamique l'importance des perturbations de l'expression du récepteur D1 de la dopamine lors des dyskinésies L-dopa-induites dans les modèles expérimentaux de la maladie de Parkinson, y compris le modèle de référence qu'est le primate non-humain intoxiqué au MPTP. Ils confortent aussi la possibilité d'agir de manière indirecte pour contrôler ces dyskinésies dans ces modèles.

Les résultats des investigations antérieures de notre équipe et les données que nous apportons démontrent que les variations d'abondance du récepteur D1 à la membrane des neurones épineux de taille moyenne constituent un élément cellulaire majeur responsable des dyskinésies. Néanmoins beaucoup reste à apporter pour comprendre les mécanismes neuronaux qui conduisent à cette accumulation anormale à la membrane. Dans les modèles animaux de dyskinésies, il a été démontré une augmentation de la transcription du gène du récepteur D1 (Aubert et al., 2005), suggérant une biosynthèse accrue, qui probablement contribue à cette accumulation. Il a été démontré une perturbation des mécanismes de désensibilisation et une diminution de l'activité du protéasome sans que nous ayons déterminé la nature exacte des perturbations des mécanismes de dégradation en aval de l'internalisation du récepteur D1. L'augmentation considérable (800%) du stockage du récepteur D1 dans les corps multivésiculaires après l'administration de l'agoniste sélectif D1 chez les animaux dyskinétiques suggère que les mécanismes de dégradation lysosomiale du récepteur sont considérablement stimulés dans les dyskinésies. Cette augmentation est-elle une simple conséquence de l'internalisation ou participe-t-elle des perturbations du métabolisme du récepteur ? On sait que le système ubiquitine protéasome cible les protéines à dégrader vers les corps multivésiculaires et le système lysosomal (Mukhopadhyay and Riezman, 2007). La compréhension de ces étapes de dégradation contribuera peut-être à une meilleure définition des stratégies d'action sur le récepteur D1 dans les dyskinésies. De même, il apparaît important, pour les mêmes raisons de mieux comprendre, au-delà de son accumulation, la nature et la signification des modifications de comportement du récepteur D1 à la membrane :

relations physiques avec le récepteur D3 ou d'autres récepteurs (cf ci-dessous), modifications de localisation et d'abondance dans chaque compartiment membranaire (corps cellulaire ; épines dendritiques) ; abondance relative du récepteur en position synaptique / extrasynaptique. Les techniques de morphologie ultra-résolutives dynamiques (FRET, utilisation de nano sondes), associées au développement de modèles cellulaires devraient permettre de mieux préciser les caractéristiques temporelles et spatiales des changements observés dans le comportement du récepteur D1, y compris des changements très rapides de compartiments cellulaires dont l'analyse est impossible avec nos approches.

Par ailleurs, nos résultats ne nous permettent pas d'affirmer à ce stade que les mécanismes que nous décrivons sont bien présents dans les neurones striataux chez l'homme en relation directe avec la présence des dyskinésies L-dopa-induites, une fois installées. Ils ne permettent pas non plus de déterminer à ce stade de nos investigations si les altérations que nous observons contribuent à l'apparition et au maintien de ces dyskinésies. Le développement d'outils d'imagerie permettant de suivre « *in vivo* » à une échelle régionale ou cellulaire la localisation membranaire du récepteur D1 dans des séquences temporelles courtes pourrait être intéressant pour répondre à ces questions.

Il est par ailleurs raisonnable de considérer que d'autres molécules contribuant à la réceptivité des neurones striataux et à des modifications de réactivité à leur environnement, tels que certains récepteurs du glutamate (voir ci-dessous) ou le récepteur D2 à la dopamine peuvent contribuer à l'apparition et au maintien de ces troubles. En témoignent l'effet de la surexpression de RGS9-2 (Regulators of G-protein signaling), protéine agissant comme un régulateur négatif de la signalisation protéine G dépendante en accélérant l'activité GTPasique des sous-unités G α , sur les dyskinésies L-dopa induites (Gold et al., 2007). La surexpression de RGS9-2 dans le striatum dorsal chez le rat et chez le primate non-humain réduit significativement la sévérité des dyskinésies. De plus, les mouvements involontaires anormaux sont plus importants chez des souris transgéniques knock-out pour RGS9-2 (RGS9-2^{-/-}) traitées par la 6-OHDA et par la L-dopa, en comparaison aux souris contrôles (RGS9-2^{+/+}) également traitées par la 6-OHDA et par la L-dopa (Gold et al., 2007).

III.B.2) Intérêts potentiels en thérapeutique, outils et contraintes

Les relations que nous avons établies dans nos travaux entre la surexpression du récepteur D1 à la membrane et la présence des dyskinésies ou leurs équivalents chez le rongeur ouvrent néanmoins trois possibilités pour tester différentes stratégies pour agir indirectement sur l'activité et la disponibilité membranaire du récepteur D1 de la dopamine.

III.B.2.a) Interaction entre les récepteurs D1 et D3 de la dopamine

La perturbation de l'interaction entre les récepteurs D1 et D3 au niveau membranaire semble être une piste très intéressante à suivre, puisque de précédentes études réalisées chez le rat et le primate non-humain ont montré que l'association d'un antagoniste D3 au traitement chronique par la L-dopa permet de réduire significativement les dyskinésies (Bezard et al., 2003; Visanji et al., 2008). Bien qu'à ce jour, il n'existe aucune molécule connue capable de bloquer spécifiquement l'hétérodimérisation D1-D3, il pourrait être envisageable aussi de rechercher cette molécule en réalisant un criblage moléculaire dans un modèle cellulaire simple de co-transfection D1-D3 ? Est-il par ailleurs possible de concevoir et de tester de telles molécules par des études de modélisations moléculaires ? Le développement de nouveaux antagonistes spécifiques du récepteur D3 pourrait aussi contribuer au blocage de ces interactions.

III.B.2.b) Stimulation de l'activité catalytique du protéasome

La compréhension de la contribution de l'activité catalytique du protéasome au métabolisme normal et anormal du récepteur D1 ne fait que débuter. Il est important de poursuivre cette recherche pour espérer agir directement sur l'activité du protéasome, en comprenant en particulier quelles sous-unités du protéasome sont impliquées et quelles sont leurs relations avec les acteurs du processus de désensibilisation et l'apparition des dyskinésies. Pour cela nous pourrons utiliser les modèles « *in vitro* » et « *in vivo* » mis à profit dans notre thèse : (1) pour déterminer quelle est la nature et la signification fonctionnelle des modifications de l'activité du protéasome dans les neurones striataux en fonction de l'environnement dopaminergique, stimulation, dénervation et combinaison des deux ; (2) pour disséquer les conséquences des changements dans l'activité du protéasome sur la localisation subcellulaire et en particulier membranaire du récepteur D1 et éventuellement d'autres récepteurs de la dopamine (D2 et D3) ; (3) pour chercher à manipuler « *in vivo* » l'activité du protéasome et

en décrire les conséquences sur l'apparition des dyskinésies, avec pour objectif de trouver des conditions permettant de les limiter. Parmi les axes que nous n'avons pas abordé dans notre travail de thèse, se trouve celui de l'ubiquitinylation du récepteur D1 et ses conséquences sur son adressage membranaire et sa dégradation. L'ubiquitinylation contribue à l'adressage des récepteurs vers le système lysosomial et il a été démontré « *in vitro* » qu'on peut réguler l'abondance membranaire du récepteur GABA A et l'activité électrique qui en dépend en influençant spécifiquement ces mécanismes d'ubiquitinylation (Arancibia-Carcamo et al., 2009). Ainsi, l'ubiquitinylation, au carrefour des voies de dégradation protéasomale et lysosomiale, constitue peut-être aussi une porte d'entrée pour contrôler le métabolisme du récepteur D1 au cours des dyskinésies.

En thérapeutique humaine, l'utilisation de molécules modifiant l'activité du protéasome a débuté depuis plusieurs années. C'est le cas pour le traitement de certaines formes de myélome multiple réfractaire à la chimiothérapie et le lymphome du manteau où le bortezomid qui inhibe le protéasome, est actif chez l'homme pour bloquer la prolifération tumorale avec des effets secondaires acceptables (Raab et al., 2009).

On peut se demander quels sont les composants du protéasome les plus judicieux qui pourraient être ciblées. De plus, il faudrait trouver une stratégie pour agir uniquement sur le système nerveux central. Etant donné l'importance des activités du protéasome pour l'activité normale des cellules, une stimulation de l'activité catalytique du protéasome pourrait avoir des effets délétères pour l'ensemble de l'organisme et entraîner des effets secondaires importants.

Nos premières données suggèrent que ce sont des activateurs du protéasome qui pourraient présenter un intérêt dans le traitement des dyskinésies. De telles molécules n'existent pas aujourd'hui en clinique mais différentes molécules ont de tels effets « *in vitro* ». Des travaux récents suggèrent des pistes originales pour activer le protéasome, tel l'effet de certains agonistes des récepteurs à l'adénosine qui stimulent l'activité du protéasome (Chiang et al., 2009). L'utilisation de vecteurs lentiviraux comme nous l'avons fait pour l'expression de GRK6 devrait permettre de tester les conséquences d'une surexpression de certains constituants du protéasome ou de molécules régulatrices « *in vivo* ». De même, une étude récente a mis en évidence qu'en bloquant la molécule, USP14, régulateur négatif du protéasome et qui est associé aux enzymes d'ubiquitinylation, l'activité du protéasome peut

être augmentée. Ceci constitue aussi une piste nouvelle possiblement transposable dans une approche pharmacologique (Lee et al., 2010).

III.B.2.c) Surexpression de GRK6

Nos travaux valident GRK6 en tant que cible thérapeutique d'intérêt pour traiter les dyskinésies et les fluctuations de la réponse thérapeutique à la L-dopa. Cependant, une telle stratégie de thérapie génique reposant sur l'utilisation de vecteurs lentiviraux semble prometteuse mais encore prématuée pour être immédiatement appliquée à l'homme. La question cruciale, à ce jour sans réponse claire, est de savoir si les progrès technologiques permettront de faire évoluer la transgénèse ou ses dérivés pour en faire une méthode sûre et fiable utilisable en thérapeutique dans les pathologies du système nerveux central.

Des problèmes considérables restent encore à résoudre. Le passage en clinique des lentivirus nécessite tout d'abord de disposer d'une méthode de production fiable reproductible permettant l'obtention de stocks de vecteurs en grande quantité et dont l'innocuité est démontrée. En effet, dérivant du VIH (virus de l'immunodéficience humaine), il est indispensable de vérifier leur innocuité : ces vecteurs ne doivent pas recombiner, ne pas interagir avec d'autres virus, notamment pour ne pas reproduire une souche de VIH active. De plus le risque d'intégration mutationnelle des lentivirus dans le génome est un risque majeur car il pourrait éteindre l'expression de gènes indispensables. Par ailleurs, en clinique, une régulation fine de l'expression du transgène est un point primordial afin d'être en mesure de contrôler la dose de molécule thérapeutique synthétisée et d'arrêter le traitement si des effets secondaires apparaissent. Sur un plan éthique, même si la maladie de Parkinson et les effets secondaires du traitement à la L-dopa apparaissent très handicapants, les patients peuvent vivre longtemps avec leurs déficits et il existe actuellement des traitements pouvant pallier certains symptômes invalidants. L'évaluation du potentiel des lentivirus chez l'homme est actuellement réalisée chez des patients en phase terminale de maladies graves, comme les cancers, en transférant des gènes qui sont impliqués par exemple dans le contrôle de la douleur. Actuellement, plusieurs essais cliniques ont été lancés en utilisant des stratégies de thérapie génique pour le traitement expérimental de la maladie de Parkinson, notamment avec l'injection de vecteurs AAV (adeno-associated virus) : l'injection de l'AAV-GAD (glutamic acid decarboxylase) dans le noyau sous-thalamique (Neurologix), l'injection de l'AAV-

AADC (aromatic L-amino acid decarboxylase) dans le striatum (Avigen) et l'injection de l'AAV-NTN (neurturin) dans le striatum (Ceregene).

En conclusion, la thérapie génique de la maladie de Parkinson et des dyskinésies demeure une thérapie prometteuse qui en est encore à ces balbutiements. Un effort de recherche et de développement doit donc être encore réalisé pour obtenir un système fiable, efficace et sûr. Néanmoins, ces stratégies devraient permettre d'affiner dans des conditions expérimentales l'efficacité d'outils permettant ou mimant la surexpression de GRK6. Ceci devrait favoriser des stratégies de criblage pharmacologique pour identifier de petites molécules capables de mimer l'action de la kinase GRK6 ou de stimuler son expression.

III.B.2.d) Autres cibles

Quelque soient la complexité de ces stratégies et leurs limites actuelles, les résultats que nous avons obtenus ouvrent la porte pour agir selon d'autres modalités sur l'expression du récepteur D1 à la membrane, son internalisation et les mécanismes de désensibilisation homologue. Sur la base de la diminution d'expression de l'arrestine 2 chez les primates non-humains dyskinétiques (Bezard et al., 2005), on pourrait ainsi tenter d'agir pour stimuler l'expression de cette molécule en escomptant un effet similaire à celui obtenu avec la surexpression de GRK6. De même, il est clairement établi que $G\alpha_{olf}$ est étroitement associé au récepteur D1 dans les neurones striataux, puisqu'il est nécessaire pour le couplage du récepteur D1 de la dopamine à l'adénylate cyclase (Zhuang et al., 2000; Corvol et al., 2001). Des études ont révélées que $G\alpha_{olf}$ est surexprimé chez les animaux dyskinétiques (Corvol et al., 2004) ; ceci en fait aussi une cible potentielle intéressante pour le développement d'outils pharmacologiques bloquant ou limitant son expression. Une autre piste possible pourrait être de cibler la cascade de signalisation ERK (extracellular signal-regulated kinase, aussi appelé mitogen-activated protein kinase/MAPK). Gerfen et ses collaborateurs ont en effet montré après une déplétion dopaminergique, l'activation de la signalisation ERK dans les neurones de la voie directe. L'hypersensibilité du récepteur D1 entraîne un switch de la voie canonique vers la voie non- canonique médierée par D1 (Gerfen et al., 2002). De plus, différentes études réalisées dans différents modèles expérimentaux (souris, rat et primate non-humain) ont montré une augmentation de la forme phosphorylée de ERK et d'AMPc (Pavon et al., 2006; Santini et al., 2009; Santini et al., 2010) chez les animaux dyskinétiques. On pourrait par conséquent envisager de diminuer l'expression de ERK ou de ses co-acteurs impliqués dans

sa voie de signalisation pour réduire la sévérité des dyskinésies. Un dernier exemple de cible potentielle pourrait être de diminuer l'expression de la protéine DARPP-32, qui est surexprimée chez les animaux dyskinétiques (Santini et al., 2007). Nous n'avons présenté ici seulement que quelques exemples, mais chaque acteur impliqué dans les différents niveaux de la cascade de signalisation médiée par le récepteur D1 de la dopamine pourrait être envisagé comme étant une cible potentielle intéressante.

Nos résultats et ceux des équipes mentionnées illustrent la diversité des cibles potentielles permettant d'influencer l'expression et le devenir du récepteur D1 de manière indirecte dans les neurones striataux au cours des dyskinésies, en particulier son abondance à la membrane. Une des difficultés majeures de la transposition en thérapeutique humaine est de réduire la complexité des stratégies et des expériences nécessaires pour déterminer la (ou les) cibles les plus pertinentes d'autant plus qu'il semble actuellement vain d'espérer disposer d'un outil simple (tel un modèle cellulaire) permettant une modélisation des relations entre anomalies du comportement du récepteur D1 et présence des dyskinésies. Néanmoins, l'association des progrès dans les connaissances du métabolisme normal et anormal du récepteur D1 de la dopamine et l'évolution des technologies telles que les techniques *in vitro* d'imagerie cellulaire dynamique de suivi en temps réel des récepteurs membranaires, devraient contribuer aux stratégies thérapeutiques.

III.C.) Autres cibles thérapeutiques potentielles dans les neurones striataux : glutamate/PSD95

Dans mon travail de thèse, nous avons mis en évidence l'intérêt de promouvoir l'internalisation et la désensibilisation homologue du récepteur D1 de la dopamine pour réduire la sévérité des dyskinésies ou les maîtriser. Cependant, d'autres pistes méritent considérations et restent à explorer, comme l'action sur des mécanismes de désensibilisation hétérologue. C'est le cas notamment du glutamate qui représente le principal neurotransmetteur excitateur des ganglions de la base. Le striatum est la principale structure d'entrée des ganglions de la base. Le cortex projette massivement sur le striatum, où il établit des synapses cortico-striatales avec les neurones épineux de taille moyenne : ce sont des synapses glutamatergique, modulées par la dopamine (Figure 24). Les récepteurs D1 et D2 à la dopamine sont localisés au niveau des épines dendritiques (Caille et al., 1996), associées à des récepteurs ionotropiques du glutamate comme les récepteurs de type AMPA (acide α -

amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique) et NMDA (N-Méthyl-D-Aspartate), qui sont également impliqués dans l'apparition des dyskinésies L-dopa induites. De nombreux isotypes de récepteurs du glutamate sont exprimés dans les neurones striataux selon des modalités complexes (Dingledine et al., 1999; Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004).

Des travaux d'hybridation *in situ* et de binding ont montré que le niveau d'expression des récepteurs de type NMDA dans le striatum est augmenté chez les patients parkinsoniens (Ulas et al., 1994) et chez le primate non-humain intoxiqué au MPTP et traité par la L-dopa (Calon et al., 2002). Plus précisément, chez le primate non-humain dyskinétique, l'expression accrue des récepteurs NMDA dans le striatum est associée à une augmentation des sous-unités NR2A et NR2B (Calon et al., 2002). Des études menées dans le modèle rat lésé à la 6-OHDA, ont révélé une expression striatale des sous-unités NR1 et NR2B diminuée, augmentant ainsi la proportion relative des sous-unités NR2A (Dunah et al., 2000). Le traitement chronique par la L-dopa restaure l'expression des sous-unités NR1 et NR2B à leur niveau basal, mais en revanche entraîne une hyperphosphorylation des sous-unités NR2A et NR2B (Oh et al., 1998; Dunah et al., 2000).

Des études de fractionnement subcellulaire du striatum et de western-blot, menées en collaboration avec notre équipe ont permis de quantifier l'abondance de ces sous-unités dans les compartiments subcellulaire dans le modèle primate non-humain analogue des dyskinésies (Hallett et al., 2005). Chez les animaux parkinsoniens, l'abondance des sous-unités NR1 et NR2B est réduite à la membrane synaptique, mais est normalisé par le traitement à la L-dopa. En revanche, chez les animaux dyskinétiques, la sous-unité NR2A est massivement recrutée à la membrane synaptique (Hallett et al., 2005). D'autres travaux se sont focalisés sur les récepteurs AMPA. En utilisant les mêmes techniques, ils ont mis en évidence que chez le primate non-humain dyskinétique, l'abondance des sous-unités GluR2/3 est également augmentée à la membrane synaptique dans le striatum, alors que la sous-unité GluR1 reste inchangée (Silverdale et al., 2010).

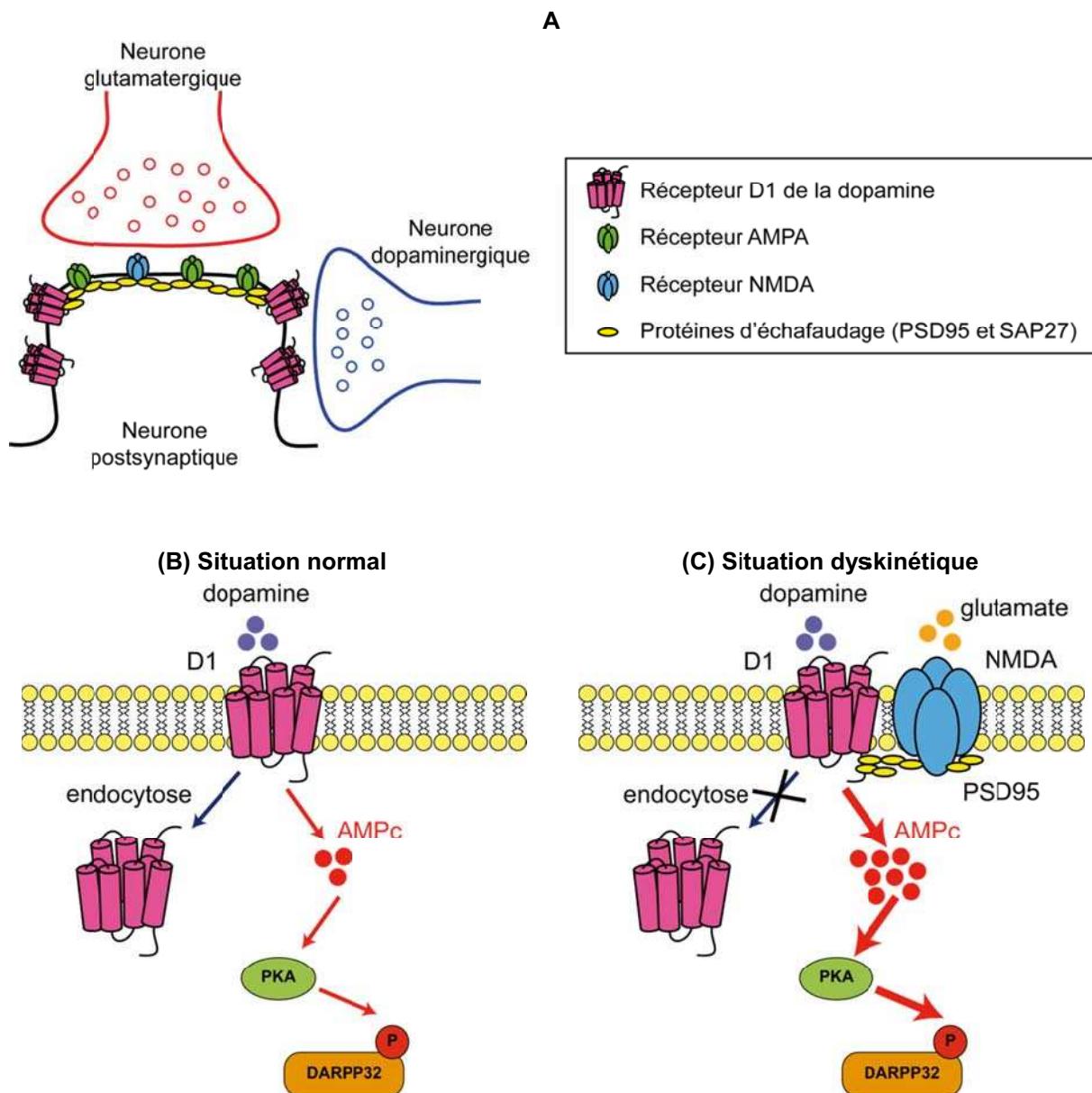


Figure 24 : Représentation schématique de la synapse glutamatergique et de l'interaction D1/PSD95/NMDA.

(A) La synapse glutamatergique.

(B) En situation normal, la dopamine se fixe sur le récepteur D1 et stimule l'adénylate cyclase, qui conduit à l'accumulation de la production d'AMPc et active la signalisation passant par PKA/DARPP-32. Le récepteur D1 est internalisé par la machinerie de désensibilisation homologue.

(C) En situation dyskinétique, PSD95 est surexprimé. Il favorisera l'association du récepteur D1 avec le récepteur NMDA à la membrane plasmique. Le récepteur D1 à la membrane plasmique serait ainsi maintenu à la membrane, ce qui conduirait à l'hyperactivation de sa voie de signalisation passant par PKA/DARPP-32, qui empêcherait l'internalisation du récepteur.

Ces différentes études suggèrent que l'apparition des dyskinésies peut être liée à une expression différentielle des sous-unités des récepteurs NMDA et AMPA, malgré les différences interspécifiques qu'elles révèlent. Cependant, il existe aussi d'autres modifications et notamment au niveau des protéines d'échafaudage PSD95 (Postsynaptic density 95) et SAP97 (Synapse associated protein 97), qui jouent un rôle clé dans la stabilisation des récepteurs glutamatergiques à la densité postsynaptique. Dans le modèle rat, la déplétion dopaminergique du striatum induit la diminution de l'expression de PSD95 et de SAP97 à la membrane synaptique. En revanche, en situation dyskinétique, l'expression PSD95 et SAP97 est augmentée à la membrane postsynaptique (Nash et al., 2005). Par conséquent, l'augmentation des protéines d'échafaudage contribuerait au recrutement des récepteurs à la membrane postsynaptique, ceci d'autant plus que la protéine PSD95 est connue pour interagir physiquement avec le récepteur D1 à la dopamine et ainsi pour réguler son trafic et sa fonction (Zhang et al., 2007).

En situation dyskinétique, le récepteur D1 de la dopamine, les récepteurs glutamatergiques ainsi que des protéines d'échafaudage sont anormalement recrutés à la membrane postsynaptique de la synapse cortico-striatale. Ces données indiquent que ces récepteurs ne sont pas internalisés après stimulation par leur ligand naturel. Pour promouvoir l'internalisation du récepteur D1 de la dopamine, nous avons dans nos travaux suggéré deux stratégies possibles : l'utilisation d'un antagoniste du récepteur D3 à la dopamine pour agir sur l'interaction D1-D3 et la surexpression de GRK6 pour restaurer la machinerie de désensibilisation. Cependant, pour les raisons évoquées, la manipulation de la protéine PSD95 semble être également une cible potentielle très intéressante à étudier. Cette piste fait l'objet d'une collaboration en cours avec l'équipe de Daniel Choquet et de Christophe Mulle.

Notre hypothèse de travail a été que l'ancrage du récepteur D1 à la membrane peut être modulé par le niveau d'expression de PSD95 : la modulation du niveau de PSD95 pourrait améliorer la sévérité des dyskinésies. La stratégie choisie a été de diminuer l'expression de PSD95 grâce à l'utilisation de vecteur lentiviral injecté dans le striatum. Jusqu'à présent, seule la partie comportementale de cette expérience a été réalisée dans le modèle rat, analogue des dyskinésies. De manière intéressante, la régulation négative de l'expression de PSD95 améliore les quatre types de mouvements involontaires anormaux. La suite du travail est de s'intéresser à l'effet d'une réduction de PSD95 sur la distribution cellulaire dans un premier temps du récepteur D1 à la membrane plasmique des neurones striataux puis dans un

deuxième temps sur la distribution des récepteurs glutamatergiques. Pour cela, il pourrait être envisagé d'exploiter des cultures primaires de neurones striataux de rat et d'étudier le trafic de ces récepteurs en temps réel à l'aide de technique de suivi de molécule unique, basée sur le couplage d'une particule (quantum dot) à un anticorps dirigé contre un épitope extracellulaire de la protéine d'intérêt.

Conclusion générale

IV) Conclusion générale

Nos travaux ont été ciblés sur l'analyse de l'expression du récepteur D1 et des molécules qui contribuent à son métabolisme intracellulaire dans les neurones cibles de la dopamine. Ils nous ont permis d'une part d'apporter des informations sur le trafic intraneuronal de ce récepteur dans le striatum et ses perturbations dans les modèles expérimentaux de dyskinésies, d'autre part de tester des orientations thérapeutiques nouvelles. Grâce aux collaborations mises en place par notre équipe, la grande diversité des stratégies que nous avons employées et des modèles cellulaires et animaux a permis d'utiliser les avancées dans la compréhension des mécanismes moléculaires afin de progresser dans la réflexion et les choix méthodologiques pour des approches thérapeutiques. Ceci est en particulier rendu possible grâce au va-et-vient rapide et à l'enrichissement mutuel entre les modèles qui permettent d'interroger les mécanismes élémentaires à l'échelon du neurone et les expériences chez l'animal entier permettant une analyse des comportements, en conditions « pré »thérapeutiques, en particulier chez le singe. C'est cette démarche que nous avons pu réaliser au cours de notre projet consacré aux modifications d'activité du protéasome. De même, comme nous l'avons évoqué, l'expérience d'utilisation des vecteurs lentiviraux acquise avec les travaux portant sur GRK6 est directement transposable pour tenter de moduler l'activité d'autres cibles moléculaires dans les neurones striataux.

En conclusion, nos travaux, même si nous n'avons pas la certitude qu'ils ouvrent rapidement des voies thérapeutiques immédiatement transposables en clinique, nourrissent la compréhension de la physiopathologie des dyskinésies. Les avancées qui ont conduit il y a dix ans à l'utilisation thérapeutique chez le malade parkinsonien de la stimulation cérébrale profonde ont été le fruit d'une telle approche multidisciplinaire qui a permis au fil des ans de construire une stratégie thérapeutique inattendue et innovante sur la base de la compréhension des fonctions et des dysfonctionnements du noyau sous-thalamique. Dans cet esprit là, nous espérons que dans le domaine de l'expression du récepteur D1 de la dopamine, l'ensemble des travaux qui sont menés pourra être aussi fructueux et se traduire dans les années à venir par des progrès majeurs dans le traitement et possiblement la prévention des dyskinésies L-dopa induites.

Publications annexes

V) PUBLICATIONS ANNEXES

V.A.) Article annexe 1

Antagonizing L-typeCa2_ChannelReducesDevelopment of Abnormal Involuntary Movement in the Rat Model of L-3,4-Dihydroxyphenylalanine-Induced Dyskinesia

Stefan Schuster, Evelyne Doudnikoff, Daniella Rylander, Amandine Berthet, Incarnation Aubert, Carina Ittrich, Bertrand Bloch, M. Angela Cenci, D. James Surmeier, Bastian Hengerer, and Erwan Bezard

Biological Psychiatry, Volume 65, Issue 6, 15 Mars 2009, Pages 518-526

[doi:10.1016/j.biopsych.2008.09.008](https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.09.008)

Antagonizing L-type Ca^{2+} Channel Reduces Development of Abnormal Involuntary Movement in the Rat Model of L-3,4-Dihydroxyphenylalanine-Induced Dyskinesia

Stefan Schuster, Evelyne Doudnikoff, Daniella Rylander, Amandine Berthet, Incarnation Aubert, Carina Ittrich, Bertrand Bloch, M. Angela Cenci, D. James Surmeier, Bastian Hengerer, and Erwan Bezard

Background: Chronic L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) treatment of Parkinson's disease (PD) leads to debilitating involuntary movements, termed L-DOPA-induced dyskinesia. Striatofugal medium spiny neurons (MSN) lose their dendritic spines and cortico-striatal glutamatergic synapses in PD and in experimental models of DA depletion. This loss of connectivity is triggered by a dysregulation of intraspine Cav1.3 L-type Ca^{2+} channels. Here we address the possible implication of DA denervation-induced spine pruning in the development of L-DOPA-induced dyskinesia.

Methods: The L-type Ca^{2+} antagonist, isradipine was subcutaneously delivered to rats at the doses of .05, .1, or .2 mg/kg/day, for 4 weeks, starting the day after a unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesion. Fourteen days later, L-DOPA treatment was initiated.

Results: Isradipine-treated animals displayed a dose-dependent reduction in L-DOPA-induced rotational behavior and abnormal involuntary movements. Dendritic spine counting at electron microscopy level showed that isradipine (.2 mg/kg/day) prevented the 6-OHDA-induced spine loss and normalized preproenkephalin-A messenger RNA expression. Involuntary movements were not reduced when isradipine treatment was started concomitantly with L-DOPA.

Conclusions: These results indicate that isradipine, at a therapeutically relevant dose, might represent a treatment option for preventing L-DOPA-induced dyskinesia in PD.

Key Words: Electron microscopy, isradipine, medium spiny neurons, Parkinson's disease

Parkinson's disease (PD) is caused by degeneration of dopaminergic neurons that provide dopamine (DA) input to the striatum (1). Chronic DA replacement therapy with L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) often results in involuntary movements known as L-DOPA-induced dyskinesia (2). The major striatal target of dopaminergic innervation is the medium spiny neurons (MSNs) that form two major efferent pathways differing in their expression of DA receptors. The MSNs that project to the external segment of the globus pallidus express DA D_2 receptors (3), whereas those projecting to the internal segment of the globus pallidus and substantia nigra pars reticulata express DA D_1 receptors (D_1R) (3). The prevailing model of PD asserts that DA depletion elevates the activity of striatopallidal neurons and lowers the activity of striatonigral neurons, which leads to an imbalance in the control of basal ganglia outflow to the thalamus and an inability to move effectively in response to higher motor system commands (4,5).

Profound plastic changes also affect the MSNs during the progressive loss of DA input (6–8). It has recently been demonstrated that striatopallidal MSNs lose a significant fraction of their

spines and glutamatergic synapses in experimental rodent models of PD (9). This loss of connectivity is triggered by a dysregulation of Cav1.3 L-type Ca^{2+} channels.

We hypothesized that the loss of spines and synaptic connectivity might participate in the development of adverse events related to L-DOPA therapy, because it would alter information flow through the striatum and rest of the basal ganglia nuclei. We thus set out to study the effects of isradipine, a Cav1.2-1.3 L-type Ca^{2+} channel antagonist, on the development of L-DOPA-induced abnormal involuntary movements (AIMs) in the 6-hydroxydopamine (6-OHDA) rat model of PD. At the end of the behavioral study, spine counts were carried out in the striatum with electron microscopy.

Methods and Materials

Animals

Male Wistar rats (Harlan Winkelmann, Borchen, Germany) weighing 280–320 g were housed in groups of five in Macrolon type III cages under standard laboratory conditions ($22 \pm 1^\circ\text{C}$, $55 \pm 5\%$ of a relative humidity, and a 12-hour light–dark cycle) with ad libitum access to food (GLP Vitamin fortified; Provimi Kliba AG, Kaiseraugst, Switzerland) and water. All experiments were approved by the Ethical Committee of the regional council of Upper Swabia (Tübingen, Germany) and by the Malmö-Lund ethical committee on animal research (Sweden). The procedures are in accordance with the ethical standards laid down in the European Union guidelines (European Communities Council Directive 86/609/EEC).

6-OHDA Lesion

Unilateral mesencephalic lesions were performed (10) by infusion of 6-OHDA.Br (2.5 mg/mL; .3 $\mu\text{L}/\text{min}$) (Sigma, St. Louis, Missouri) through two small burr holes in the skull into the right medial forebrain bundle (2.5 μL at anteroposterior [AP] = -4.4 mm, mediolateral = $+1.2$ mm, and dorsoventral = -7.8 mm, relative

From Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Company KG (SS, CI, BH), Biberach, Germany; Université Victor Segalen-Bordeaux 2 (ED, AB, IA, BB, EB), Centre National de la Recherche Scientifique, Bordeaux Institute of Neuroscience, Bordeaux, France; Department of Experimental Medical Science (DR, MAC), Lund University, Lund, Sweden; and the Department of Physiology (DJS), Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago, Illinois.

Address reprint requests to Erwan Bezard, Ph.D., Université Victor Segalen, CNRS UMR 5543, 146 rue Leo Saignat, 33076 Bordeaux, France; E-mail: Erwan.bezard@u-bordeaux2.fr.

Received March 24, 2008; revised September 1, 2008; accepted September 3, 2008.

0006-3223/09/\$36.00
doi:10.1016/j.biopsych.2008.09.008

Biol Psychiatry 2009;65:518–526
© 2009 Society of Biological Psychiatry

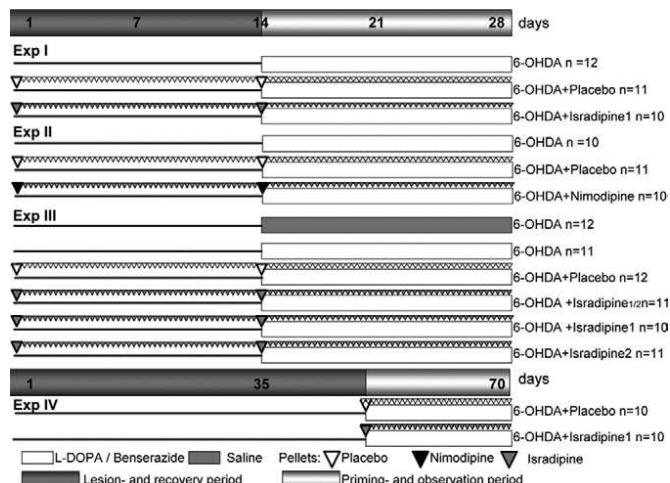


Figure 1. Experimental design. A total of 151 rats with unilateral 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesions were used in four separate experiments. Experiment (EXP I): 10 6-OHDA-lesioned rats received subcutaneous pellets of .1 mg/kg/day of Isradipine, 11 6-OHDA-lesioned rats received placebo pellets, and 12 6-OHDA-lesioned rats were left without pellet implantation. EXP II: 10 6-OHDA-lesioned rats received subcutaneous pellets of .1 mg/kg/day of nimodipine, 11 6-OHDA-lesioned rats received placebo pellets, and 10 6-OHDA-lesioned rats were left without pellet implantation. EXP III: 11 6-OHDA-lesioned rats received subcutaneous pellets of .05 mg/kg/day, 10 6-OHDA-lesioned rats received pellets of .1 mg/kg/day, and 11 6-OHDA-lesioned rats received pellets of .2 mg/kg/day. Twelve 6-OHDA-lesioned rats received placebo pellets, and 11 6-OHDA-lesioned rats were left without pellet implantation. Two weeks after 6-OHDA injection, all groups were chronically treated with L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)/Benserazide (6 mg/kg/15 mg/kg) or vehicle for 14 days and were daily behaviorally assessed in both EXP I and EXP II. EXP IV: 10 6-OHDA-lesioned rats received placebo pellets, and 10 rats received pellet of .2 mg/kg/day 7 weeks after 6-OHDA-lesion surgery and were then chronically treated with L-DOPA (6 mg/kg; IP) plus Benserazide (15 mg/kg; IP).

to bregma and dura; and 2 μ L at AP = −4.0 mm, mediolateral = +.7 mm, and dorsoventral = −8.0 mm) (11). Injection cannula was left in place for 5 more minutes before removal.

Drug Treatments

Experimental design is summarized in Figure 1. Continuous-release pellets of Isradipine (.05, .1, and .2 mg/kg/day Isradipine), nimodipine (.1 mg/kg/day), or inert control (Innovative Research of America, Sarasota, Florida) were implanted into the interscapular space on the day of 6-OHDA injection (experiments [Exps] I, II, and III) or 7 weeks after lesion (Exp IV). The pellets were replaced 14 days after implantation. Two weeks after surgery, the rats were chronically treated with either L-DOPA (6 mg/kg; p.o.) plus Benserazide (15 mg/kg; p.o.) or vehicle once daily for a further 14 days, because such dosage induces a gradual development of dyskinetic-like movements in 6-OHDA lesioned rats (12,13). Immediately before death and 24 hours after last L-DOPA/Benserazide administration, animals received .1 mg/kg of apomorphine (SC; Sigma) and were placed into an automated Rotameter (TSE, Bad Homburg, Germany). The number of contralateral turns was counted from 30 min starting 10 min after apomorphine injection (10).

Behavioral Analysis

Ratings of dyskinesia were carried out daily by an experimentally blind investigator at 20–140 min after the administration of L-DOPA/Benserazide. Abnormal involuntary movements were classified into four subtypes: locomotive AIMs (asymmetric loco-

motion with contralateral turning bias); axial AIMs (twisting of the neck and trunk towards the side contralateral to the lesion); limb AIMs (purposeless “grabbing” movements and/or dystonic posturing of the forelimb contralateral to the lesion); orolingual AIMs (empty jaw movements and contralateral tongue protrusions) (12). As previously explained (13,14), these movements can be clearly discerned from enhanced manifestations of normal motor activities (such as grooming, gnawing, rearing, and sniffing), and they have marked hyperkinetic and/or dystonic features. Axial, limb, and orolingual AIMs are reduced by drugs with proven antidyskinetic efficacy (13) and provide a validated equivalent of peak-dose dyskinesia in PD (12,14). Each AIM subtype was scored every 20th minute on a severity scale from 0 to 4 (0, non-existing; 1, present during < one-half of the observation time; 2, present during more than one-half of the observation time; 3, continuous but interrupted by strong sensory stimuli; 4, continuous, not interrupted by strong sensory stimuli). The theoretical maximum sum of AIM scores that could be reached by one rat in one testing session was thus 112 (maximum score/monitoring period, 16; number of monitoring periods/testing session, 7).

Postmortem Processing

Animals were anesthetized with sodium chloral hydrate (150 mg/kg) and perfused with 2% paraformaldehyde and .2% glutaraldehyde in phosphate buffer (PB; .1 mol/L) (15). Brains were cut into 60- μ m frontal sections with vibratome (Leica, VT1000S, Wetzlar, Germany). Sections were collected in phosphate-buffered saline (PBS), cryoprotected in 25% sucrose PBS, freeze-thawed, and stored in PBS with .03% sodium azide. Before any further processing, extent of lesion was checked with tyrosine-hydroxylase (TH) immunohistochemistry of the striatum and substantia nigra as described in several occasions (16,17). Representative examples of the groups for which one can suspect a neuroprotective effect of isradipine (i.e., animals exposed to the highest dose of continuous-release Isradipine pellets [.2 mg/kg/day] or to inert control pellets that were implanted into the interscapular space on day of 6-OHDA injection [Exp III in Figure 1]) are shown as Supplement 1 and clearly demonstrate the lack of isradipine-mediated protection when 6-OHDA is injected into medial forebrain bundle.

In Situ Hybridization Histochemistry

The in situ hybridization was performed (18) with a probe designed to recognize the rat preproenkephalin-A (PPE-A) (19). [35 S]-labelled antisense and sense complementary RNA probes were prepared by in vitro transcription from 100 ng of linearized plasmid with [35 S]UTP (> 1000 Ci/mmol; NEN, Boston, Massachusetts) and SP6, T3, or T7 polymerases. After alkaline hydrolysis to obtain .25 Kb complementary RNA fragments, probes were purified on G50-Sephadex and precipitated in sodium acetate (.1 vol)/absolute ethanol (2.5 vol). Sections were then hybridized. Slides were exposed to Biomax film (Kodak, Rochester, New York) with autoradiographic microscales (Amersham, Buckinghamshire, United Kingdom). Densitometric analysis was performed with an image analysis system (Mercator, Explora Nova, La Rochelle, France). Optical densities were averaged for each animal, converted to amount of radioactivity bound by comparison with the standards, and finally expressed as percentage of the mean value of the unlesioned side (mean \pm SEM).

Immunoperoxidase Experiments at Electron Microscopy Level

The D₁R was detected by the preembedding immunoperoxidase technique (15,20,21) with a monoclonal antibody raised in

rat against a 97 amino acid sequence corresponding to the C-terminus of the human D₁ (Sigma) (22). After perfusion-fixation as described in the preceding text, D₁R was detected with the tyramide signal amplification system (TSA; NEN, Boston, Massachusetts). Sections were incubated in 4% normal goat serum (NGS) for 30 min and in D₁ (1:5000) antibody supplemented with 1% NGS overnight at room temperature (RT). Sections were then incubated for 90 min at RT in biotinylated goat anti-rat (1:200 in PBS, Amersham), then in streptavidin-horseradish peroxidase (SA-HRP) 1:100 in PBS (TSA indirect kit; NEN) for 30 min at RT, then PBS-washed, and finally incubated for 7 min in biotinyl tyramide 1:50 in amplification diluent (TSA indirect kit; NEN). Tyramide amplification is aimed at improving the signal-to-noise ratio for a sounder optical density analysis. Peroxidase activity was revealed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB; .05% in Tris buffer, pH 7.6) in the presence of hydrogen peroxide (.01%). Sections were washed in acetate buffer to stop the reaction. Negative immunohistological control demonstrated the absence of signal when omitting the first antibody. The sections were rinsed, post-fixed in .25% osmium tetroxide, and dehydrated in an ascending series of ethanol dilutions that also included 70% ethanol containing 1% uranyl acetate. They were treated with propylene oxide, impregnated in resin overnight (Durcupan ACM; Fluka, Buchs, Switzerland), mounted on glass slides, and cured at 60°C for 48 hours. Areas of interest (dorsolateral caudate-putamen) were cut out from the sections and glued to blank cylinders of resin. Ultrathin sections were collected on pioloform-coated single slot copper grids. The sections were stained with lead citrate and examined in Tecnai 20 electron microscopy (EM) (Philips, Eindhoven, The Netherlands).

Spine Counting

The number of D₁-positive and D₁-negative spines was performed on digital images obtained with a computer linked directly to a charge-coupled device (CCD) camera on the electron microscope at a final magnification of 2500–6000 with the Metamorph software (version 4.6r5, Universal Imaging, Paris, France). The measures were performed on two animals/group and on a minimum of 100 randomly selected dendritic fields (21,23). A dendritic field is defined as an area that does not contain a cell body. Indeed, given the difference in size between cell bodies and dendrites, the presence of a cell body in the randomly selected counting areas would imbalance the counting procedure. The results were expressed as the proportion of D₁-positive or D₁-negative dendritic profiles present in the caudate-putamen of each individual.

Statistical Analysis

Analysis of variance (ANOVA) with repeated measurements was first performed to include the factors “treatment” and “observation day” and the interaction between treatment and observation day as fixed and the factor “animal” was a random factor for the data of all experimental days 14–28. For the covariance matrix, a banded Toeplitz block diagonal structure with three bands was chosen. A closed testing procedure was applied to control the family-wise error rate at a level of 5%. When the *p* value for the main factor treatment in the two-factorial ANOVA was < .05, pair-wise comparisons were performed at the 5% level. The number of spines was compared within groups with a two-tailed paired *t* test and between groups with a two-tailed unpaired *t* test. The statistical evaluation was prepared with the software package SAS Version 8.2 (SAS

Institute, Cary, North Carolina) and S-PLUS 6.1 (Insightful, Seattle, Washington).

Results

Isradipine Treatment Reduces L-DOPA-Induced AIMs

A pilot experiment (Exp I in Figure 1) was performed at a therapeutically relevant dose of isradipine (.1 mg/kg/day). When animals were OFF L-DOPA, no difference was observed among the 6-OHDA-only, the 6-OHDA-placebo pellet, and the 6-OHDA-Isradipine pellet groups, suggesting isradipine exposure had no noticeable side effects. During the AIM rating sessions, the 6-OHDA-isradipine group developed less severe turning behavior than the two control groups, namely the 6-OHDA-only and the 6-OHDA-placebo pellet groups (Figures 2A and 2B). This result suggests that the hyperactivity component of the turning behavior was dampened in the isradipine-exposed animals. In keeping with this observation, isradipine treatment resulted in a significant reduction in overall AIM severity in comparison with both control groups (Figures 2C and 2D). Of interest is that, whereas AIM scores were reduced, the pharmacodynamic profile of L-DOPA was not altered (see time course of locomotor and AIM scores, Figures 2B and 2C). Further detailing the subtypes of AIMs, one can note that whereas both the axial (Figures 2E and 2F) and orolingual AIM subtypes (Figures 2I and 2J) are significantly reduced in the 6-OHDA-Isradipine pellet group in comparison with the two control groups, the severity of the limb AIM subtype is either not modified (vs. 6-OHDA group) or worsened (vs. 6-OHDA-placebo pellet group) (Figures 2G and 2H). This result suggests that antagonizing the Cav1.2-1.3 L-type Ca²⁺ channels would reduce only specific aspects of the AIMs.

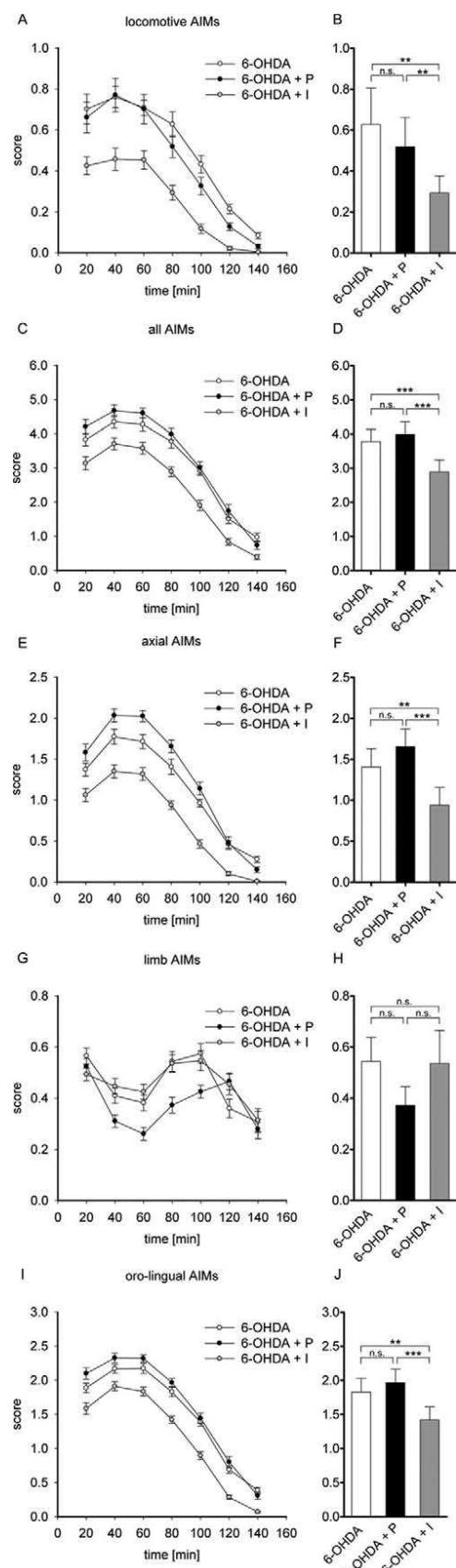
Nimodipine Treatment Reduces L-DOPA-Induced AIMs

Because other dihydropyridines also antagonize Cav1.2-1.3 L-type Ca²⁺ channels, we wondered whether nimodipine would achieve comparable effect upon AIMs (Exp II in Figure 1). A second pilot experiment was therefore performed at a therapeutically relevant dose of nimodipine also (.1 mg/kg/day) (Figure 3). Overall AIM severity was dampened in the nimodipine-exposed animals (Figures 3C and 3D). Despite a clear trend upon turning behavior (Figures 3A and 3B), no other subtype of AIMs showed a significant improvement (Figures 3E–3J).

Both isradipine and nimodipine antagonize the Cav1.2-1.3 L-type Ca²⁺ channels with a greater affinity for the Cav1.2 L-type Ca²⁺ channel (24,25), but isradipine would more potently antagonize the Cav1.3 L-type Ca²⁺ channels in the brain at the considered membrane potentials (26). Therefore, on the basis of the greater behavioral impact of isradipine (Figure 2) and the expected greater affinity for the Cav1.3 L-type Ca²⁺ channels shown to be responsible for spine-pruning in the DA-depleted brain (9), we selected isradipine for further investigations.

The Effect of Isradipine Treatment is Dose-Dependent

Five experimental groups were involved in a follow-up independent dose response study with three doses of isradipine (.05, .1, and .2 mg/kg/day; Exp III in Figure 1) to evaluate a possible dose-response effect. After 2 weeks of exposure, both .1- and .2-mg/kg/day doses of isradipine significantly reduced the scores for circular locomotion (Figures 4A and 4B and Supplement 2). The highest dose (.2 mg/kg/day) produced the strongest effect, whereas there was no difference between 6-OHDA-only and 6-OHDA-Placebo groups (Figures 4A and 4B and Supplement 2). These two control groups also showed similar overall AIMs scores (axial, limb, and orolingual dyskinesia).



sias) (Figures 4C and 4D and Supplement 2). The sum of AIM scores was significantly reduced by isradipine at the doses of .1 and .2 mg/kg/day in comparison with the two control groups (Figure 4C and Supplement 2) at all the monitoring periods after L-DOPA injection (Figure 4D and Supplement 2).

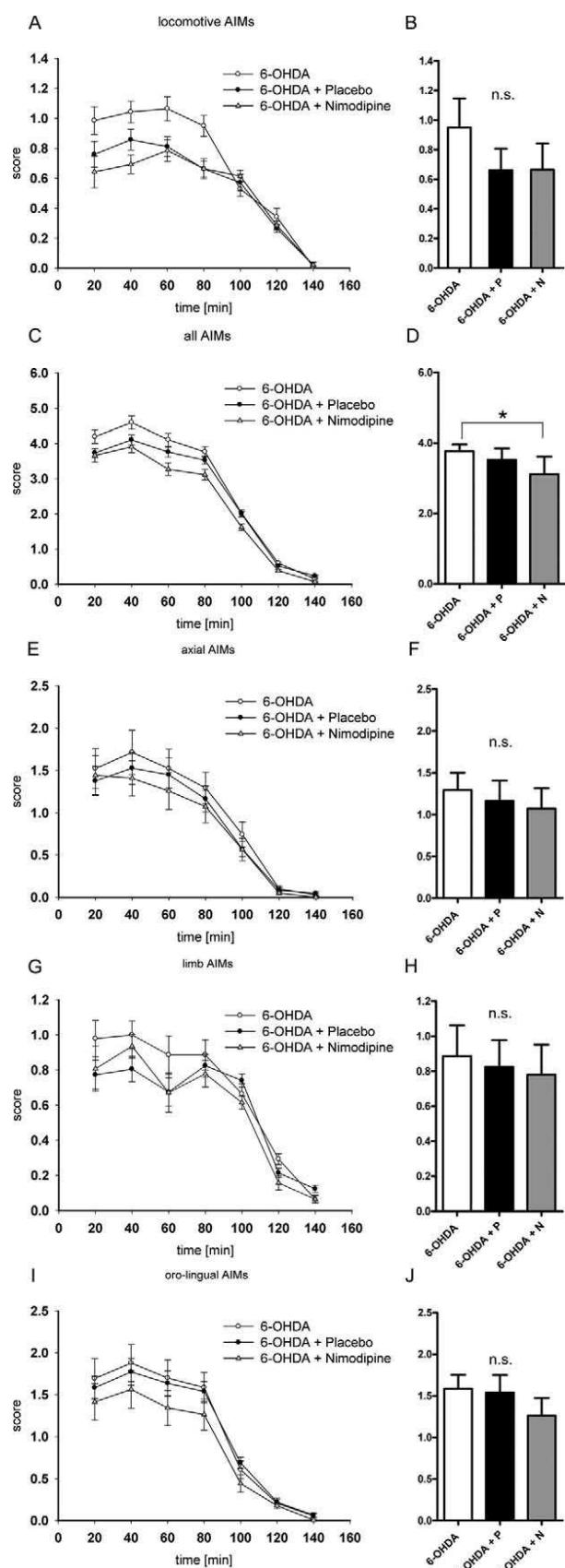
The lowest dose of isradipine was without effect on axial (Figures 4E and 4F and Supplement 2) and orolingual AIMs (Figures 4I and 4J and Supplement 2), but both .1- and .2-mg/kg/day doses dose-dependently improved both subtypes of AIMs (Figures 4E and 4F and 4I and 4J and Supplement 2). Whereas the axial and orolingual AIMs were improved, the limb AIM (Figures 4G and 4H and Supplement 2) scores were not improved, whatever the dose considered from 0 to 120 min. However, at late time points (140 min; Supplement 3), both .1- and .2-mg/kg/day doses improved the limb AIM scores.

To rule out that isradipine was working by decreasing the efficacy of L-DOPA, animals were challenged with apomorphine (.1 mg/kg apomorphine SC) before being killed. There was no difference between the control groups (6-OHDA and 6-OHDA-placebo pellet groups; 206.1 ± 44.6 , mean \pm SEM) and the 6-OHDA-Isradipine pellet groups (268.5 ± 38.6 ; unpaired two-tailed *t* test, *p* = .3) in number of apomorphine-induced turns. These data suggest that the reduction in L-DOPA/Benserazide-induced locomotive AIMs reflected a true anti-dyskinetic effect by dramatically reducing the hyperkinetic component of the response. Thus, isradipine does not interfere with the antiparkinsonian potency of dopaminergic therapy.

Isradipine Prevents Denervation-Induced Loss of D₁-Negative Spine

Because the hypothesis grounding these experiments was that antagonizing the Cav1.2-1.3 L-type Ca²⁺ would prevent the loss of striatopallidal MSN dendritic spines (9), we counted the D₁-negative and D₁-positive dendritic spines in both the placebo 6-OHDA and the .2 mg/kg/day-treated 6-OHDA rats of the dose-response experiment. The total number of dendritic spines/dendritic field was significantly decreased in the lesioned hemisphere of 6-OHDA-placebo pellet group (Figures 5A and 5B) as well as the number of D₁-negative dendritic spines (Figures 5A and 5B) compared with their unlesioned hemisphere. On the contrary, there was no decrease in the number of total or D₁-negative dendritic spines in the lesioned hemisphere from the 6-OHDA-.2-mg/kg Isradipine group compared with their unlesioned hemisphere (Figure 5). However, as per our working hypothesis, the number of D₁-negative dendritic spines in the

Figure 2. Effect of Isradipine (.1 mg/kg/day) upon turning behavior (A, B) and abnormal involuntary movements (AIMs) (C–J) in the 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-lesioned L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)/Benserazide primed ($n = 23$), 6-OHDA-lesioned L-DOPA/Benserazide primed Placebo pellet ($n = 23$), and 6-OHDA-lesioned L-DOPA/Benserazide primed Isradipine pellet ($n = 20$) rats at day 28 (see Figure 1). Cumulative AIM scores (C, D) were subdivided into axial (E, F), limb (G, H), and orolingual (I, J) subscores. Left panel shows the time-courses of behaviors monitored every 20 min over 140 min. Right panel highlight the peak values 80 min after administration of L-DOPA/Benserazide. Data are mean \pm SEM of day 15–28 (see Figure 1). **p* < .05, ***p* < .01, ****p* < .001. Treatment effect: turn [$F(2,60) = 7.72$, *p* = .001]; all AIMs [$F(2,60) = 12.25$, *p* < .0001]; axial [$F(2,60) = 12.15$, *p* < .0001]; limb [$F(2,60) = 3.25$, *p* = .045]; orolingual [$F(2,60) = 9.7$, *p* = .0002]. Observation day: turn [$F(13,780) = 2.36$, *p* = .004]; all AIMs [$F(13,780) = 2.43$, *p* = .003]; axial [$F(13,780) = 2.12$, *p* = .011]; limb [$F(13,780) = 1.20$, *p* = .27]; orolingual [$F(13,780) = 1.74$, *p* = .048]. Experiment: turn [$F(1,60) = 8.34$, *p* = .005]; all AIMs [$F(1,60) = 9.11$, *p* = .003]; axial [$F(1,60) = 2.65$, *p* = .10]; limb [$F(1,60) = 12.03$, *p* = .001]; orolingual [$F(1,60) = 2.52$, *p* = .12].



lesioned hemisphere of the 6-OHDA-.2-mg/kg Isradipine pellet group was significantly higher than in the lesioned hemisphere of 6-OHDA-placebo pellet group (Figure 5).

The number of D₁-positive spines seems lower, however, than the number of D₁-negative spines. Such an apparently lower density of D₁-positive spines is likely to be an artefact of the EM processing procedure, leading to poor labeling of some D₁-positive spines. Thus, the population of D₁-negative spines is actually a mix of D₁ and D₂ spines, and lesion-induced changes in this population underestimate the actual decrease in the density of D₂ spines.

Overall, these data suggest that isradipine treatment at .2 mg/kg/day prevented the denervation-induced loss of dendritic spine in striatopallidal MSNs, in agreement with the results of Day *et al.* (9). Taken together, the data thus far show that, when isradipine treatment starts concomitantly with the neurotoxic insult to nigral DA neurons, it both prevents dendritic spine loss in the striatum and dampens the severity of AIMs, once the animals are exposed to L-DOPA.

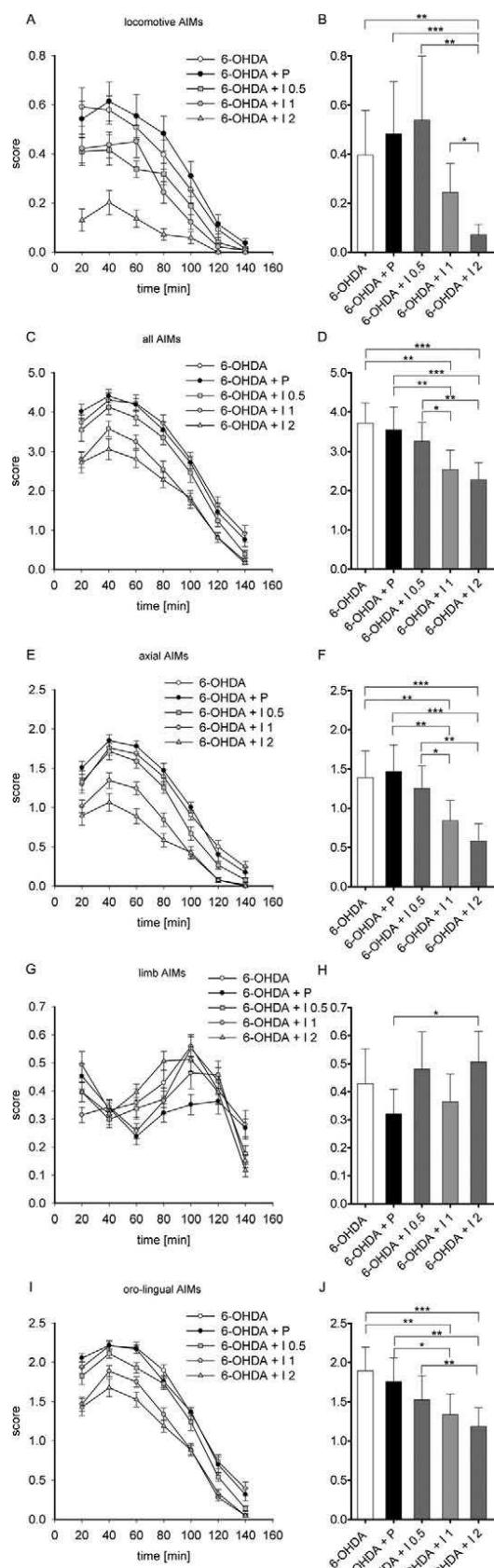
PPE-A Messenger RNA Expression Is Normalized by Isradipine Exposure

Isradipine exposure prevents denervation-induced loss of D₁-negative spines of the MSNs that most likely belong to the striatopallidal pathway. One can wonder how such preservation of spine loss on striatopallidal neurons affects their activity. The PPE-A messenger RNA (mRNA) expression is well known to be robustly increased after dopamine depletion, further increased in dyskinesia, and normalized by anti-dyskinetic treatment affecting the striatopallidal pathway (27,28). Accordingly, PPE-A mRNA expression [Figures 5C; $F(2,29) = 25.51, p < .001$] in the lesioned hemisphere of the 6-OHDA-placebo pellet group ($131.5 \pm 3.4\%$, mean \pm SEM) was significantly increased compared with the unlesioned hemisphere ($p < .001$). Its expression was significantly decreased in lesioned hemisphere of the 6-OHDA-Isradipine pellet group ($109.6 \pm 3.6\%$) compared with the lesioned hemisphere of the 6-OHDA-placebo pellet group ($p < .001$) but not any more compared with the unlesioned hemispheres (Figure 5C). Those data clearly show that preventing dendritic spine loss of the striatopallidal pathway normalizes the increased PPE-A mRNA expression associated with dyskinesia.

Post-Lesional Implant of Isradipine

We next investigated the effects of isradipine treatment starting 7 weeks after the 6-OHDA lesion rather than soon afterward (Exp IV in Figure 1). At this point in time, the loss of connectivity

Figure 3. Effect of Nimodipine (.1 mg/kg/day) upon turning behavior (A, B) and AIMs (C–J) in the 6-OHDA-lesioned L-DOPA/Benserazide primed ($n = 10$), 6-OHDA-lesioned L-DOPA/Benserazide primed Placebo pellet ($n = 11$), and 6-OHDA-lesioned L-DOPA/Benserazide primed Nimodipine pellet ($n = 10$) rats. Cumulative AIM scores (C, D) were subdivided into axial (E, F), limb (G, H), and orolingual (I, J) subscores. Left panel shows the time-courses of behaviors monitored every 20 min over 140 min. Right panel highlights the peak values 80 min after administration of L-DOPA/Benserazide. Data are mean \pm SEM of day 1–14. * $p < .05$. Treatment effect: turn [$F(2,28) = 2.54, p = .0973$]; all AIMs [$F(2,28) = 2.8, p = .0777$]; axial [$F(2,28) = .81, p = .4544$]; limb [$F(2,28) = .38, p = .6842$]; orolingual [$F(2,28) = 2.39, p = .1098$]. Observation day: turn [$F(13,364) = 3.10, p = .0002$]; all AIMs [$F(13,364) = 6.8, p < .0001$]; axial [$F(13,364) = 7.41, p < .0001$]; limb [$F(13,364) = 5.36, p < .0001$]; orolingual [$F(13,364) = 7.84, p < .0001$]. Interaction of treatment and observation day: turn [$F(26,364) = .47, p = .9889$]; all AIMs [$F(26,364) = .81, p = .7377$]; axial [$F(26,364) = .86, p = .6633$]; limb [$F(26,364) = .82, p = .7223$]; orolingual [$F(26,364) = .93, p = .5694$]. Abbreviations as in Figure 2.



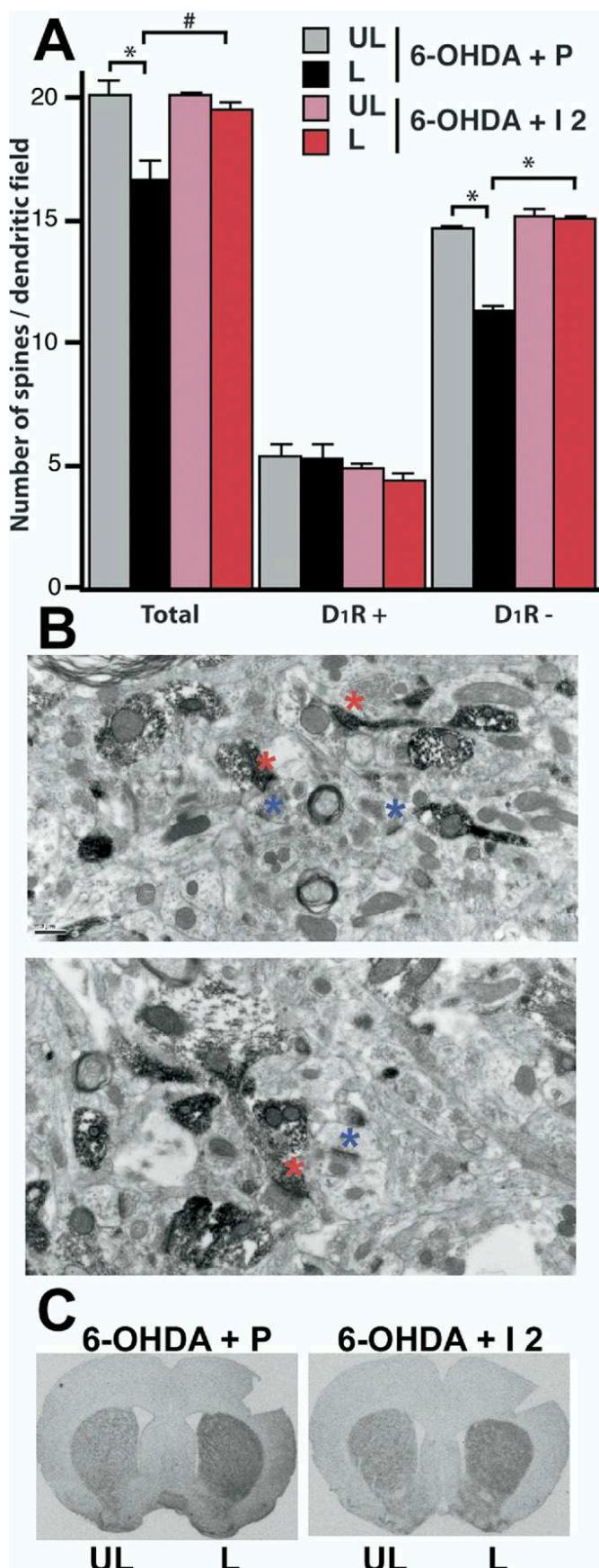
in D₂ MSNs is complete (9). After implanting pellets releasing the highest dose of isradipine studied (.2 mg/kg/day), L-DOPA treatment was started. In this paradigm, neither turning behavior nor the AIM scores (Figure 6) were affected by isradipine treatment.

Discussion

The present study shows that treatment with isradipine dose-dependently attenuates L-DOPA-induced rotational locomotion and AIM scores, provided that the exposure to isradipine starts soon after a 6-OHDA lesion of the nigrostriatal fiber bundle. Dendritic spine counting at the EM level showed that this treatment (isradipine, .2 mg/kg/day) prevented the 6-OHDA-induced spine loss in D₁-negative MSNs and normalized PPE-A mRNA expression. In contrast, isradipine had no effect on L-DOPA-induced dyskinesia when it was given a few weeks after lesion (i.e., after the spine-pruning has already occurred). In addition, these results strongly suggest that isradipine, at a therapeutically relevant dose, might have a useful role in early PD as a strategy to prevent the occurrence of dyskinesia.

Chronic treatment with isradipine starting concomitantly with 6-OHDA intoxication reduced the severity of rotational behavior ("locomotive AIMs") and axial, limb, and orolingual AIMs (Figures 2 and 4, Supplements 2 and 3) during a chronic course of L-DOPA administration (Supplement 2). Not only did isradipine-treated rats show normal levels of motor activity in the observation area, but their final response to an apomorphine challenge was comparable to control subjects, suggesting that the reduction in L-DOPA-induced turning behavior (Figures 2A and 4A) was not associated with a decreased response to DA replacement. The fact that the animals still displayed limb AIMs (Figures 2G and 4G) suggests, however, that the sensitized response to L-DOPA was maintained in specific basal ganglia subnetworks. In contrast, when isradipine pellets were implanted at a later post-lesion time (i.e., when dendritic spine-pruning had already taken place) (9), neither the L-DOPA/Benserazide-induced rotations nor any of the AIM subtypes were improved. Such an observation strongly suggests that: 1) prevention of dendritic spine loss is crucial to the antidyokinetic effects of isradipine exposure, and 2) the combination of L-DOPA and isradipine

Figure 4. Effect of Isradipine (.05; .1 and .2 mg/kg/day) upon turning behavior (**A, B**) and AIMs (**C–J**) in the 6-OHDA-lesioned L-DOPA/Benserazide primed ($n = 11$), 6-OHDA-lesioned L-DOPA/Benserazide primed Placebo pellet ($n = 12$), 6-OHDA-lesioned L-DOPA/Benserazide primed + Isradipine pellet (.05 mg/kg/day) ($n = 11$), 6-OHDA-lesioned L-DOPA/Benserazide primed + Isradipine pellet (.1 mg/kg/day) ($n = 10$), and 6-OHDA-lesioned L-DOPA/Benserazide primed + Isradipine pellet (.2 mg/kg/day) ($n = 11$) rats at day 28 (see Figure 1). Cumulative AIM scores (**C, D**) were subdivided into axial (**E, F**), limb (**G, H**), and orolingual (**I, J**) subscores. Left panel shows the time-courses of behaviors monitored every 20 min over 140 min. Right panel highlights the peak values 80 min after administration of L-DOPA/Benserazide. Data are mean \pm SEM of day 15–28 (see Figure 1). * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$. Treatment effect: turn [$F(4,50) = 7.77$, $p < .0001$]; all AIMs [$F(4,50) = 7.7$, $p < .0001$]; axial [$F(4,50) = 8.59$, $p < .0001$]; limb [$F(4,50) = 1.39$, $p = .2523$]; orolingual [$F(4,50) = 5.19$, $p = .001$]. Observation day: turn [$F(13,650) = 1.55$, $p = .09$]; all AIMs [$F(13,650) = 1.25$, $p = .24$]; axial [$F(13,650) = 1.42$, $p = .14$]; limb [$F(13,650) = .94$, $p = .51$]; orolingual [$F(13,650) = 1.25$, $p = .24$]. Interaction effect: turn [$F(52,650) = 1.12$, $p = .27$]; all AIMs [$F(52,650) = 1.09$, $p = .31$]; axial [$F(52,650) = 1.14$, $p = .23$]; limb [$F(52,650) = 1.12$, $p = .26$]; orolingual [$F(52,650) = 1.05$, $p = .39$]. Abbreviations as in Figure 2.

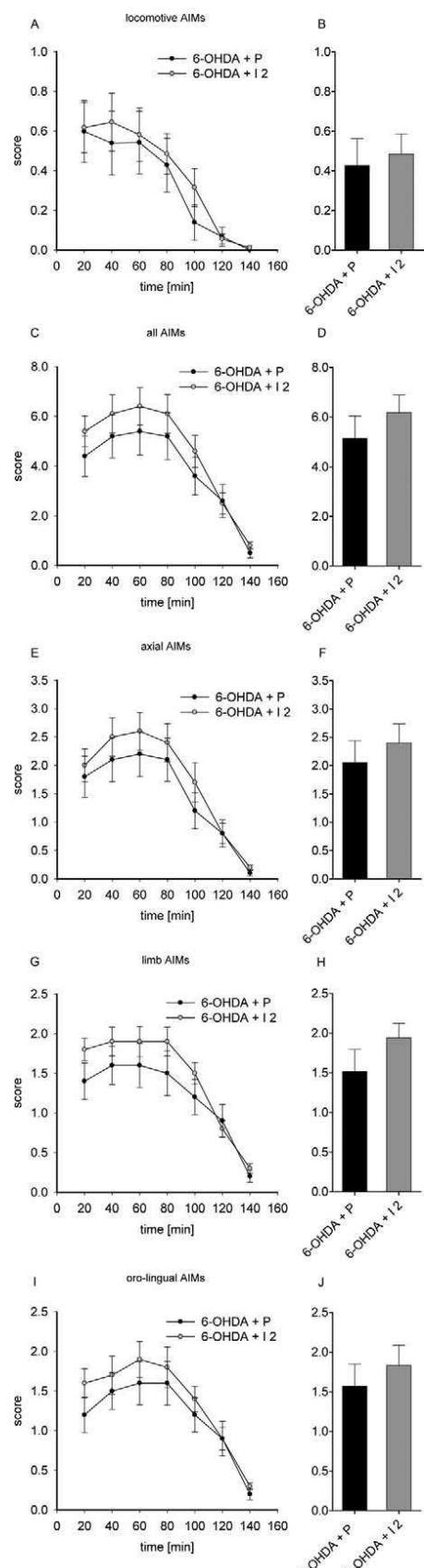


treatment is unable to rescue already lost spines and synapses in the DA-denervated striatum. This interpretation is supported by the finding that the .2-mg/kg/day isradipine dose was able to prevent the loss of D₁-negative dendritic spines, establishing a direct link between the prevention of denervation-induced spine-pruning—which occurs in D₂-positive neurons (9)—and the reduction in L-DOPA-induced AIMs. Further supporting this hypothesis is the observation that in the same .2-mg/kg/day isradipine group, PPE-A mRNA expression was normalized and significantly lower than in the placebo-treated animals, suggesting that the prevention of spine loss is accompanied by a normalization of the striatopallidal pathway activity.

One should be cautious with the interpretation, although tantalizing, of a direct link between prevention of spine loss and dyskinesia improvement. Indeed, normalizing the number of spines does not automatically mean that the spines or the synapses are working as in the physiological situation. The cortico-striatal connections upon D₂ MSNs would thus not be appropriate and might be functionally equivalent to the loss of spine/synapses. Furthermore, there are other adaptations in MSNs that might be unrelated to the loss of synapses. Indeed, the excitability of D₂ MSNs is elevated after DA depletion (5,29). This adaptation of excitability in parallel with the loss of connectivity could be intimately linked to the development of dyskinesias treatment and might not be reversible even if the loss of connectivity per se is, possibly explaining the persistence of some dyskinetic manifestations.

An alternative and dyskinesia-unrelated role for spine loss after DA depletion could be adaptive and might prevent degeneration of striatal neurons from a sustained/excessive glutamatergic input in the absence of endogenous dopaminergic control of the excitatory transmission. There is no doubt that the spine loss response is adaptive—because preventing the elevation in dendritic excitability significantly reduces spine loss (8,29)—and that stereological counting of NeuN-positive neurons in the striatum of 6-OHDA rats show no reduction in the number of neurons due to either lesion or L-DOPA (30). However, preventing this adaptive response with dihydropyridine treatment does not seem to induce frank cell loss on the basis of estimates of the density of D₂-expressing MSNs in isradipine-treated mice after 6-OHDA lesioning (D.J. Surmeier, unpublished observations). The most straightforward interpretation of this finding is that Ca²⁺ entry through L-type channels is necessary for neurodegeneration. This is consistent with a large literature on the role of Ca²⁺ in other forms of neurodegeneration (31). This question is actively being pursued but is beyond the scope of this publication.

Figure 5. Effect of Isradipine (.2 mg/kg/day) upon dendritic spine (**A**, **B**) and preproenkephalin-A (PPE-A) messenger RNA (mRNA) expression (**B**). (**A**) Effect of Isradipine (.2 mg/kg/day) upon: 1) total number of dendritic spines/dendritic field, 2) number of D_{1R}-positive (D_{1R}+) dendritic spines/dendritic field, and 3) number of D_{1R}-negative (D_{1R}-) dendritic spines/dendritic field in 6-OHDA-lesioned L-DOPA/Benserazide primed Placebo pellet (*n* = 2) and 6-OHDA-lesioned L-DOPA/Benserazide primed Isradipine pellet (*n* = 2) rats. Data are mean ± SEM. **p* < .05; #*p* = .06. (**B**) Electron microscope photographs show examples of D_{1R}-immunopositive (red stars) and D_{1R}-immuno-negative (blue stars) asymmetrical synapses in the dorsal caudate-putamen. Scale bar = .5 μm. (**C**) Representative examples of PPE-A mRNA in situ hybridization in 6-OHDA-lesioned L-DOPA/Benserazide primed Placebo pellet (*n* = 10) and 6-OHDA-lesioned L-DOPA/Benserazide primed Isradipine pellet rats (*n* = 10). The cut on the upper right cortex was made to identify the right hemisphere during section processing. UL, unlesioned; L, lesioned; other abbreviations as in Figure 2.



The magnitude of AIM improvement by isradipine was pronounced, because the summed axial, limb, and orolingual AIMs scores were reduced by approximately 50% at the highest dose tested (.2 mg/kg/day). Whereas both the axial and orolingual AIMs were significantly decreased, limb AIM scores were not affected (Figures 2G and 4G), although some reduction was seen at late time points after L-DOPA administration (see Supplement 3). The AIM limb subtype resembles a hyperkinetic choreiform-like class of abnormal movements (13,32). Interestingly, choreic-like dyskinesia are thought to generally involve overactivity of the direct striatal output pathway, whereas dyskinesia characterised by dystonia have been tentatively attributed to an involvement of the motor components of the indirect striatal output pathway (27,33). Because the principal effect of isradipine treatment seems to be on indirect pathway striatopallidal MSNs (Figure 5), this dissociation of effects is not particularly surprising.

These data further support the concept of a differential involvement of indirect and direct pathways in mediating dystonic-like and choreic-like AIMs, respectively. The striatonigral and the striatopallidal neurons receive massive differential cortical excitatory inputs from bilateral intra-telencephalic (IT) neurons projecting to both striatum and from collateral axons of ipsilateral neurons that send their main axon through the pyramidal tract, respectively (34). The IT neuron firing activity is decreased after 6-OHDA lesion of the medial forebrain bundle, whereas the firing frequency of the pyramidal tract neurons is not affected (5). The combination of corticostriatal pruning and elevated postsynaptic excitability (5,29) could result in inappropriately timed and patterned spiking in D₂ MSNs that underlies dystonic symptoms.

Conclusions

Altogether, the present study demonstrates that AIM manifestations, mainly of dystonic type, can be improved by treatment with isradipine as started early after the nigrostriatal DA lesion. Further studies are needed, however, to dissect out the exact mechanism by which dihydropyridine exposure can normalize cortico-basal ganglionic networks in such a way as to prevent the emergence of L-DOPA-induced dyskinesia as well as the other aspects of the adaptation to DA depletion. Isradipine is a widely prescribed drug that it is well-tolerated even upon long-term treatment, provided that the dose is carefully chosen. Thus, our data suggest that early treatment with isradipine and possibly other Cav1.2-1.3 L-type Ca²⁺ channel-antagonists could be useful to prevent L-DOPA-induced dyskinesia in PD patients.

Figure 6. Effect of post-lesional implant of Isradipine (.2 mg/kg/day) upon turning behavior (**A, B**) and AIMs (**C–J**) in 6-OHDA-lesioned L-DOPA/Benserazide primed Placebo pellet ($n = 10$) and 6-OHDA-lesioned L-DOPA/Benserazide primed Isradipine pellet ($n = 10$) rats at day 70 (see Figure 1). Cumulative AIM scores (**C, D**) were subdivided into axial (**E, F**), limb (**G, H**), and orolingual (**I, J**) subscores. Left panel shows the time-courses of behaviors monitored every 20 min over 140 min. Right panel highlights the peak values 80 min after administration of L-DOPA/Benserazide. Data are mean \pm SEM of day 57–70 (see Figure 1). Treatment effect: turn [$F(1,144) = .08, p = .77$]; all AIMs [$F(1,144) = 1.12, p = .30$]; axial [$F(1,144) = .72, p = .41$]; limb [$F(1,144) = 1.65, p = .21$]; orolingual [$F(1,144) = .93, p = .34$]. Observation day: turn [$F(8,144) = 3.99, p = .0003$]; all AIMs [$F(8,144) = 2.66, p = .009$]; axial [$F(8,144) = 4.1 p = .0002$]; limb [$F(8,144) = 1.79 p = .08$]; orolingual [$F(8,144) = 2.18, p = .032$]. Interaction effect: turn [$F(8,144) = 1.24 p = .28$]; all AIMs [$F(8,144) = .35, p = .94$]; axial [$F(8,144) = .49 p = .86$]; limb [$F(8,144) = .31, p = .96$]; orolingual [$F(8,144) = .39, p = .92$]. Abbreviations as in Figure 2.

The authors report no biomedical financial interests or potential conflicts of interest.

Supplementary material cited in this article is available online.

1. Ehringer H, Hornykiewicz O (1960): Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems. *Klin Wochenschr* 38:1236–1239.
2. Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R (1969): Modification of Parkinsonism—chronic treatment with L-dopa. *N Engl J Med* 280:337–345.
3. 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.
4. Albin RL, Young AB, Penney JB (1995): The functional anatomy of disorders of the basal ganglia. *Trends Neurosci* 18:63–64.
5. Mallet N, Ballion B, Le Moine C, Gonon F (2006): Cortical inputs and GABA interneurons imbalance projection neurons in the striatum of parkinsonian rats. *J Neurosci* 26:3875–3884.
6. Arbuthnott GW, Ingham CA, Wickens JR (1998): Modulation by dopamine of rat corticostriatal input. *Adv Pharmacol* 42:733–736.
7. Ingham CA, Hood SH, Taggart P, Arbuthnott GW (1998): Plasticity of synapses in the rat neostriatum after unilateral lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathway. *J Neurosci* 18: 4732–4743.
8. Neely MD, Schmidt DE, Deutch AY (2007): Cortical regulation of dopamine depletion-induced dendritic spine loss in striatal medium spiny neurons. *Neuroscience* 149:457–464.
9. Day M, Wang Z, Ding J, An X, Ingham CA, Shering AF, et al. (2006): Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nat Neurosci* 9:251–259.
10. Meissner W, Ravenscroft P, Reese R, Harnack D, Morgenstern R, Kupsch A, et al. (2006): Increased slow oscillatory activity in substantia nigra pars reticulata triggers abnormal involuntary movements in the 6-OHDA-lesioned rat in the presence of excessive extracellular striatal dopamine. *Neurobiol Dis* 22:586–598.
11. Paxinos G, Watson C (1986): The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego: Academic Press.
12. 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.
13. Lundblad M, Andersson M, Winkler C, Kirik D, Wierup N, Cenci MA (2002): Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 15:120–132.
14. Cenci MA, Lundblad M (2007): Ratings of L-DOPA-induced dyskinesia in the unilateral 6-OHDA lesion model of Parkinson's disease in rats and mice. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 9:Unit 9.25.
15. Dumartin B, Jaber M, Gonon F, Caron MG, Giros B, Bloch B (2000): Dopamine tone regulates D1 receptor trafficking and delivery in striatal neurons in dopamine transporter-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:1879–1884.
16. Bezard E, Dovero S, Prunier C, Ravenscroft P, Chalon S, Guilloteau D, et al. (2001): Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydrodpyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 21:6853–6861.
17. Guigoni C, Li Q, Aubert I, Dovero S, Bioulac BH, Bloch B, et al. (2005): Involvement of sensorimotor, limbic, and associative basal ganglia domains in L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia. *J Neurosci* 25:2102–2107.
18. Aubert I, Guigoni C, Li Q, Dovero S, Bioulac BH, Gross CE, et al. (2007): Enhanced preproenkephalin-B-derived opioid transmission in striatum and subthalamic nucleus converges upon globus pallidus internalis in L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia. *Biol Psychiatry* 61:836–844.
19. Yoshikawa K, Williams C, Sabol SL (1984): Rat brain preproenkephalin mRNA. cDNA cloning, primary structure, and distribution in the central nervous system. *J Biol Chem* 259:14301–14308.
20. Dumartin B, Caillé I, Gonon F, Bloch B (1998): Internalization of D1 dopamine receptor in striatal neurons in vivo as evidence of activation by dopamine agonists. *J Neurosci* 18:1650–1661.
21. Guigoni C, Doudnikoff E, Li Q, Bloch B, Bezard E (2007): Altered D1 dopamine receptor trafficking in parkinsonian and dyskinetic non-human primates. *Neurobiol Dis* 26:452–463.
22. Levey AI, Hersch SM, Rye DB, Sunahara RK, Niznik HB, Kitt CA, et al. (1993): Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8861–8865.
23. Scholz B, Svensson M, Alm H, Sköld K, Fält M, Kultima K, et al. (2008): Striatal proteomic analysis suggests that first L-dopa dose equates to chronic exposure. *PLoS ONE* 3:e1589.
24. Koschak A, Reimer D, Huber I, Grabner M, Glossmann H, Engel J, Striessnig J (2001): alpha 1D (Cav1.3) subunits can form I-type Ca^{2+} channels activating at negative voltages. *J Biol Chem* 276:22100–22106.
25. Xu W, Lipscombe D (2001): Neuronal Ca(V)1.3alpha(1) L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. *J Neurosci* 21:5944–5951.
26. Surmeier DJ (2007): Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 6:933–938.
27. Bezard E, Brotchie JM, Gross CE (2001): Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: Potential for new therapies. *Nat Rev Neurosci* 2:577–588.
28. Cenci MA (2007): Dopamine dysregulation of movement control in L-DOPA-induced dyskinesia. *Trends Neurosci* 30:236–243.
29. Shen W, Tian X, Day M, Ulrich S, Tkatch T, Nathanson NM, et al. (2007): Cholinergic modulation of Kir2 channels selectively elevates dendritic excitability in striatopallidal neurons. *Nat Neurosci* 10:1458–1466.
30. Lindgren HS, Rylander D, Ohlin KE, Lundblad M, Cenci MA (2007): The “motor complication syndrome” in rats with 6-OHDA lesions treated chronically with L-DOPA: Relation to dose and route of administration. *Behav Brain Res* 177:150–159.
31. Mattson MP (2007): Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell* 6:337–350.
32. Cenci MA, Whishaw IQ, Schallert T (2002): Animal models of neurological deficits: How relevant is the rat? *Nat Rev Neurosci* 3:574–579.
33. Mitchell IJ, Boyce S, Sambrook MA, Crossman AR (1992): A 2-deoxyglucose study of the effects of dopamine agonists on the parkinsonian primate brain. Implications for the neural mechanisms that mediate dopamine agonist-induced dyskinesia. *Brain* 115:809–824.
34. Lei W, Jiao Y, Del MN, Reiner A (2004): Evidence for differential cortical input to direct pathway versus indirect pathway striatal projection neurons in rats. *J Neurosci* 24:8289–8299.

V.B.) Article annexe 2

Double-dissociation of the catecholaminergic modulation of synaptic transmission in the oval bed nucleus of the stria terminalis

Michal Krawczyk, François Georges, Robyn Sharma, Xenos Mason, Amandine Berthet, Erwan Bézard, and Éric C. Dumont

Journal of Neurophysiology. sous presse. 3 nov 2010

[doi:10.1152/jn.00710.2010](https://doi.org/10.1152/jn.00710.2010)

Double-dissociation of the catecholaminergic modulation of synaptic transmission in the oval bed nucleus of the stria terminalis

Michał Krawczyk^{1,2}, François Georges^{3,5}, Robyn Sharma^{1,2}, Xenos Mason^{1,2}, Amandine Berthet^{4,5}, Erwan Bézard^{4,5}, and Éric C. Dumont^{1,2}

¹Department of Anesthesiology and Perioperative Medicine ; ²Center for Neuroscience Studies, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada, K7L 3N6 ; ³INSERM, U862, Neurocentre Magendie ; ⁴Centre National de la Recherche Scientifique, Bordeaux Institute of Neuroscience, UMR 5227, ⁵Université de Bordeaux, Bordeaux, F-33000, France

Abbreviated title: Regulation of synaptic transmission in the oval bed nucleus of the stria terminalis

Key Words: Dopamine, noradrenaline, GABA_A, AMPA, excitatory synaptic transmission, inhibitory synaptic transmission, oval bed nucleus of the stria terminalis, patch-clamp, brain slices

Correspondence: Éric C. Dumont – eric.dumont@queensu.ca

Acknowledgements: This project was supported by a Canadian Institutes of Health Research operating grant (MOP-79277), The J.P. Bickell Foundation, and Queen's University.

Abstract

The bed nucleus of the stria terminalis (BST) is a cluster of nuclei within the extended amygdala, a forebrain macrostructure with extensive projection to motor nuclei of the hindbrain. The subnuclei of the BST coordinate autonomic, neuroendocrine and somato-motor functions and receive robust neuromodulatory monoaminergic afferents, including 5-HT, noradrenaline (NA), and dopamine (DA)-containing terminals. In contrast to 5-HT and NA, little is known about how DA modulates neuronal activity or synaptic transmission in the BST. DA-containing afferents to the BST originate in the ventral tegmental area, the periaqueductal gray, and the retrorubral field. They form a fairly diffuse input to the dorsolateral BST with dense terminal fields in the oval (ovBST) and juxtacapsular (jxBST) nuclei. The efferent-afferent connectivity of the BST suggests that it may play a key role in motivated behaviours, consistent with recent evidence that the ovBST is a target for drugs of abuse. This study describes the effects of DA on synaptic transmission in the ovBST. Whole-cell voltage clamp recordings were performed on ovBST neurons in brain slices from adult rats in the presence or absence of exogenous DA and receptor-targeted agonists and antagonists. The results showed that DA selectively and exclusively reduced inhibitory synaptic transmission in the ovBST in a dose-dependent and D2-like dopamine receptor-dependent manner. DA also modulated excitatory synaptic transmission in a dose-dependent dependent manner. However, this effect was mediated by α 2-noradrenergic receptors. Thus, these data reveal a double-dissociation in catecholaminergic regulation of excitatory and inhibitory synaptic transmission in the ovBST, and may shed light on the mechanisms involved in neuropathological behaviours such as stress-induced relapse to consumption of drugs of abuse.

Introduction

The bed nucleus of the stria terminalis receives adrenergic, noradrenergic, serotonergic, and dopaminergic inputs (Freedman and Cassell 1994; Hasue and Shammah-Lagnado 2002; Meloni et al. 2006; Phelix et al. 1992). The distribution of axons immunoreactive for tyrosine hydroxylase (TH), DA- β -hydroxylase (D β H), phenylethanolamine-N-methyl transferase (PNMT) or 5-HT reveals that monoaminergic inputs to the BST are topographically organized with both overlapping and exclusive distributions, depending on specific BST subregions (Phelix et al. 1992).

5-HT immunoreactive terminals are broadly distributed rostrocaudally but mostly dorsal to the anterior commissure in the BST (Phelix et al. 1992). However, 5-HT immunoreactivity is more robust in the medial than the lateral parts of the BST and largely avoids the oval (ovBST) and juxtagapsular (jxBST), which are located dorsolaterally (Larriva-Sahd 2006; 2004; Phelix et al. 1992). 5-HT modulates neuronal activity and reduces excitatory synaptic transmission in the BST (Guo et al. 2009; Guo and Rainnie 2010; Hammack et al. 2009; Levita et al. 2004). The specific effects of 5-HT on BST neurons activity is dynamically modulated by, and causally related to, stress and anxiety (Hammack et al. 2009; Levita et al. 2004).

D β H (NA and/or adrenaline)-containing fibers are mostly concentrated in the ventrolateral BST although there is D β H immunoreactivity medially in the dorsal BST (Freedman and Cassell 1994; Kozicz 2001; Phelix et al. 1992). Although rare, adrenergic terminals are present in the dorsolateral region of the intermediate (from a rostro-caudal perspective) regions of the BST (Phelix et al. 1992). NA also modulates both neuronal excitability and synaptic transmission in the ventral and dorsal BST (Dumont and Williams 2004; Egli et al. 2005; McElligott et al. 2010; McElligott and Winder 2008; 2009; Shields et al. 2009). Noradrenergic modulation of BST neuron excitability and synaptic transmission is also dynamically altered by various physiological and pathological conditions (Dumont and Williams 2004; McElligott et al. 2010; McElligott and Winder 2008; 2009) including stress, anxiety, pain, reward, and addiction (Cecchi et al. 2002; Delfs et al. 2000; Deyama et al. 2009; Deyama et al. 2008; Dumont and Williams 2004; Leri et al. 2002).

In contrast to 5-HT and NA, little is known about the neurophysiology of DA in the BST (Kash et al. 2008). Although dopaminergic fibers form a fairly diffuse input to the dorsolateral BST, dense terminal fields can be observed in the ovBST and jxBST (Deutch et al. 1988; Freedman and Cassell 1994; Hasue and Shammah-Lagnado 2002; Meloni et al. 2006; Phelix et al. 1992). These dopaminergic inputs originate, in order of importance, from the ventral tegmental area, the periaqueductal grey region, and the retrorubral field (Hasue and Shammah-Lagnado 2002). A recent study on dopaminergic regulation of neuronal activity and synaptic transmission in the dorsolateral BST in the mouse (Kash et al. 2008) reported that DA produced a modest increase in spontaneous excitatory, but not inhibitory, synaptic transmission, an effect that was attributed to

a D1/D2-like mediated depolarization of local CRFergic neurons. However, Kash *et al.* did not specify the subregion of the dorsolateral BST examined in their study.

In addition to TH-positive axons, the ovBST contains several key components of the brain DA system including DA receptors (although the exact subtypes remains unclear) and DARPP-32, suggesting that DA may be an important neuromodulator of neuronal activity, synaptic transmission, or both, in this region (Freedman and Cassell 1994; Gustafson and Greengard 1990; Hasue and Shammah-Lagnado 2002; Meloni *et al.* 2006). The presence of multiple DA inputs as well as the connectivity of the ovBST is consistent with a role in motivated behaviours (Dong *et al.* 2001a; Dong *et al.* 2001b; Larriva-Sahd 2006; McDonald *et al.* 1999). In fact, pharmacological manipulation of DA receptors in the dorsolateral BST alters natural and pharmacological rewards-motivated behaviours (Eiler *et al.* 2003; Epping-Jordan *et al.* 1998). Furthermore, the dorsolateral BST is ideally located to integrate stress and reward information and consequently, consistent with its reported role in stress-induced relapse to chronic voluntary drug intake in animal models of drug addiction (Erb *et al.* 2001; Leri *et al.* 2002). Because DA (reward) and NA (stress) response pathways co-localize in the dorsolateral BST, interaction between the DA and NA in this brain region might play a critical role in integrating stress- and reward-induced behaviours.

The objective of the present study was to elucidate the neuromodulatory effects of DA on synaptic transmission in the ovBST. Whole-cell voltage clamp recordings were done on ovBST neurons in brain slices from adult rats in the presence and absence of exogenous DA and selective receptor-targeted agonists and antagonists. DA reduced the amplitude of evoked GABA_A-inhibitory post-synaptic currents (IPSC) pre-synaptically in a dose-dependent and D2 dopamine receptors (D2R)-dependent manner. In contrast, the effect of DA on excitatory transmission was absolutely dependent on functional α2-adrenergic receptors (α2R), a mechanism that overlapped substantially with the neuromodulatory mechanism of NA. DA did not produce measurable effects on passive neurophysiological properties of ovBST also suggesting pre-synaptic effects of DA. Immunohistochemical studies confirmed that D2R but not D1R are expressed in the ovBST. Together, our results demonstrate how DA modulates synaptic transmission in the ovBST, an important step in understanding the role of ovBST DA-mediated

in motivated behaviour. Furthermore, the effect of DA on synaptic transmission in the ovBST could be dissociated from those of NA, revealing synaptic mechanisms that could help integrate stress- (NA) and reward- (DA) related stimuli in the ovBST. Finally, these data suggest that interactions between stress and reward neuromodulatory pathways may play a role in pathological behaviours, such as stress-induced relapse to consumption of drugs of abuse.

Methods

Subjects. Adult male Long Evans and Sprague-Dawley rats (Charles River Laboratories, Inc., www.criver.com) weighing 300-650g, were housed in a climate-controlled colony room. The animals were maintained on a 12 hr reversed light/dark cycle (09.00h lights off – 21.00h lights on) and fed *ad libitum*. All the experiments were conducted in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines for use of animals in experiments and approved by the Queen's University Animal Care Committee or the French (87-848, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt) and European Economic Community (86-6091 EEC) guidelines for the care of laboratory animals and were approved by the Ethical Committee of Centre National de la Recherche Scientifique, Région Aquitaine.

Brain slices preparation and electrophysiology. Rats were anesthetized with isoflurane and their brains were rapidly removed. Coronal slices (250 µm) containing the BST were prepared in ice-cold physiological solution containing (in mM) 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.2 MgCl₂, 6 CaCl₂, 1.2 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃ and, 12.5 D-glucose. Slices were incubated at 34°C for 60 minutes and transferred to a chamber that was constantly perfused (1.5ml/min) with physiological solution maintained at 34°C and equilibrated with 95%O₂/5%CO₂. Whole-cell voltage-clamp recordings were made using microelectrodes filled with a solution containing (in mM) 70 K⁺-gluconate, 80 KCl, 1 EGTA, 10 HEPES, 2 MgATP, 0.3 GTP, and 1 P-creatine.

All recordings were restricted to the ovBST, and more precisely, to the dorsal half of the ovBST (Figure 1a). The exact anteroposterior coordinates representing the brain slice used varies slightly from one Brain Atlas to the other (-0.26mm and -0.12mm in Swanson and Paxinos and Watson, respectively, Figure 1a). In practice, we used the slices where the posterior part of the anterior commissure (ac) decussates but where the lateral extension of the ac are still present. Recordings were restricted medially to an imaginary vertical line that would run through the

lateral ventricule. In addition, recordings were restricted to the area of the dorsolateral BST located dorsal to the halfway point between the tip of the lateral ventricle and the top of ac (Figure 1a). Post-synaptic currents were evoked by local fiber stimulation with tungsten bipolar electrodes while ovBST neurons where voltage-clamped at -70mV. Stimulating electrodes were placed in the ovBST, 100-500 μ m lateral (IPSC) or dorsal (EPSC) from the recorded neurons (Figure 1a), and paired electrical stimuli (0.1ms duration, 50ms interval) were applied at 0.1Hz. GABA_A-IPSC and AMPA-EPSC were pharmacologically isolated with DNQX (50 μ M) or picrotoxin (100 μ M), respectively. Recordings were made using a Multiclamp 700B amplifier and a Digidata 1440A (Molecular Devices Scientific, www.mds.com). Data were acquired and analyzed with Axograph X (www.axographx.com) running on an Apple computer (www.apple.com).

Drugs. Stock solution of DA (10 mM), SFK-81297 (1mM), quinpirole (1mM), SCH-23390 (10mM), methysergide (10mM), 5-HT (10mM), and propranolol (10mM) were prepared in double distilled water. Stock solution of DNQX (100mM), sulpiride (1mM), yohimbine (1mM), and, prazosin (1mM) were prepared in DMSO (100%). Every drug was further dissolved in the physiological solutions at the desired concentration and the final DMSO concentration never exceeded 0.1%. All the drugs were obtained from Sigma-Aldrich (www.sigmaldrich.com) or Tocris (Tocris, www.tocris.com).

Statistical Analyses. We measured drug-induced change in post-synaptic currents (PSC) peak amplitude from baseline in percentage ((Peak amplitude_{drug}-Peak amplitude_{baseline})/Peak amplitude_{baseline})*100). Paired-pulse ratios (PPRs) were calculated by dividing the second (S2) by the first (S1) peak amplitudes that we normalized to baseline. Peak amplitudes for S1 and S2 were calculated from a baseline value measured 10ms after the end of a 1mV test pulse. Coefficient of variation (CV) analyses were done by plotting r ($1/CV^2_{drug}/1/CV^2_{baseline}$) against π (Peak amplitude_{drug}/Peak amplitude_{baseline}). We computed bivariate linear Fits of r by π . Data were all expressed as Mean \pm SEM. Drug effects were assessed using one-tailed t-tests with hypothesized values of 0 (changes in amplitude) and 1 (changes in paired-pulse ratio). When multiple t-tests were done on a single set of data we adjusted the significance level accordingly (0.05/number of t-tests). When comparing multiple means, one-way ANOVAs where used with

Dunnett's test for multiple comparison when ANOVA deemed significance. All statistical analyses were done with JMP 8.0.

Immunohistochemical detection of D1R and D2R. The rats were deeply anesthetized with sodium chloral hydrate (400 mg/kg, i.p., VWR) and perfused transcardiacally with 50–100 ml of 0.9% NaCl followed by 300 ml of fixative consisting of 2% paraformaldehyde (PFA) with 0.2% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. Brains were quickly removed, left overnight in 2% PFA at 4°C, and cut into 60µm-thick frontal sections with a vibrating blade microtome (Leica, VT1000S, www.Leica.com). To enhance the penetration of the immunoreagents, the sections were equilibrated in a cryoprotectant solution (0.05 M PB, pH 7.4, containing 25% sucrose and 10% glycerol), freeze-thawed, and stored in PBS with 0.03% sodium azide until needed. D1R was detected by immunohistochemistry according to previously described and validated procedures (Berthet et al. 2009; Caille et al. 1996) using a monoclonal antibody raised in rat against a 97 amino acid sequence corresponding to the C terminus of the human D1R (Sigma-Aldrich) (Hersch et al. 1995; Levey et al. 1993). D2R were detected with an affinity-purified rabbit polyclonal antiserum directed against a 28 amino acid sequence within the third cytoplasmic loop from the human D2R corresponding to anti D2-284 peptide (Millipore) that recognizes both short and long isoforms (Ahmed et al. 2010). The sections containing the ovBST were incubated in 4% normal goat serum (NGS) or in normal donkey serum (NDS) in PBS for 1h at room temperature (RT) and then in the antibodies against D1r (1:1000) or D2R (1:500) supplemented with 1% NGS or NDS overnight at RT. After washing (3 x 10min) in PBS, for D1R detection, the sections were incubated in goat anti-rat IgG coupled to biotin (Amersham; 1:200 in PBS for 1h30) For D2R detection, the sections were incubated in Dako EnVision+™ system-horseradish peroxidase (HRP) labelled polymer anti-rabbit for 40 min at RT. After three rinses (3 x 10min) in PBS, for D1-DA receptor detection, the sections were then incubated in avidin-biotin complex (Vector ABC Elite, Vector Laboratories, www.vectorlabs.com) (1:200) in PBS for lh30 at RT and again rinsed (3 x 10 min) in PBS. The immunoreactive sites were revealed by a combination of the glucose oxidase-diaminobenzidine (DAB; Sigma-Aldrich, 0.05% in TB) method and the DAB-nickel method (Shu et al. 1988). The reaction was stopped by several washes in H₂O. The sections were mounted on glass slides, dehydrated, and mounted in Eukitt (Electron Microscopy Sciences, www.emsdiasum.com).

Negative immunohistological control demonstrated the absence of signal when omitting the first antibody.

Results

Passive properties of ovBST neurons

No agonist tested in the present study significantly changed passive properties (membrane input resistance (R_{in}) and membrane holding currents (H_c)) of ovBST neurons voltage-clamped at -70mV. In particular, DA (30 μ M) and NA (10 μ M), which produced the largest effects on synaptic transmission, had virtually no effect on H_c and R_{in} of ovBST neurons (Figure 1a).

DA decreased inhibitory transmission in the ovBST by activating pre-synaptic D2R

Exogenously applied DA (0.1 to 100 μ M) dose-dependently decreased the amplitude of evoked and pharmacologically isolated GABA_A-IPSC in ovBST neurons (Figure 2). GABA_A-IPSC rapidly returned to baseline upon when DA was washed out of the perfusion chamber. At concentrations where DA decreased GABA_A-IPSC, we observed statistically significant increases in paired-pulse ratio (PPR_{50msec}) suggesting it acts pre-synaptically (Figure 2b). Coefficient of variation (CV) analyses revealed a significant positive correlation, also suggesting a pre-synaptic effect of DA (Figure 2c). The D2-like agonist quinpirole dose-dependently and pre-synaptically mimicked the effects of DA on GABA_A-IPSC (Figure 2b). In contrast, the D1R agonist SKF-81297 did not alter the amplitude of GABA_A-IPSC (Figure 2b).

DA 30 μ M was co-applied with either the D1R antagonist SCH-23390 (10 μ M), the D2R antagonist sulpiride (10 μ M), a cocktail of noradrenergic antagonists (prazosin 0.1 μ M, yohimbin 1 μ M, and propranolol 1 μ M) or the 5-HT_{1,2,7} receptor antagonist (methysergide 10 μ M). Only D2R blockade with sulpiride altered DA-induced reduction in GABA_A-IPSC ($F_{(4,19)}=7.6$, $P=0.0008$) (Figure 3). As a result, DA produced significant decreases in GABA_A-IPSC when co-applied with SCH-23390, noradrenergic antagonists or methysergide. Likewise, NA (10 μ M) and modestly reduced GABA_A-IPSC amplitude (Figure 3b). On average, 5-HT (10 μ M) had no significant effect on GABA_A-IPSC amplitude in the ovBST (Figure 3b). However, 5-HT decreased (-26.0±6.8, n=8) or slightly increased (11.0±6.1, n=3) GABA_A-IPSC in the ovBST. Sulpiride and SCH-23390 did not produce any effects on their own (Figure 3b).

DA decreased fast excitatory transmission in the ovBST by activating pre-synaptic α2R

Exogenously applied DA (0.1 to 30 μ M) dose-dependently decreased the amplitude of evoked and pharmacologically isolated AMPA-EPSC in ovBST neurons (Figure 4a). AMPA-EPSC rapidly returned to baseline when DA was washed out of the perfusion chamber. At concentrations where DA decreased AMPA-EPSC, we observed statistically significant increases in paired-pulse ratio (PPR_{50msec}) suggesting it acted pre-synaptically (Figure 4a). CV analyses revealed a significant positive correlation, also suggesting a pre-synaptic effect of DA (Figure 4a1, inset). In contrast to the effects of DA on GABA_A-IPSC, bath application of D1R or D2R agonists did not mimic the effects of DA of AMPA-EPSC (Figure 4a1). Bath application of the D2R agonist quinpirole (0.1-1 μ M), of the D1/D5 full agonist SKF-81297 (0.1-1 μ M), or of the broad-spectrum DAR agonist apomorphine (30-100 μ M) did not significantly change the amplitude of evoked AMPA-EPSC (Figure 4a1). Likewise, 5-HT (30-100 μ M) did not affect the amplitude of AMPA-EPSC in any tested ovBST neurons (Figure 4a1).

However, exogenously applied NA (0.1-10 μ M) dose-dependently reduced the amplitude of evoked AMPA-EPSC by acting pre-synaptically as shown by significant changes in PPR (Figure 4b). CV analyses revealed a significant positive correlation, also suggesting a pre-synaptic effect of NA (Figure 4b1 inset). Furthermore, the α2R agonist clonidine dose-dependently reduced the amplitude of evoked AMPA-EPSC (Figure 4b1). Clonidine also decreased AMPA-EPSC pre-synaptically (at 10 μ M) since we measured a significant increase in PPR (Figure 4b1). Furthermore, the α2R antagonist yohimbine (5 μ M) completely abolished NA- ($t_{(15)}=-7.7$, $P<0.0001$) and DA- ($t_{(13)}=4.9$, $P=0.0001$) induced reduction in AMPA-EPSC (Figure 5c). In contrast, the effect of NA was unaffected by α1- and β-adrenergic receptors blockade with prazosin (5 μ M) and propranolol (5 μ M) (Figure 5c).

Localization of D1R and D2R in the ovBST

We observed immunoreactivity for both D1R and D2R in the anterior BST (Figure 6). However, the distribution of immunoreactivity for both receptors was not homogeneous. Notably, the ovBST was completely devoid of D1R immunostaining (Figure 6a). In contrast, the ovBST contained immunoreactivity for D2R, which, at the light microscopy level, appeared to be in axons terminals, neuropil and in cytoplasm of cells bodies (Figure 6b).

Discussion

This study examines the effects of DA in the ovBST of the rat, and demonstrates the involvement of differential mechanisms for its effects on inhibitory and excitatory synaptic transmission. DA reduced the amplitude of whole-cell evoked GABA_A-IPSC pre-synaptically in an exclusively D2R-dependent manner, while it reduced fast excitatory transmission, also pre-synaptically, but through α 2R. This conclusion is strongly supported by the use of specific D2R and α 2R agonists and antagonists, and immunohistochemical evidence for expression of α 2R (Shields et al. 2009) and D2R but not D1R in the ovBST (this study).

Although, the neurophysiological D2-like effect of DA on inhibitory synaptic transmission was clearly pre-synaptic, immunohistochemical data does not unequivocally demonstrate exclusive pre-synaptic localization of D2R. In fact, we detected perikarya-like immunolabeling of D2R in the ovBST. However, previous studies showed the absence of D2R mRNA in the dorsolateral BST (dlBST) (Bouthenet et al. 1991). As such, these perikarya-like structures could also be axonal envelopes of ovBST perikarya or local ovBST interneurons expressing D2R. In a 2006 study, Larriva-Sahd clearly demonstrated that there are several subtypes (11) of neurons in the ovBST, amongst which subpopulations of short axon neurons that do not exit the nucleus and could thus be considered interneurons (Larriva-Sahd 2006). However, our electrophysiological data did not reveal any D2-like post-synaptic responses ruling out a possible reduction in lateral inhibition in the ovBST through hyperpolarization of GABA interneurons. Accordingly, the most parsimonious interpretation of our results would be that DA, acting on D2-containing GABAergic axons from extra-ovBST origin, reduces GABA release. To resolve this question, higher resolution studies of the expression of D2R mRNA in BST subnuclei or single-cell PCR experiments would be needed to confirm or infirm the single previous study regarding D2R mRNA absence.

Both our neurophysiological and immunohistochemical data suggest that D1R is not expressed in the ovBST. This result is consistent with previous studies showing that D1R mRNA and protein is not expressed in the dlBST (Bouthenet et al. 1991; Fremeau et al. 1991; Scibilia et al. 1992). Furthermore, no D1-like mediated effect on synaptic transmission in the ovBST was detected in

this study, which contrasts with a previous report by Kash *et al.* (Kash et al. 2008). Kash *et al.* suggested that DA, through D1/D2-like receptors, depolarize corticotropin releasing hormones (CRH)-containing neurons and facilitate glutamate release, which would explain the modest increase in the frequency of spontaneous EPSC observed in their study. This discrepancy could be explained by several differences in the experimental systems used in the present study and by Kash *et al.*, including the use of 6-8 weeks old mice vs. 12 weeks and older rats. Furthermore, because Kash *et al.* did not restrict their analysis to the ovBST, their results may reflect synaptic activity in the dorsomedial or the more ventral part of the dorsal BST, where we detected low-level expression of D1R (see Figure 6). It should also be noted that there was virtually no detectable spontaneous EPSC in our experimental system. Accordingly, the effects of DA on evoked EPSC were measured by electrically stimulating the stria terminalis, the main route of excitatory entry to the ovBST (Larriva-Sahd 2006). As such, our study extends Kash *et al.* by revealing regional D1 effects within the dlBST.

In our system, the effect of DA on the amplitude of evoked EPSC was not mimicked or reproduced by D1R or D2R agonists, but was dependent on pre-synaptic α 2R, as described previously for NA (Dumont and Williams 2004; Egli et al. 2005; McElligott et al. 2010; McElligott and Winder 2008; 2009; Shields et al. 2009). These results are consistent with the widespread distribution of α 2R immunoreactivity in the BST, including the ovBST (Shields et al. 2009). Furthermore, α 2R are ideally located to modulate excitatory inputs entering the BST since stria terminalis fibers, including those innervating the ovBST, co-express α 2R, the vesicular glutamate transporter VGLUT1, and TH (which could contain either DA or NA) (Shields et al. 2009). Together, this evidence demonstrates that if DA had the ability to activate α 2R in the ovBST, it would very likely modulate excitatory transmission, which is consistent with our observations. In contrast, our results do not support a role for α 2R in modulating GABAergic transmission in the BST, which is also consistent with previous studies (Dumont and Williams 2004; Forray et al. 1999; Shields et al. 2009).

Cross-talk between cathecolaminergic subpathways, including activation of α 2R by DA, is not uncommon and occurs in other brain regions and species (Cornil and Ball 2008; Cornil et al. 2002; Guiard et al. 2008). Interestingly, the affinity of DA for α 2R is approximately 3-fold lower than that of NA (Boyajian and Leslie 1987) and in fact, 10 μ M NA and DA 30 μ M were

equipotent at reducing AMPA-EPSC in the ovBST (see Figure 4a1 and b1). However, it is not yet clear whether α 2R-mediated regulation of excitatory transmission by DA is physiologically, behaviourally, or pathophysiologically significant. *In vivo*, DA can be, at best, measured in the nM range in the BST (Carboni et al. 2000). In brain slices, DA in the nM range does not produce significant effects (see Figures 2 and 4). We thus suggest a double-dissociation between the effects of DA and NA on inhibitory and excitatory synaptic transmission in the ovBST. This double-dissociation is appreciable at lower concentration of both DA and NA (e.g. at 1 μ M). It is thus likely that in physiological conditions, the effect of DA is restricted to inhibitory transmission whereas NA should preferentially modulate excitatory synaptic transmission.

In contrast to DA and NA, 5-HT does not modulate excitatory transmission and is largely undetected immunohistochemically in the ovBST (Phelix et al. 1992). This observation contrasts with 5-HT-induced reduction in evoked EPSC reported by Guo *et al.* in the anterolateral BST (Guo and Rainnie 2010), and suggests that 5-HT plays little or no neuromodulatory role of excitatory transmission in the ovBST. Nonetheless, we observed bi-directional modulation of inhibitory transmission by 5-Ht in the ovBST (see Results section). It is, however, unlikely that DA mediated its effect through 5-Ht receptors since methysergide did not interfere with the DA-mediated reduction in IPSC. 5-Ht modulation of inhibitory transmission in the ovBST or in the BST altogether has not been done and will require a thorough investigation such as those done for excitatory transmission (Guo and Rainnie 2010).

Anatomical evidence suggests that the ovBST plays a role in neurocircuits that influence ingestive behaviour including its motivational component (Dong et al. 2001b). Accordingly, the BST, and in particular its oval region, could be key within the neural circuits sensitive to drugs of abuse. The ovBST receives ascending inputs from the cerebrospinal trunk, horizontal inputs from basal forebrain-related regions, and top-down cortical inputs. Cortical projections, likely conveying excitatory inputs, mostly originate in the viscerosensory portion of the dysgranular insular cortex and the olfactory amygdalopiriform transitional area (McDonald et al. 1999), which could respectively convey internal and external cues triggering operant behaviours towards reward. How excitatory inputs into the ovBST affect intrinsic neural network function is currently unknown. However, Larriva-Sahd extensively described the local neuroanatomy of the

ovBST which is compartmentalized into a shell and a core (Larraza-Sahd 2006). The shell seems to receive and transmit incoming information to the core which is home of projection neurons. ovBST projection is quite complex and widespread but should result in coordinated autonomic, neuroendocrine, and somatomotor responses (Dong et al. 2001b) that may drive foraging behaviour when body nutrients (or drugs) levels become low and external cues predict substance availability. Consistent with this proposition, pharmacological manipulations of the dorsal BST influence motivated behaviours towards natural or pharmacological rewards (Eiler et al. 2003; Epping-Jordan et al. 1998; Erb et al. 2001; Hyytia and Koob 1995; Leri et al. 2002; Walker et al. 2000). However, the specific contribution of the ovBST in such pathways has not been reproduced and/or analyzed experimentally, because of technical difficulties associated with selectively targeting this small brain region. Consequently, the exact contribution of DA-dependent effects in the ovBST to motivated behaviours is not yet understood.

Reward prediction correlates with release of DA from midbrain neurons (Fiorillo et al. 2003; Phillips et al. 2003). Therefore, salience-induced release of DA in the ovBST could activate D2R, selectively reduce inhibitory influence to promote neuronal activation and, perhaps, reward-seeking behaviours. In fact, microinjection of the D2R antagonist eticlopride in the dorsolateral BST reduced sucrose self-administration (Eiler et al. 2003). In contrast, NA, which is released in the BST in response to stress (Pacak et al. 1995), should inactivate excitatory drive to the ovBST, without affecting inhibitory transmission. This functional double-dissociation of the effects of DA and NA in the ovBST may help fine tune the neurological integration of stress and goal-directed behaviours (Bowers et al. 1999) (Figure 7).

References

Ahmed MR, Berthet A, Bychkov E, Porras G, Li Q, Bioulac BH, Carl YT, Bloch B, Kook S, Aubert I, Dovero S, Doudnikoff E, Gurevich VV, Gurevich EV, and Bezard E. Lentiviral overexpression of GRK6 alleviates L-dopa-induced dyskinesia in experimental Parkinson's disease. *Sci Transl Med* 2: 28ra28, 2010.

Berthet A, Porras G, Doudnikoff E, Stark H, Cador M, Bezard E, and Bloch B. Pharmacological analysis demonstrates dramatic alteration of D1 dopamine receptor neuronal distribution in the rat analog of L-DOPA-induced dyskinesia. *J Neurosci* 29: 4829-4835, 2009.

Bouthenet ML, Soulé E, Martres MP, Sokoloff P, Giros B, and Schwartz JC. Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain Res* 564: 203-219, 1991.

Bowers WJ, Attiast E, and Amit Z. Stress enhances the response to reward reduction but not food-motivated responding. *Physiol Behav* 67: 777-782, 1999.

Boyajian CL, and Leslie FM. Pharmacological evidence for alpha-2 adrenoceptor heterogeneity: differential binding properties of [3H]rauwolscine and [3H]idazoxan in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 241: 1092-1098, 1987.

Caille I, Dumartin B, and Bloch B. Ultrastructural localization of D1 dopamine receptor immunoreactivity in rat striatonigral neurons and its relation with dopaminergic innervation. *Brain Res* 730: 17-31, 1996.

Carboni E, Silvagni A, Rolando MT, and Di Chiara G. Stimulation of in vivo dopamine transmission in the bed nucleus of stria terminalis by reinforcing drugs. *J Neurosci* 20: RC102, 2000.

Cecchi M, Khoshbouei H, Javors M, and Morilak DA. Modulatory effects of norepinephrine in the lateral bed nucleus of the stria terminalis on behavioral and neuroendocrine responses to acute stress. *Neuroscience* 112: 13-21, 2002.

Cornil CA, and Ball GF. Interplay among catecholamine systems: dopamine binds to alpha2-adrenergic receptors in birds and mammals. *J Comp Neurol* 511: 610-627, 2008.

Cornil CA, Balthazart J, Motte P, Massotte L, and Seutin V. Dopamine activates noradrenergic receptors in the preoptic area. *J Neurosci* 22: 9320-9330, 2002.

Delfs JM, Zhu Y, Druhan JP, and Aston-Jones G. Noradrenaline in the ventral forebrain is critical for opiate withdrawal-induced aversion. *Nature* 403: 430-434, 2000.

Deutch AY, Goldstein M, Baldino F, Jr., and Roth RH. Telencephalic projections of the A8 dopamine cell group. *Ann N Y Acad Sci* 537: 27-50, 1988.

Deyama S, Katayama T, Kondoh N, Nakagawa T, Kaneko S, Yamaguchi T, Yoshioka M, and Minami M. Role of enhanced noradrenergic transmission within the ventral bed nucleus of the stria terminalis in visceral pain-induced aversion in rats. *Behav Brain Res* 197: 279-283, 2009.

Deyama S, Katayama T, Ohno A, Nakagawa T, Kaneko S, Yamaguchi T, Yoshioka M, and Minami M. Activation of the beta-adrenoceptor-protein kinase A signaling pathway within the ventral bed nucleus of the stria terminalis mediates the negative affective component of pain in rats. *J Neurosci* 28: 7728-7736, 2008.

Dong HW, Petrovich GD, and Swanson LW. Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Res Brain Res Rev* 38: 192-246, 2001a.

Dong HW, Petrovich GD, Watts AG, and Swanson LW. Basic organization of projections from the oval and fusiform nuclei of the bed nuclei of the stria terminalis in adult rat brain. *J Comp Neurol* 436: 430-455, 2001b.

Dumont EC, and Williams JT. Noradrenaline Triggers GABA Inhibition of Bed Nucleus of the Stria Terminalis Neurons Projecting to the Ventral Tegmental Area. *J Neurosci* 24: 8198-8204, 2004.

Egli RE, Kash TL, Choo K, Savchenko V, Matthews RT, Blakely RD, and Winder DG. Norepinephrine modulates glutamatergic transmission in the bed nucleus of the stria terminalis. *Neuropsychopharmacology* 30: 657-668, 2005.

Eiler WJ, 2nd, Seyoum R, Foster KL, Mailey C, and June HL. D1 dopamine receptor regulates alcohol-motivated behaviors in the bed nucleus of the stria terminalis in alcohol-preferring (P) rats. *Synapse* 48: 45-56, 2003.

Epping-Jordan MP, Markou A, and Koob GF. The dopamine D-1 receptor antagonist SCH 23390 injected into the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis decreased cocaine reinforcement in the rat. *Brain Res* 784: 105-115, 1998.

Erb S, Salmaso N, Rodaros D, and Stewart J. A role for the CRF-containing pathway from central nucleus of the amygdala to bed nucleus of the stria terminalis in the stress-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 158: 360-365, 2001.

Fiorillo CD, Tobler PN, and Schultz W. Discrete coding of reward probability and uncertainty by dopamine neurons. *Science* 299: 1898-1902, 2003.

Forray MI, Bustos G, and Gysling K. Noradrenaline inhibits glutamate release in the rat bed nucleus of the stria terminalis: in vivo microdialysis studies. *J Neurosci Res* 55: 311-320, 1999.

Freedman LJ, and Cassell MD. Distribution of dopaminergic fibers in the central division of the extended amygdala of the rat. *Brain Res* 633: 243-252, 1994.

Fremeau RT, Jr., Duncan GE, Fornaretto MG, Dearry A, Gingrich JA, Breese GR, and Caron MG. Localization of D1 dopamine receptor mRNA in brain supports a role in cognitive, affective, and neuroendocrine aspects of dopaminergic neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 3772-3776, 1991.

Guizard BP, El Mansari M, and Blier P. Cross-talk between dopaminergic and noradrenergic systems in the rat ventral tegmental area, locus ceruleus, and dorsal hippocampus. *Mol Pharmacol* 74: 1463-1475, 2008.

Guo JD, Hammack SE, Hazra R, Levita L, and Rainnie DG. Bi-directional modulation of bed nucleus of stria terminalis neurons by 5-HT: molecular expression and functional properties of excitatory 5-HT receptor subtypes. *Neuroscience* 164: 1776-1793, 2009.

Guo JD, and Rainnie DG. Presynaptic 5-HT(1B) receptor-mediated serotonergic inhibition of glutamate transmission in the bed nucleus of the stria terminalis. *Neuroscience* 165: 1390-1401, 2010.

Gustafson EL, and Greengard P. Localization of DARPP-32 immunoreactive neurons in the bed nucleus of the stria terminalis and central nucleus of the amygdala: co-distribution with axons containing tyrosine hydroxylase, vasoactive intestinal polypeptide, and calcitonin gene-related peptide. *Exp Brain Res* 79: 447-458, 1990.

Hammack SE, Guo JD, Hazra R, Dabrowska J, Myers KM, and Rainnie DG. The response of neurons in the bed nucleus of the stria terminalis to serotonin: Implications for anxiety. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009.

Hasue RH, and Shammah-Lagnado SJ. Origin of the dopaminergic innervation of the central extended amygdala and accumbens shell: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study in the rat. *J Comp Neurol* 454: 15-33, 2002.

Hersch SM, Ciliax BJ, Gutekunst CA, Rees HD, Heilman CJ, Yung KK, Bolam JP, Ince E, Yi H, and Levey AI. 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, 1995.

Hyttia P, and Koob GF. GABAA receptor antagonism in the extended amygdala decreases ethanol self-administration in rats. *Eur J Pharmacol* 283: 151-159, 1995.

Kash TL, Nobis WP, Matthews RT, and Winder DG. Dopamine enhances fast excitatory synaptic transmission in the extended amygdala by a CRF-R1-dependent process. *J Neurosci* 28: 13856-13865, 2008.

Kozicz T. Axon terminals containing tyrosine hydroxylase- and dopamine-beta-hydroxylase immunoreactivity form synapses with galanin immunoreactive neurons in the lateral division of the bed nucleus of the stria terminalis in the rat. *Brain Res* 914: 23-33, 2001.

Larriva-Sahd J. Histological and cytological study of the bed nuclei of the stria terminalis in adult rat. II. Oval nucleus: extrinsic inputs, cell types, neuropil, and neuronal modules. *J Comp Neurol* 497: 772-807, 2006.

Larriva-Sahd J. Juxtacapsular nucleus of the stria terminalis of the adult rat: extrinsic inputs, cell types, and neuronal modules: a combined Golgi and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 475: 220-237, 2004.

Leri F, Flores J, Rodaros D, and Stewart J. Blockade of stress-induced but not cocaine-induced reinstatement by infusion of noradrenergic antagonists into the bed nucleus of the stria terminalis or the central nucleus of the amygdala. *J Neurosci* 22: 5713-5718, 2002.

Levey AI, Hersch SM, Rye DB, Sunahara RK, Niznik HB, Kitt CA, Price DL, Maggio R, Brann MR, Ciliax BJ, and et al. Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 8861-8865, 1993.

Levita L, Hammack SE, Mania I, Li XY, Davis M, and Rainnie DG. 5-hydroxytryptamine(1a)-likereceptor activation in the bed nucleus of the stria terminalis: Electrophysiological and behavioral studies. *Neuroscience* 128: 583-596, 2004.

McDonald AJ, Shammah-Lagnado SJ, Shi C, and Davis M. Cortical afferents to the extended amygdala. *Ann N Y Acad Sci* 877: 309-338, 1999.

McElligott ZA, Klug JR, Nobis WP, Patel S, Grueter BA, Kash TL, and Winder DG. Distinct forms of Gq-receptor-dependent plasticity of excitatory transmission in the BNST are differentially affected by stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 2271-2276, 2010.

McElligott ZA, and Winder DG. Alpha1-adrenergic receptor-induced heterosynaptic long-term depression in the bed nucleus of the stria terminalis is disrupted in mouse models of affective disorders. *Neuropsychopharmacology* 33: 2313-2323, 2008.

McElligott ZA, and Winder DG. Modulation of glutamatergic synaptic transmission in the bed nucleus of the stria terminalis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009.

Meloni EG, Gerety LP, Knoll AT, Cohen BM, and Carlezon WA, Jr. Behavioral and anatomical interactions between dopamine and corticotropin-releasing factor in the rat. *J Neurosci* 26: 3855-3863, 2006.

Pacak K, McCarty R, Palkovits M, Kopin IJ, and Goldstein DS. Effects of immobilization on in vivo release of norepinephrine in the bed nucleus of the stria terminalis in conscious rats. *Brain Res* 688: 242-246, 1995.

Phelix CF, Liposits Z, and Paull WK. Monoamine innervation of bed nucleus of stria terminalis: an electron microscopic investigation. *Brain Res Bull* 28: 949-965, 1992.

Phillips PE, Stuber GD, Heien ML, Wightman RM, and Carelli RM. Subsecond dopamine release promotes cocaine seeking. *Nature* 422: 614-618, 2003.

Scibilia RJ, Lachowicz JE, and Kilts CD. Topographic nonoverlapping distribution of D1 and D2 dopamine receptors in the amygdaloid nuclear complex of the rat brain. *Synapse* 11: 146-154, 1992.

Shields AD, Wang Q, and Winder DG. alpha2A-adrenergic receptors heterosynaptically regulate glutamatergic transmission in the bed nucleus of the stria terminalis. *Neuroscience* 163: 339-351, 2009.

Shu SY, Ju G, and Fan LZ. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci Lett* 85: 169-171, 1988.

Walker JR, Ahmed SH, Gracy KN, and Koob GF. Microinjections of an opiate receptor antagonist into the bed nucleus of the stria terminalis suppress heroin self-administration in dependent rats. *Brain Res* 854: 85-92, 2000.

Figures

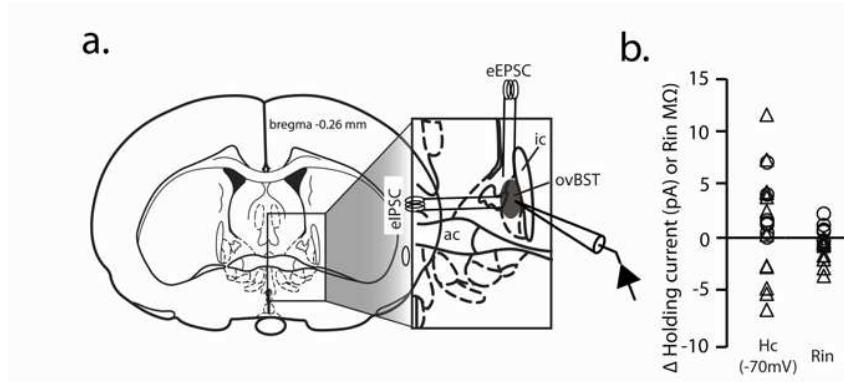


Figure 1. Anatomical localization of recordings and effects of agonists on passive electrophysiological properties of ovBST neurons. a. Schematic illustrating the anatomical localization of recording pipettes and stimulating electrodes. ac: anterior commissure; ic: internal capsule. b. Dot plot showing the effects of DA 30 μ M (circles) or NA 10 μ M (triangles) on membrane holding current (Hc) and membrane input resistance (Rin).

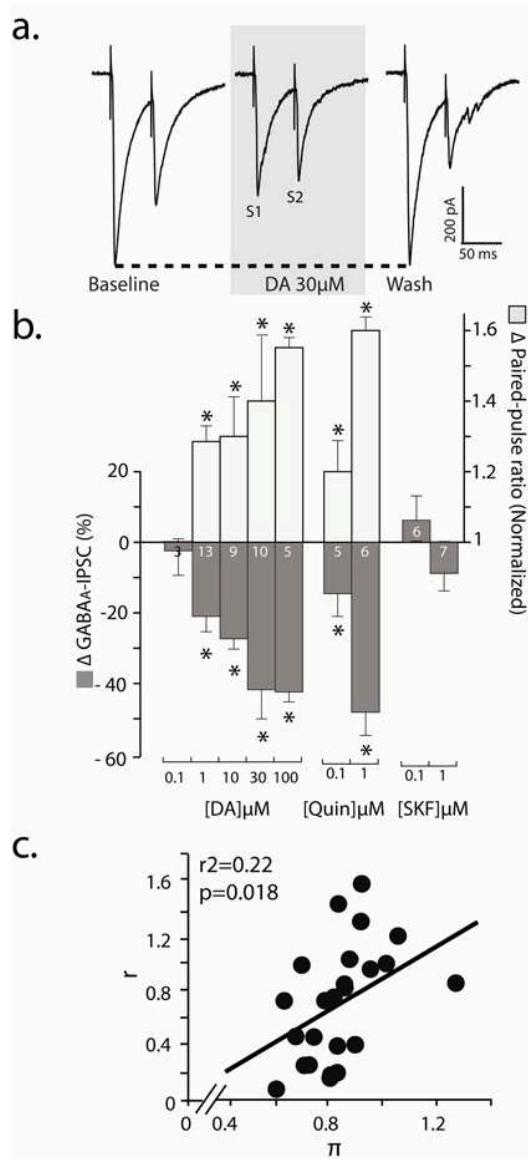


Figure 2. Effects of DA, D1R, and D2R agonists on the amplitude of evoked GABA_A-IPSC in the ovBST. a. Representative traces showing the effects of bath application of DA on electrically evoked GABA_A-IPSC in the ovBST. Each trace is the average of 5 consecutive events. b. Bar graph summarizing the effects of DA agonists on the peak amplitude and paired-pulse ratios of evoked GABA_A-IPSC in the ovBST. c. Coefficient of variation analysis of the effects of DA (0.1-30 μM) on evoked GABA_A-IPSC in the ovBST. S1: stimulus one. S2: Stimulus 2. r : $1/CV^2_{\text{drug}}/1/CV^2_{\text{baseline}}$). Π : $\text{Peak amplitude}_{\text{drug}}/\text{Peak amplitude}_{\text{baseline}}$. Asterix, Significantly different from 0; $P < 0.01$.

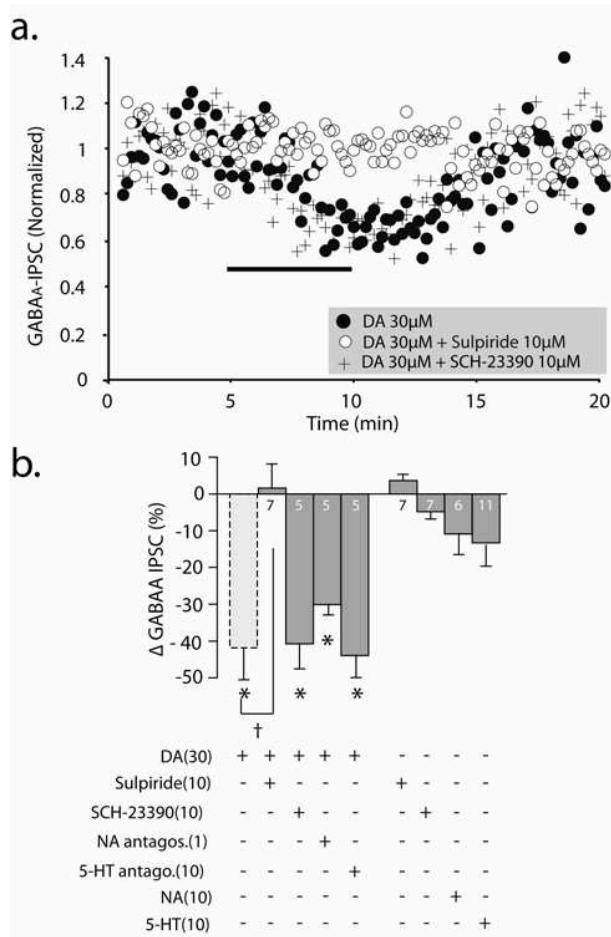


Figure 3. Pharmacological characterization of the effects of DA on the amplitude of evoked GABA_A-IPSC in the ovBST. a. Representative dot plot showing the time-course of the effects of DA on evoked GABA_A-IPSC in the ovBST in the absence and the presence of the D1R antagonist SCH-23390 or the D2R antagonist sulpiride. **b.** Bar chart summarizing the effect of catecholaminergic agonists and antagonists on evoked GABA_A-IPSC in the ovBST. Asterix, Significantly different from 0; P<0.01. Dagger, Significantly different from DA 30μM; P<0.05.

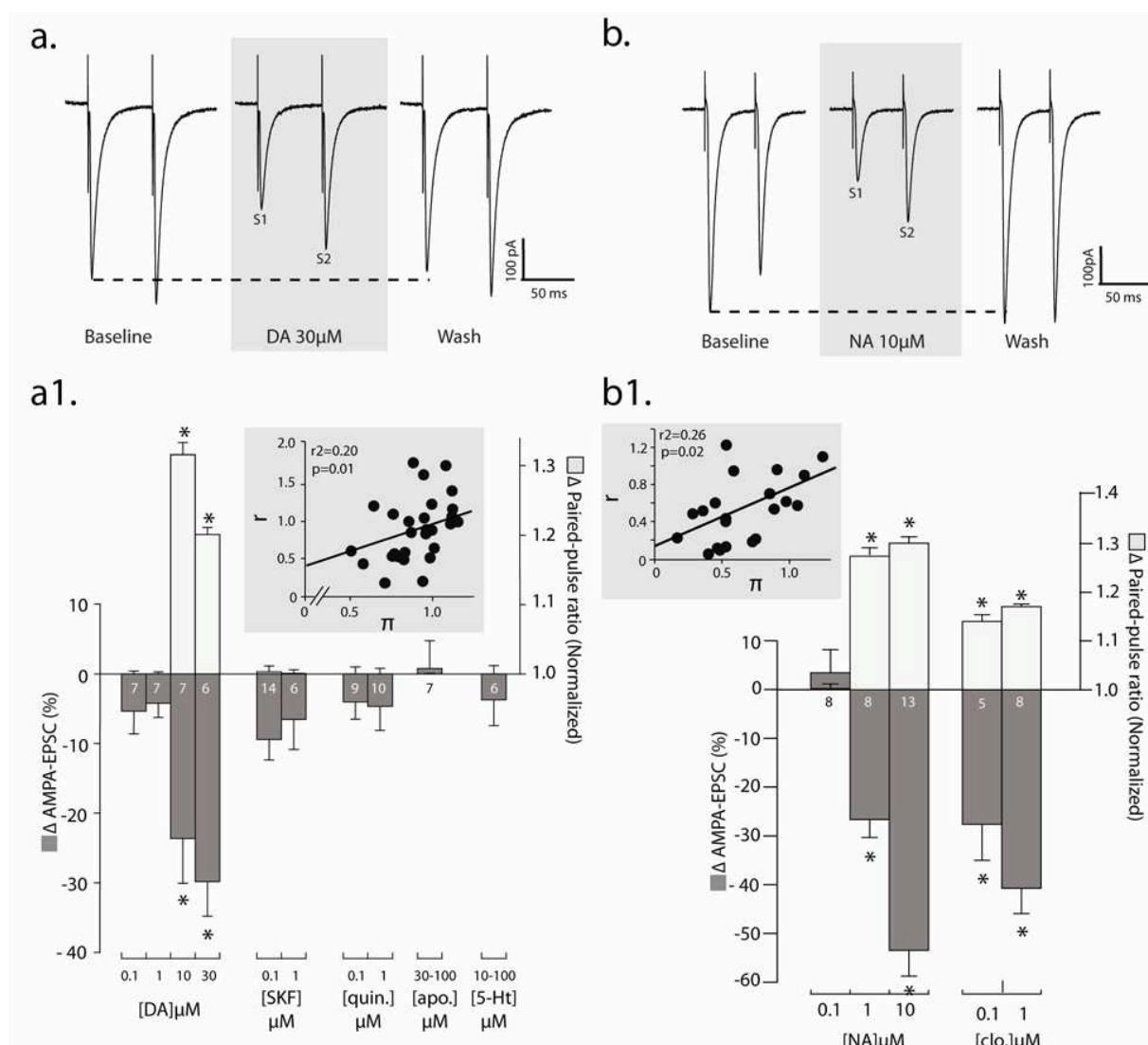


Figure 4. Catecholaminergic modulation of evoked AMPA-EPSC in the ovBST. a. Representative traces showing the effects of bath application of DA on electrically evoked AMPA-EPSC in the ovBST. Each trace is the average of 5 consecutive events. a1. Bar graph summarizing the effects of DA and 5-HT agonists on the peak amplitude and paired-pulse ratios of evoked AMPA-EPSC in the ovBST. Inset shows CV analyses. b. Representative traces showing the effects of bath application of noradrenergic agonists on electrically evoked AMPA-EPSC in the ovBST. Each trace is the average of 5 consecutive events. b1. Bar graph summarizing the effects of noradrenergic agonists on the peak amplitude and paired-pulse ratios of evoked AMPA-EPSC in the ovBST. Inset shows CV analyses. S1: stimulus one. S2: Stimulus 2. Asterix, Significantly different from 0; $P < 0.01$.

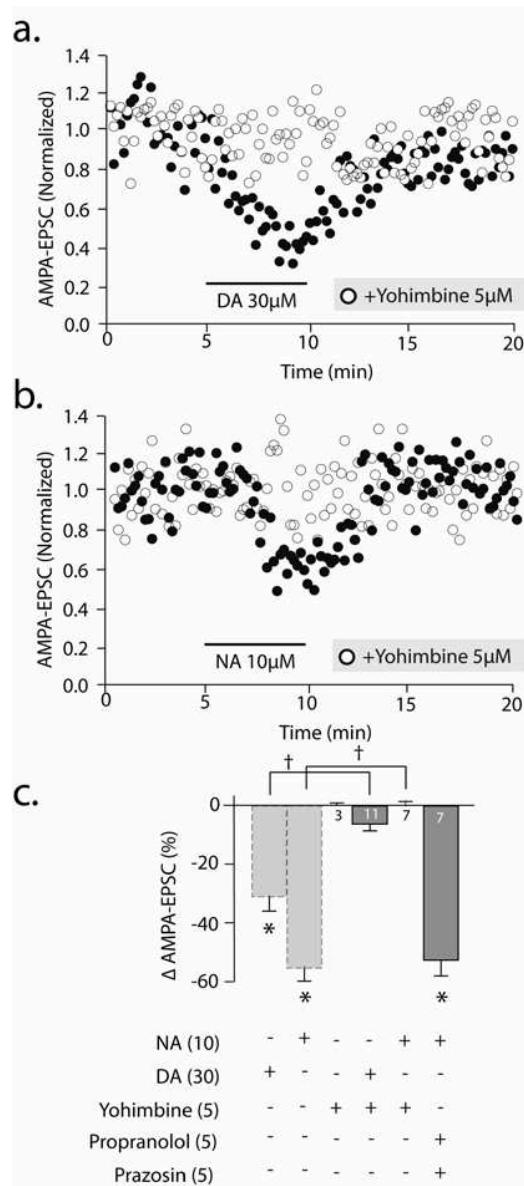


Figure 5. Pharmacological characterization of the effects of DA and NA on evoked AMPA-EPSC in the ovBST. a. Representative dot plot showing the time-course of the effects of DA on evoked GABA_A-IPSC in the ovBST in the absence and the presence of the α 2-adrenergic receptors yohimbine. b. Representative dot plot showing the time-course of the effects of NA on evoked GABA_A-IPSC in the ovBST in the absence and the presence of the α 2-adrenergic receptors yohimbine. c. Bar chart summarizing the effects of noradrenergic antagonists on DArgic and noradrenergic modulation of evoked AMPA-EPSC in the ovBST. Asterix, Significantly different from 0; P<0.01. Dagger; P<0.05.

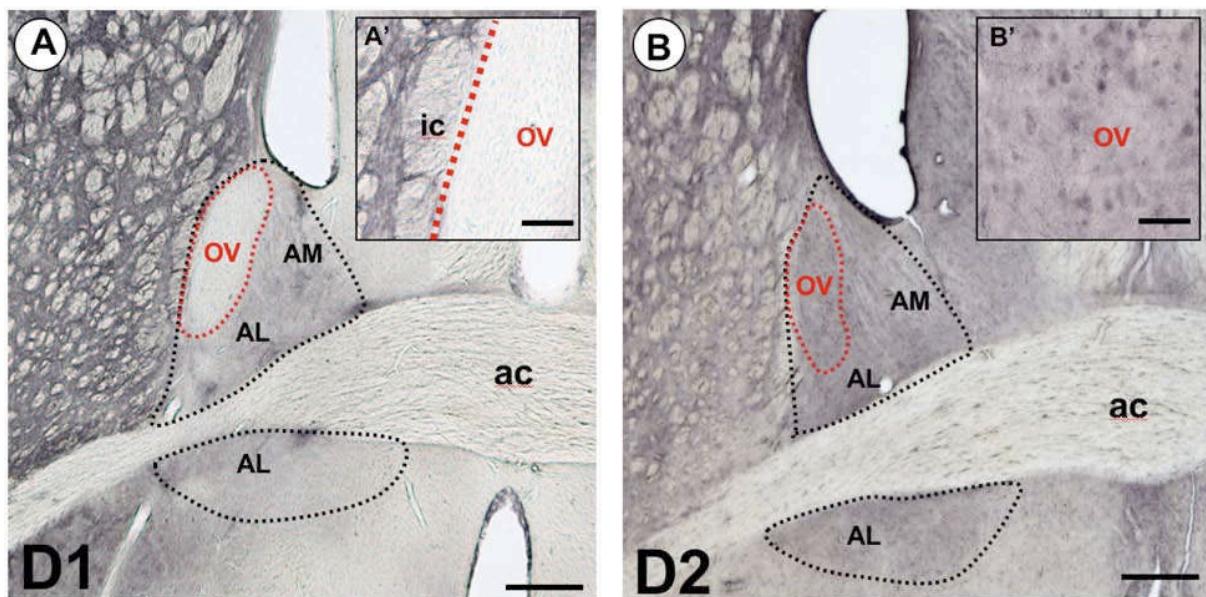


Figure 6. Immunohistochemical localization of D1R and D2R in the in the ovBST. Light micrographs of the rat brain immunostained to reveal immunoreactivity for D1 (A and inset A') and D2 (B and inset B') receptors. a., the anterior BST displays dense and patchy immunoreactivity for D1 (delineated by the black dotted line). a and inset in a.: No D1 immunoreactivity was detected in the ovBST (delineated by the red dotted line). The black dotted line delineated the anterolateral and anteromedial BST. b., the anterior BST displays dense and homogeneous immunoreactivity for D2 receptor. Inset in b., D2 immunoreactivity is in the pericarya of neurons and in what appeared to be axons, terminals and neuropile. ac, anterior commissure; ic, internal capsula; OV, oval nucleus. Scale bars: A and B, 0.3mm; A', 0.1 mm; B', 50 μ m.

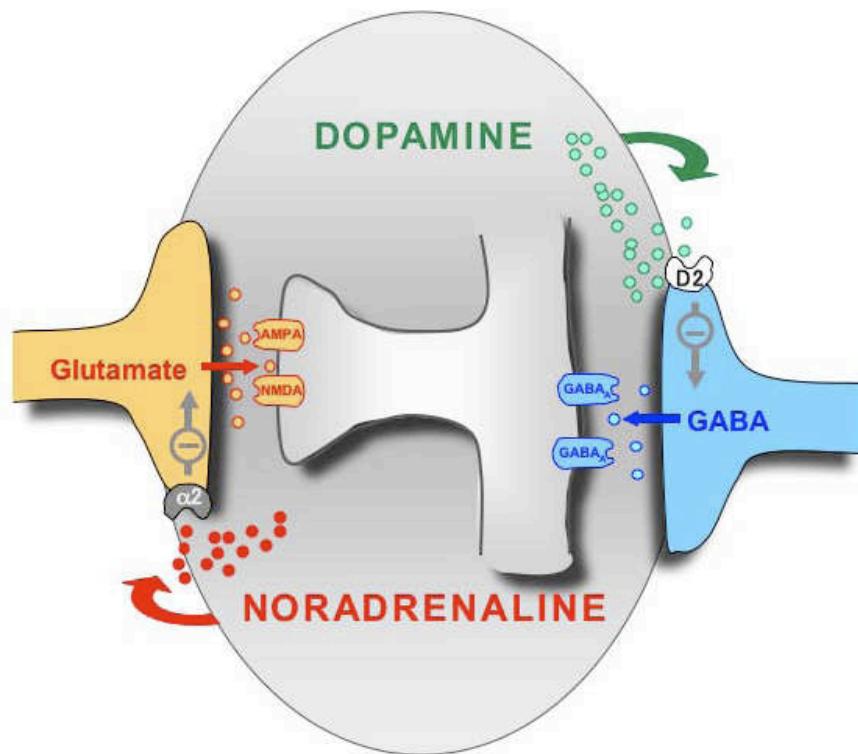


Figure 7. Diagram showing the double-dissociation of the catecholaminergic modulation of synaptic transmission in the oBST.

The ovBST receives robust glutamatergic projection from insular cortex, piriform cortex, ventral subiculum and basolateral amygdala as well as DA inputs from the midbrain and noradrenergic inputs from the nucleus of the tractus solitarius and A1. GABAergic inputs to ovBST are from local short-axon GABAergic neurons or from the central nucleus of the amygdala. Functional evidences from this study demonstrate that: 1) release of DA in the ovBST could activate D2R and selectively reduce inhibitory influence to promote neuronal activation and 2) release of NA could activate α 2-adrenergic receptors and selectively inactivate excitatory drive to the ovBST. This functional double-dissociation of the effects of DA and NA in the ovBST may be involved in processing both stress- and reward-related stimuli.

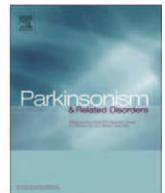
V.C.) Article annexe 3

Dopamine receptors and L-dopa-induced dyskinesia

Amandine Berthet, Erwan Bezard

Parkinsonism & Related Disorders. Volume 15, Supplément 4, Décembre 2009, Pages S8-12.

[doi:10.1016/S1353-8020\(09\)70827-2](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(09)70827-2)



Dopamine receptors and L-dopa-induced dyskinesia

Amandine Berthet, Erwan Bezard *

Université Victor-Segalen Bordeaux 2, Centre National de la Recherche Scientifique, Bordeaux Institute of Neuroscience, UMR 5227, Bordeaux, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Parkinson's disease
L-dopa
Signalling cascade
Dopamine D1 receptor
Sensitization
Abnormal involuntary movements
Trafficking

ABSTRACT

In the majority of Parkinson's disease patients, chronic dopamine replacement therapy leads to involuntary aimless movements known as L-dopa-induced dyskinesia. While mechanisms involved in dyskinesia occurrence are still unclear, dopamine receptors undoubtedly have a central role in their pathophysiology. Here we review current knowledge and evidence for their involvement in dyskinesia genesis and manifestation. We propose that an anti-dyskinetic strategy should target the D1/D3 signalling cascade, as targeting D2 receptor signalling seems to inherently convey anti-therapeutic effects deleterious to patients. As more molecular tools are made available, we will better understand the role of each receptor and its associated signalling cascade in Parkinson's disease and L-dopa-induced dyskinesia, hopefully in a way amenable to patients.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disorder caused by the degeneration of the pigmented neurons of the substantia nigra pars compacta (SNc) that provide dopamine (DA) input to the striatum [1]. Symptomatic hallmarks of PD are bradykinesia, rigidity, postural instability and tremor. The current pharmaceutical therapies for PD enhance synaptic DA transmission using DA receptor agonists or the DA precursor L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa), which remains, by far, the most effective symptomatic therapy. However, in the majority of PD patients, chronic DA replacement therapy leads to involuntary

aimless movements known as L-dopa-induced dyskinesia (LID) [2–4].

While the mechanisms involved in LID occurrence are still unclear, DA receptors have of course received much attention and are thought to have a central role in their appearance [5,6]. The DA receptors belong to the superfamily of G protein-coupled receptors (GPCRs). Five distinct subtypes of DA receptors mediate the actions of DA, three of which (D2R, D3R, and D4R) belong to the D2R-like family and two of which (D1R and D5R) belong to the D1R-like family [7]. DA effects in the striatum are mediated principally through the D1R and D2R subtypes, the expression of which is segregated to the direct and indirect pathways of striatal projection neurons [8], respectively. In contrast, the D3R is expressed at lower levels than the D1R and D2R. It has a specific distribution to limbic areas [9,10], such as the ventromedial shell of the nucleus accumbens where it is expressed by substance P and neurotensin-expressing neurons that project to the ventral pallidum [11,12], the olfactory tubercle, and the islands of Calleja [13,14]. Interestingly, in normal non-DA-depleted dorsal striatum, D3R expression is almost absent in rodents [15] and very low in primates [16].

In the dorsal striatum, the GABAergic medium spiny neurons (MSNs) represent approximately 95% of all neurons. These neurons give rise to two pathways that connect the striatum to the output nuclei of the basal ganglia, namely the globus pallidus pars internalis and the substantia nigra pars reticulata [17]. MSNs in the “direct pathway” project directly from the putamen to globus pallidus pars internalis and the substantia nigra pars reticulata. They contain the D1R, co-express the peptides substance P and dynorphin, and provide a direct inhibitory effect on basal ganglia output neurons. Neurons in the “indirect pathway” connect the putamen with the globus pallidus pars internalis/substantia nigra pars reticulata via the globus pallidus pars externalis and subthalamic nucleus. They bear the D2R and enkephalin peptides [18]. Projections from

Abbreviations

6-OHDA	6-hydroxydopamine
AC	adenylyl cyclase
AIMs	abnormal involuntary movements
cAMP	cyclic adenosine 3',5'-monophosphate
D1R	D1 dopamine receptor
D2R	D2 dopamine receptor
D3R	D3 dopamine receptor
DA	dopamine
DARPP-32	dopamine and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-regulated phosphoprotein, 32 kDa
ERK	extracellular signal-regulated kinase
GPCR	G protein-coupled receptors
L-dopa	L-3,4-dihydroxyphenylalanine
LID	L-dopa-induced dyskinesia
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase 1
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MSN	medium spiny neurons
PD	Parkinson's disease
RGS	regulatory GPCR signalling protein
SNC	substantia nigra pars compacta

* Correspondence to: Erwan Bezard, CNRS UMR 5227, 146 rue Léon Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France. Tel.: +33 557571540; fax: +33 556986182.

E-mail address: erwan.bezard@u-bordeaux2.fr (E. Bezard).

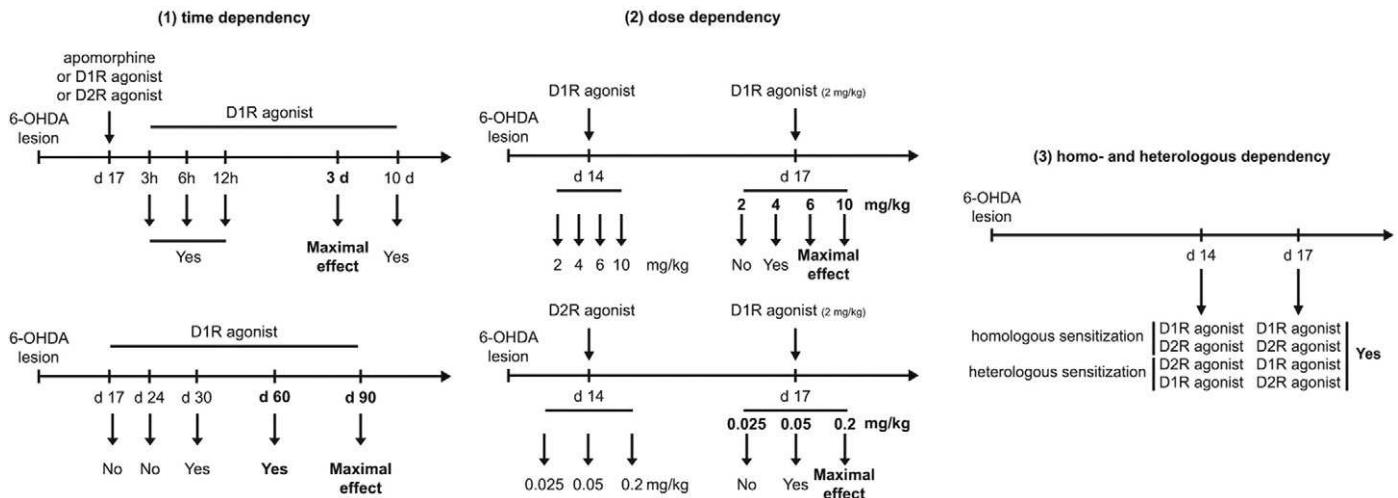


Fig. 1. Summary of behavioural sensitization data. Rotational behaviour is measured in the unilateral 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-lesioned rat model of PD after challenges by D1R, D2R and mixed D1R/D2R agonists to study the pharmacological basis of the “priming” phenomenon. “Priming” is dependent on (1) time, (2) drug dose, and (3) homo- or heterologous sensitization.

the putamen to globus pallidus pars externalis and from globus pallidus pars externalis to subthalamic nucleus are GABAergic and inhibitory. Thus, the direct and indirect pathways have opposing effects on movements: activation of the direct striatonigral pathway disinhibits thalamocortical neurons and facilitates motor activity, whereas activation of the indirect striatopallidal pathway enhances inhibition on thalamocortical neurons and reduces motor activity [17]. These two pathways are distinct anatomically, but, in non-human primates, a significant proportion (25–30%) of the MSNs co-express the D1R and D2R [19].

A myriad of studies, most of which are from Di Chiara's team, have shown that D1R and D2R stimulation sensitizes rotational response [20–22]. The most used and simplest model of behavioural sensitization takes advantage of the unilateral 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-lesioned rat model. DA receptor agonists of both the D1R and D2R provoke a rotation contralateral to the side of the lesion. In this model, the “priming” administration of a D1R agonist sensitizes the animal to the effect of a subsequent challenge with a DA receptor agonist with a peak in behavioural effect 3 days later [20,21] (Fig. 1). However, a single dose of a DA receptor agonist administered to drug-naïve rats 60 or 90 days after 6-OHDA lesion induces contralateral turning behaviour without previous pre-treatment with a DA receptor agonist [21]. This latter experiment suggests that pre-treatment with a DA receptor agonist is not an absolute requirement for the induction of the DA receptor-dependent supersensitivity and contralateral turning behaviour but would in fact act as a facilitatory factor (Fig. 1). Interestingly, behavioural sensitization could be obtained by challenging the animals: (i) twice with the same DA receptor agonist (homologous sensitization), but also (ii) when challenged with agonists of the two classes of receptors (heterologous sensitization) [22] (Fig. 1). Magnitude of response is, however, far higher when priming and challenging with D1R agonists [20–22].

For decades, this model constituted the best standard in rodent research until a few researchers began to look at rodents for what they are physically able to perform. In the late 1990s, Cenci and collaborators developed the abnormal involuntary movement (AIM) rating in the L-dopa-treated 6-OHDA-lesioned rat [23]. AIMs were classified into four subtypes: axial, limb orolingual, and locomotive [23,24]. Each of these four subtypes was scored on a severity scale from 0 to 4 (1, occasional; 2, frequent; 3, continuous but interrupted by sensory distraction; 4, continuous, severe, not interrupted by sensory distraction). They convincingly showed that chronic

treatment with L-dopa (and benserazide) but not bromocriptine (D2R agonist) induces AIMs of the trunk, limb and orolingual region and that only D1R stimulation (not D2R) induces AIMs [24]. Furthermore, L-dopa-induced axial, limb and orolingual AIMs are significantly reduced by the acute supplementary administration of compounds that have antidyskinetic efficacy in primate models of dyskinesia and/or in dyskinetic PD patients (yohimbine, naloxone, 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine, clozapine, amantadine) [24].

Using this rodent model as well as the gold standard 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-lesioned monkey models, numerous data support the involvement of an increased D1R signalling in LID [23,25–27]. The D1R is positively coupled to adenylyl cyclase (AC) (Fig. 2) and induces accumulation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP). The increase in cAMP activates the protein kinase A (PKA), which in turn phosphorylates its targets, such as DA and cAMP-regulated phosphoprotein, 32 kDa (DARPP-32), the DA signal amplifier (Fig. 2). The D1R signalling cascade, therefore activated in direct pathway striatofugal neurons, seems to have a pivotal role in LID genesis. There is a linear relationship between D1R sensitivity and LID severity [27], whereas the relationship with D1R expression levels is less direct. The entire signalling cascade is also impaired. The level of olfactory type G-protein α -subunit (Fig. 2) is significantly increased in the striata of DA-depleted rats and PD patients. Such an increase in capability of transduction leads to an enhancement of DA-stimulated cAMP production in relation with increased AC activity [28]. Chronic L-dopa or D1R agonist (but not D2R/D3R agonists) treatments normalize its levels [28]. The final evidence for involvement of the D1R signalling cascade is provided by the dramatic increase in DARPP-32 and pDARPP-32 levels in dyskinetic animals that correlates with LID severity [26,27,29].

Together with these biochemical alterations, D1R availability to the ligands is pathologically increased in LID. Not only is D1R expression level increased, but D1R subcellular distribution is also modified. Indeed, in dyskinetic rats and monkeys, D1R is more abundant at the plasma membrane compared with control animals [30,31], suggesting that LID is associated with deficiencies in D1R desensitization and trafficking [30,32]. The homologous desensitization process should in theory regulate this aberrant membrane localization. The protein machinery involved in this homologous desensitization process is, however, impaired [32]. GPCR kinases (GRK), which activate dependent receptors by phosphorylation, and arrestins, which bind to phosphorylated receptors

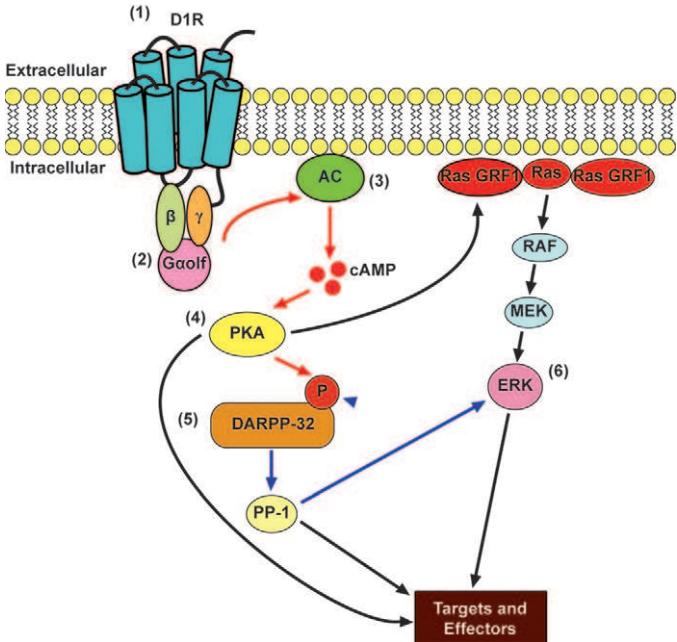


Fig. 2. D1 receptor (D1R) signalling cascades involved in L-dopa-induced dyskinesia. Agonist binding to D1R stimulates adenyl cyclase (AC), increases the production of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) and activates protein kinase A (PKA). PKA phosphorylates various targets, among which the dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein, 32 kDa (DARPP-32), an inhibitor of protein phosphatase 1 (PP-1). The Ras-extracellular signal-regulated kinase (ERK) cascade, a member of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family, parallels this canonical signalling cascade. Both cascades activate various targets and effectors.

blocking further G protein activation and initiating receptor internalization, are both downregulated relative to D1R levels in the striatum of dyskinetic monkeys [32] and rats [33]. Although impaired, internalization is still possible. In dyskinetic animals, D1R retains its ability to internalize after stimulation by D1R agonist [31]. Moreover, this phenomenon is not limited to D1R, as both N-methyl-D-aspartate and alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate (AMPA) receptors are also “recruited” at the membrane in dyskinetic monkeys [34,35].

Such results suggest that the D1R is actively anchored at the plasma membrane when bound by DA, i.e. the natural non-specific DA receptor ligand. Among the various candidates, D3R displays an interesting profile. D1R and D3R are co-expressed by the striatonigral MSNs [36]. Furthermore, the level of expression of the D3R increases in the dorsal motor-related striatum in experimental mouse [37], rat [15] and monkey [16] analogues of dyskinesia. The D1R and D3R have recently been suggested to directly interact [38] through intramembrane D1R-D3R cross-talk [39]. Disruption of such cross-talk should thus affect LID. In keeping with this hypothesis, co-treatment with L-dopa and the D3R antagonist ST 198, known to improve dyskinesia severity in rodent and non-human primate analogues of PD [16,40], restores normal levels of membrane-bound D1R [31] in dyskinetic animals. The co-activation of both the D1R and D3R by their natural ligand DA would thus anchor D1R at the plasma membrane.

Another strategy could be to enhance the activity of the homologous desensitization protein machinery. As both GRK and arrestins are downregulated (relative to D1R content), we hypothesized that increased expression of such key proteins, known to induce internalization in *in vitro* settings, might promote D1R internalization and decrease LID severity. In fact, lentivirally mediated overexpression of GRK6 reduces sensitization behaviour and reduces AIMs in the 6-OHDA rat model and alleviates LID in the monkey model [41].

The reverse hypothesis (i.e. further downregulation of GRK should worsen LID) was tested with a worsening of AIMs when transfecting a GRK6 miRNA. Finally, GRK6 overexpression-induced D1R internalization was clearly highlighted as the key factor leading to these behavioural improvements, whereas subcellular localization of other GPCRs, such as D2R and mGluR5, was not affected [41].

Besides the canonical signalling cascade, other non-canonical cascades might be involved. The extracellular signal-regulated kinase (ERK) signalling cascade (also called mitogen-activated protein kinase) is an important element regulating striatal plasticity and therefore an interesting candidate [42]. Ionotropic and metabotropic glutamate receptors are able to switch on the small GTPases of the Ras family, which in turn activate the Raf/MEK/ERK protein kinase cascade (Fig. 2). Sustained activation of these biochemical pathways leads to synaptic rearrangements requiring *de novo* gene expression and protein synthesis via, for instance, the CREB family of transcription factors. In striatal cells, glutamate and DA receptors interact and provide a route for ERK activation [43–45]. Gerfen and collaborators hypothesized that after lesions of nigrostriatal DA inputs, there is a switch from canonical to non-canonical D1R-mediated signalling [46]. Accordingly, it has been shown that aberrant supersensitivity of D1R leads to ERK hyperactivation in response to L-dopa, and the degree of ERK activation correlates with LID severity in the unilaterally 6-OHDA-lesioned rodent and the MPTP-treated monkey [29,32,46,47]. Remarkably, administration in rodents of an MEK inhibitor or of statins, which are known to inhibit isoprenylation of Ras and subsequently ERK activation, produces a significant amelioration of LID symptoms [29,48]. Targeting such non-canonical signalling offers therapeutic potential, although controlling both the canonical and non-canonical signalling pathways should be the ultimate goal.

While critical involvement of the D1R has clearly been demonstrated, the role of the D2R has received much less attention. Years of behavioural pharmacology, however, undoubtedly show that D2R agonists induce behavioural sensitization [21,22] and dyskinesia in primed animals [5,6]. D2R distribution and expression is not further affected after chronic L-dopa treatment in DA-depleted animals [27,30]. One should admit, however, that the D2R has probably received less attention because the experimental tools are less developed and/or reliable for the D2R than for the D1R (antibodies, transmission assays, etc.). The role of the D2R is therefore only indirectly emphasized. The adenosine A2A receptors are localized in D2R-expressing MSNs and positively coupled to AC, while the D2R is negatively coupled. Accordingly, A2A receptor antagonists exhibit anti-dyskinetic efficacy in experimental models of dyskinesia [49]. Other indirect evidence comes from the regulation of D2R signalling by regulatory GPCR signalling proteins (RGS). RGS9-2 is a GTPase accelerating protein of G α subunits that inhibits D2R-activated G proteins [50] and is expressed almost exclusively in the striatum [51]. Regulation of RGS9-2 expression in various animal models of LID [52] and in L-dopa-exposed PD patients [53] suggests that the striatum attempts to compensate for increased D2R-mediated signalling by increasing RGS9-2 levels, which would result in a better “stop” signal of D2R-mediated transduction. This mechanism obviously fails, since MPTP-lesioned monkeys and L-dopa-treated PD patients do develop LID. We hypothesized that such compensatory mechanisms might be helped by further increasing RGS9-2 levels using viral transfer. In keeping with our hypothesis, although RGS9-2 knockout mice do show worse AIMs than wild-type mice [52], both dyskinetic 6-OHDA-lesioned rats and dyskinetic MPTP-treated monkeys transfected with RGS9-2 did show reduced severity of LID [52]. This positive effect is counterbalanced by the observation that the antiparkinsonian action of D2R agonist is abolished [52], an observation that clearly highlights the complex role of the D2R.

In conclusion, the D1R undoubtedly has a central role in LID genesis and expression with a possible physical interaction (cross-talk) with the D3R, a hypothesis that provides an explanation for the role of the D3R in the dorsal striatum. Finally, the exact role of the D2R is not yet fully understood and requires further attention. Current knowledge of LID pathophysiology indicates that an anti-dyskinetic strategy should target the D1/D3 signalling cascade in the D1-expressing MSNs of the direct pathway, as targeting D2R signalling seems to inherently convey anti-therapeutic effects deleterious to patients. As more molecular tools are made available, we will better understand the role of each receptor and its associated signalling cascade in PD and LID, hopefully in a way amenable to patients.

Authorship

AB and EB wrote, critically revised and approved the manuscript version to be submitted.

Acknowledgements

The Université Victor-Segalen Bordeaux 2 and the Centre National de la Recherche Scientifique provided the infrastructural support. This review was supported by an Agence Nationale de la Recherche grant (EB) and by a Ministère de l'Enseignement et de Recherche grant (AB).

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to disclose.

References

- [1] Ehringer H, Hornykiewicz O. [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klin Wochenschr* 1960;38:1236–9.
- [2] Ahlskog JE, Muentner MD. Frequency of levodopa-related dyskinésias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov Disord* 2001;16:448–58.
- [3] Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Rodríguez M, Lanciego JL, Artieda J, Gonzalo N, et al. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 2000;23(10 Suppl):S8–19.
- [4] Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R. Modification of Parkinsonism – chronic treatment with L-dopa. *N Engl J Med* 1969;280:337–45.
- [5] Bezard E, Brotchie JM, Gross CE. Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: potential for new therapies. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:577–88.
- [6] Jenner P. Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat Rev Neurosci* 2008;9:665–77.
- [7] Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 1998;78:189–225.
- [8] Le Moine C, Bloch B. 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* 1995;355:418–26.
- [9] Landwehrmeyer B, Mengod G, Palacios JM. Dopamine D3 receptor mRNA and binding sites in human brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1993;18:187–92.
- [10] Landwehrmeyer B, Mengod G, Palacios JM. Differential visualization of dopamine D2 and D3 receptor sites in rat brain. A comparative study using *in situ* hybridization histochemistry and ligand binding autoradiography. *Eur J Neurosci* 1993;5:145–53.
- [11] Diaz J, Lévesque D, Griffon N, Lammers CH, Martres MP, Sokoloff P, et al. Opposing roles for dopamine D2 and D3 receptors on neurotensin mRNA expression in nucleus accumbens. *Eur J Neurosci* 1994;6:1384–7.
- [12] Diaz J, Lévesque D, Lammers CH, Griffon N, Martres MP, Schwartz JC, et al. Phenotypic characterization of neurons expressing the dopamine D3 receptor in the rat brain. *Neuroscience* 1995;65:731–45.
- [13] Bouthenet ML, Souil E, Martres MP, Sokoloff P, Giros B, Schwartz JC. Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using *in situ* hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain Res* 1991;564:203–19.
- [14] Lévesque D, Diaz J, Pilon C, Martres MP, Giros B, Souil E, et al. 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* 1992;89:8155–9.
- [15] Bordet R, Ridray S, Carboni S, Diaz J, Sokoloff P, Schwartz JC. Induction of dopamine D3 receptor expression as a mechanism of behavioral sensitization to levodopa. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3363–7.
- [16] Bézard E, Ferry S, Mach U, Stark H, Lerche L, Boraud T, et al. Attenuation of levodopa-induced dyskinesia by normalizing dopamine D3 receptor function. *Nat Med* 2003;9:762–7.
- [17] Alexander GE, Crutcher MD. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 1990;13:266–71.
- [18] Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ Jr, et al. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 1990;250:1429–32.
- [19] Nadjar A, Brotchie JM, Guigoni C, Li Q, Zhou SB, Wang GJ, et al. Phenotype of striatofugal medium spiny neurons in parkinsonian and dyskinetic nonhuman primates: a call for a reappraisal of the functional organization of the basal ganglia. *J Neurosci* 2006;26:8653–61.
- [20] Di Chiara G, Morelli M, Barone P, Pontieri F. Priming as a model of behavioural sensitization. *Dev Pharmacol Ther* 1992;18:223–7.
- [21] Morelli M, Fenu S, Garau L, Di Chiara G. Time and dose dependence of the 'priming' of the expression of dopamine receptor supersensitivity. *Eur J Pharmacol* 1989;162:329–35.
- [22] Morelli M, Di Chiara G. Agonist-induced homologous and heterologous sensitization to D1- and D2-dependent contraversive turning. *Eur J Pharmacol* 1987;141:101–7.
- [23] Cenci MA, Lee CS, Björklund A. L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA. *Eur J Neurosci* 1998;10:2694–706.
- [24] Lundblad M, Andersson M, Winkler C, Kirik D, Wierup N, Cenci MA. Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 2002;15:120–32.
- [25] Berke JD, Paletzki RF, Aronson GJ, Hyman SE, Gerfen CR. A complex program of striatal gene expression induced by dopaminergic stimulation. *J Neurosci* 1998;18:5301–10.
- [26] Picconi B, Centonze D, Häkansson K, Bernardi G, Greengard P, Fisone G, et al. Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat Neurosci* 2003;6:501–6.
- [27] Aubert I, Guigoni C, Häkansson K, Li Q, Dovero S, Barthe N, et al. Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia. *Ann Neurol* 2005;57:17–26.
- [28] Corvol JC, Muriel MP, Valjent E, Féger J, Hanoun N, Girault JA, et al. Persistent increase in olfactory type G-protein alpha subunit levels may underlie D1 receptor functional hypersensitivity in Parkinson disease. *J Neurosci* 2004;24:7007–14.
- [29] Santini E, Valjent E, Usiello A, Carta M, Borgkvist A, Girault JA, et al. Critical involvement of cAMP/DARPP-32 and extracellular signal-regulated protein kinase signaling in L-DOPA-induced dyskinesia. *J Neurosci* 2007;27:6995–7005.
- [30] Guigoni C, Doudnikoff E, Li Q, Bloch B, Bezard E. Altered D(1) dopamine receptor trafficking in parkinsonian and dyskinetic non-human primates. *Neurobiol Dis* 2007;26:452–63.
- [31] Berthet A, Porras G, Doudnikoff E, Stark H, Cador M, Bezard E, et al. Pharmacological analysis demonstrates dramatic alteration of D1 dopamine receptor neuronal distribution in the rat analog of L-DOPA-induced dyskinesia. *J Neurosci* 2009;29:4829–35.
- [32] Bezard E, Gross CE, Qin L, Gurevich VV, Benovic JL, Gurevich EV. L-DOPA reverses the MPTP-induced elevation of the arrestin2 and GRK6 expression and enhanced ERK activation in monkey brain. *Neurobiol Dis* 2005;18:323–35.
- [33] Ahmed MR, Bychkov E, Gurevich VV, Benovic JL, Gurevich EV. Altered expression and subcellular distribution of GRK subtypes in the dopamine-depleted rat basal ganglia is not normalized by L-DOPA treatment. *J Neurochem* 2008;104:1622–36.
- [34] Hallett PJ, Dunah AW, Ravenscroft P, Zhou S, Bezard E, Crossman AR, et al. Alterations of striatal NMDA receptor subunits associated with the development of dyskinesia in the MPTP-lesioned primate model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology* 2005;48:503–16.
- [35] Silverdale MA, Kobylecki C, Hallett PJ, Li Q, Dunah AW, Ravenscroft P, et al. Synaptic recruitment of AMPA glutamate receptor subunits in levodopa-induced dyskinesia in the MPTP-lesioned non-human primate. *Synapse* In press 2009.
- [36] Bordet R, Ridray S, Schwartz JC, Sokoloff P. Involvement of the direct striatonigral pathway in levodopa-induced sensitization in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Eur J Neurosci* 2000;12:2117–23.
- [37] Gross CE, Ravenscroft P, Dovero S, Jaber M, Bioulac B, Bezard E. Pattern of levodopa-induced striatal changes is different in normal and MPTP-lesioned mice. *J Neurochem* 2003;84:1246–55.
- [38] Fiorentini C, Busi C, Gorruso E, Gotti C, Spano P, Missale C. Reciprocal regulation of dopamine D1 and D3 receptor function and trafficking by heterodimerization. *Mol Pharmacol* 2008;74:59–69.

- [39] Marcellino D, Ferré S, Casadó V, Cortés A, Le Foll B, Mazzola C, et al. Identification of dopamine D1-D3 receptor heteromers. Indications for a role of synergistic D1-D3 receptor interactions in the striatum. *J Biol Chem* 2008;283:26016–25.
- [40] Visanji NP, Fox SH, Johnston T, Reyes G, Millan MJ, Brotchie JM. Dopamine D3 receptor stimulation underlies the development of L-DOPA-induced dyskinesia in animal models of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2008;35:184–92.
- [41] Ahmed MR, Berthet A, Bychkov E, Li Q, Porras G, Bioulac BH, et al. Lentivirally-mediated overexpression of GRK6 alleviates L-DOPA-induced dyskinesia in experimental Parkinson's disease. 2009. In revision.
- [42] Brambilla R. Targeting Ras/ERK signaling in the striatum: will it help? *Mol Psychiatry* 2003;8:366–8.
- [43] Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Ciamei A, Fasano S, Pakhotin P, Krezel W, et al. Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron* 2002;34:807–20.
- [44] Valjent E, Corvol JC, Pages C, Besson MJ, Maldonado R, Caboche J. Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. *J Neurosci* 2000;20:8701–9.
- [45] Valjent E, Pascoli V, Svensson P, Paul S, Enslen H, Corvol JC, et al. Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:491–6.
- [46] Gerfen CR, Miyachi S, Paletzki R, Brown P. D1 dopamine receptor super-sensitivity in the dopamine-depleted striatum results from a switch in the regulation of ERK1/2/MAP kinase. *J Neurosci* 2002;22:5042–54.
- [47] Westin JE, Vercammen L, Strome EM, Konradi C, Cenci MA. 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* 2007;62:800–10.
- [48] Schuster S, Nadjar A, Guo JT, Li Q, Ittrich C, Hengerer B, et al. 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* 2008;28:4311–6.
- [49] Jenner P. A2A antagonists as novel non-dopaminergic therapy for motor dysfunction in PD. *Neurology* 2003;61(11 Suppl 6):S32–8.
- [50] Rahman Z, Schwarz J, Gold SJ, Zachariou V, Wein MN, Choi KH, et al. RGS9 modulates dopamine signaling in the basal ganglia. *Neuron* 2003;38:941–52.
- [51] Rahman Z, Gold SJ, Potenza MN, Cowan CW, Ni YG, He W, et al. Cloning and characterization of RGS9-2: a striatal-enriched alternatively spliced product of the RGS9 gene. *J Neurosci* 1999;19:2016–26.
- [52] Gold SJ, Hoang CV, Potts BW, Porras G, Pioli E, Kim KW, et al. RGS9-2 negatively modulates L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia in experimental Parkinson's disease. *J Neurosci* 2007;27:14338–48.
- [53] Tekumalla PK, Calon F, Rahman Z, Birdi S, Rajput AH, Hornykiewicz O, et al. Elevated levels of DeltaFosB and RGS9 in striatum in Parkinson's disease. *Biol Psychiatry* 2001;50:813–6.

V.D.) Article annexe 4

GRK6, une nouvelle piste thérapeutique pour diminuer les dyskinésies L-dopa induites

Amandine Berthet, Erwan Bézard

Médecine / Sciences, Volume 26, n°10, Octobre 2010, Pages 14-17

NOUVELLE

GRK6, une nouvelle piste thérapeutique pour diminuer les dyskinésies L-dopa induites

Amandine Berthet, Erwan Bézard

Université Victor Segalen-Bordeaux 2,
Centre national de la recherche scientifique,
Institut des neurosciences de Bordeaux,
UMR 5227, 33000 Bordeaux, France.
erwan.bezard@u-bordeaux2.fr

Dyskinésies induites par le traitement de la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative caractérisée notamment par la perte progressive des neurones dopaminergiques pigmentés de la substance noire [1]. Cliniquement, le syndrome parkinsonien repose sur une triade de symptômes moteurs associant akinésie/bradykinésie (difficulté à l'initiation des mouvements et ralentissement de leur exécution), rigidité et tremblement de repos. Ces manifestations cliniques s'associent différemment selon les patients. Les traitements de la maladie de Parkinson ont pour objectif de remplacer la dopamine par l'utilisation, soit d'agonistes dopaminergiques, soit de la L-dopa, un précurseur de la dopamine. Ces traitements sont effi-

caces pendant quelques années mais restent toutefois insatisfaisants. Non seulement ils ne résolvent pas l'ensemble des problèmes rencontrés par les patients, mais ils induisent des complications motrices appelées dyskinésies, ensemble de mouvements anormaux involontaires, et des fluctuations dans la réponse au traitement [2]. À ce jour, il n'existe pas de traitement efficace des dyskinésies induites par la L-dopa mais seulement des stratégies dilatoires. La première vise à retarder l'exposition à la L-dopa par un traitement à base d'agonistes dopaminergiques. Ce traitement peut être administré seul ou en association avec la L-dopa au cours de la phase initiale de la maladie. La seconde tend à stabiliser les taux de L-dopa en la remplaçant par des formes

retard ou en réduisant sa dégradation grâce à l'association d'inhibiteurs de la catéchol-0-méthyl-transférase (entacapone) ou d'inhibiteurs de la monoamine oxydase B (sélégiline, rasagiline). La troisième a recours à l'amantadine, la seule molécule anti-dyskinétique disponible, quoique d'efficacité limitée et source d'effets secondaires psychogéniques indésirables. Enfin, lorsque ces approches n'ont plus d'effet, une intervention neurochirurgicale est proposée telle que la stimulation cérébrale profonde du noyau sous-thalamique.

Rôle central des récepteurs à la dopamine dans l'apparition des dyskinésies

Notre connaissance des mécanismes cellulaires impliqués dans la physio-

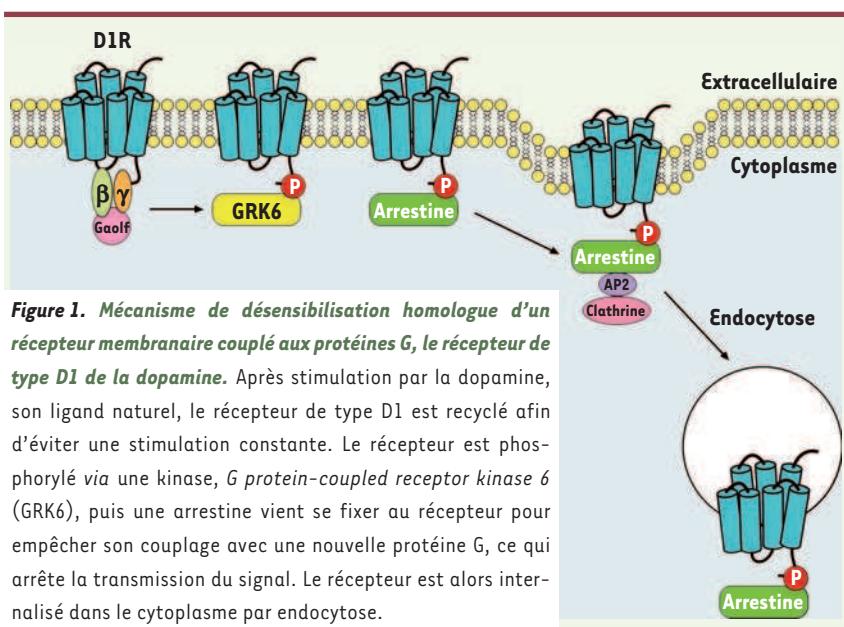


Figure 1. Mécanisme de désensibilisation homologue d'un récepteur membranaire couplé aux protéines G, le récepteur de type D1 de la dopamine. Après stimulation par la dopamine, son ligand naturel, le récepteur de type D1 est recyclé afin d'éviter une stimulation constante. Le récepteur est phosphorylé via une kinase, *G protein-coupled receptor kinase 6* (GRK6), puis une arrestine vient se fixer au récepteur pour empêcher son couplage avec une nouvelle protéine G, ce qui arrête la transmission du signal. Le récepteur est alors internalisé dans le cytoplasme par endocytose.

pathologie des dyskinésies, qui était parcellaire au début des années 2000, a grandement évolué. La déplétion dopaminergique caractéristique de la maladie de Parkinson provoque de nombreux changements dans la signalisation des récepteurs de la dopamine. Ces dérèglements sont aggravés par le traitement chronique à la L-dopa et conduisent progressivement à l'apparition des dyskinésies. De nombreuses études contribuent à montrer que les récepteurs de la dopamine, qui appartiennent à la super-famille des récepteurs membranaires couplés aux protéines G (RCPG), et plus particulièrement le récepteur de type D1, jouent un rôle central dans l'apparition des dyskinésies [1]. Notre équipe a précédemment mis en évidence l'augmentation de l'expression des récepteurs D1 et de leur couplage aux protéines G au niveau des neurones striataux dans un modèle primate chez lequel la maladie de Parkinson était induite par la 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydroxyridine (MPTP) – une neurotoxine qui détruit spécifiquement les neurones dopaminergiques. Les animaux développent des dyskinésies après un traitement chronique par la L-dopa [3]. Ces données suggèrent que l'hypersensibilité des récepteurs D1 à la dopamine

observée dans le striatum peut jouer un rôle dans la physiopathologie des dyskinésies. Cette hypersensibilisation peut s'expliquer par: (1) l'augmentation du nombre de récepteurs D1 à la membrane plasmique des neurones épineux de taille moyenne du striatum (structure cible de la dopamine) lors des dyskinésies [4, 5], alors qu'ils devraient être internalisés après avoir été stimulés par leur ligand naturel, la dopamine, et (2) par la diminution de l'expression des composants de la machinerie de désensibilisation homologue [6]. La désensibilisation homologue est le processus d'internalisation qui survient en réponse à une stimulation (Figure 1). En effet, lorsque les dyskinésies sont manifestes, une réduction du niveau d'expression de deux protéines impliquées dans ce processus, la GRK6 (*G protein-coupled receptor kinase 6*), une kinase qui phosphoryle le RCPG, et l'arrestine 2, qui empêche le couplage du récepteur à une nouvelle protéine G pour permettre l'arrêt de la transmission du signal [8] (Figure 1), est démontrée.

Réduction des dyskinésies par la surexpression de GRK6

En collaboration avec l'équipe américaine de E.V. Gurevich (Université

Vanderbilt de Nashville), nous avons tenté de corriger ce déficit en GRK6 dans le but de restaurer une désensibilisation homologue du récepteur D1. L'étude des effets comportementaux que provoque la surexpression de GRK6 obtenue par transfert du gène codant GRK6 via un vecteur lentiviral injecté par voie intracérébrale a été menée chez deux modèles animaux de la maladie de Parkinson traités avec de la L-dopa [7] (Figure 2). Cette thérapie génique a permis de réduire considérablement la sévérité des dyskinésies. La réduction de la sévérité des dyskinésies a d'abord été observée dans un modèle animal simple de la maladie de Parkinson, celui du rat chez lequel une déplétion unilatérale en dopamine est induite par injection intracérébrale de 6-hydroxydopamine. Une fois cette étape de faisabilité acquise, nous avons répété ces travaux chez le singe macaque intoxiqué au MPTP, le modèle expérimental de référence de la maladie (Figure 2). Dans ce modèle, la surexpression de GRK6 dans le striatum permet de diminuer la sévérité des dyskinésies de façon remarquable et de restaurer les effets thérapeutiques de la L-dopa. En effet, GRK6 prolonge l'effet antiparkinsonien de la L-dopa, les singes macaques bénéficiant ainsi plus longtemps de faibles doses. Ces effets sont la conséquence de la restauration des mécanismes de désensibilisation homologue. La surexpression de GRK6 entraîne en effet l'internalisation spécifique des récepteurs D1 sans que la localisation subcellulaire d'autres récepteurs, comme les récepteurs de type D2 [1] et les récepteurs au glutamate (mGluR5), ne soit affectée. L'ensemble de ces données souligne l'importance du rôle fonctionnel de GRK6 dans les mécanismes sous-jacents des dyskinésies. L'enjeu principal de notre stratégie était de réduire la signalisation pathologique pour réduire les dyskinésies tout en préservant l'action antiparkinsonienne bénéfique de la L-dopa, qui intervient également via les récepteurs à la dopamine. Ces travaux valident GRK6

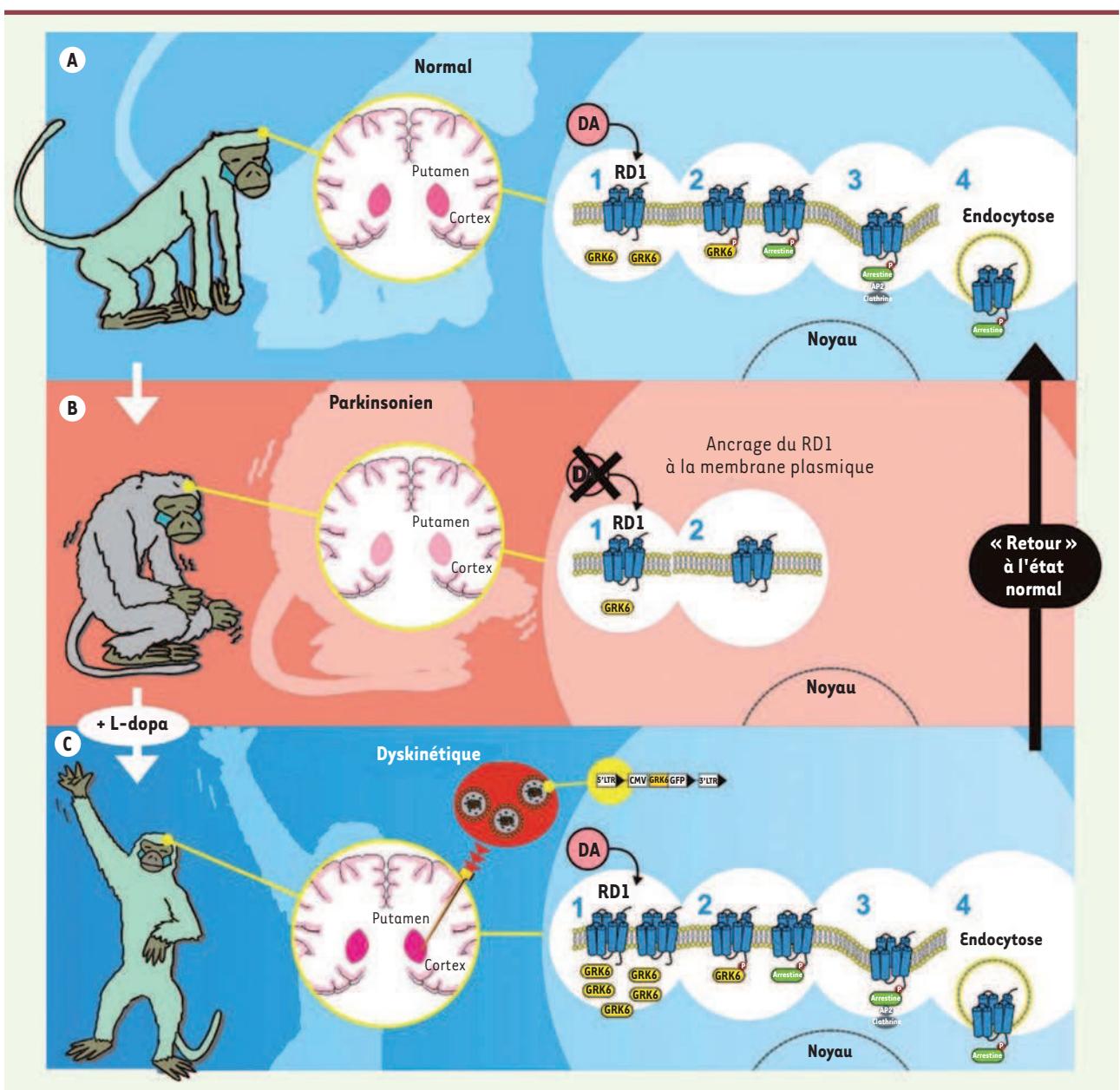


Figure 2. Comment le traitement par GRK6 marche-t-il ?

A. La dopamine se trouve dans le striatum (zone rose) chez le singe normal. Elle transmet le signal via ses récepteurs, en particulier le récepteur de type D1. Après stimulation par la dopamine, le récepteur est recyclé pour éviter une stimulation continue. Les protéines impliquées dans ce processus sont, par exemple, GRK6 (jaune) et arrestine 2 (vert).

B. La maladie de Parkinson est causée par la déplétion dopaminergique dans le striatum (zone rose pâle). La dopamine ne se lie plus au récepteur et aucun signal n'est transmis. Les récepteurs séjournent à la surface du neurone. Le traitement de référence de la maladie de Parkinson, la L-dopa, précurseur de la dopamine, échoue à inverser cet ancrage à la membrane. Ceci est la conséquence d'une diminution de la disponibilité des protéines capables de les retirer de la membrane (moins de GRK6 comme illustré).

C. Les dyskinésies, mouvements involontaires anormaux survenant après un traitement par la L-dopa sur une longue période, pourraient être diminuées par la surexpression de GRK6 dans le striatum. Dans cette situation, l'apport de L-dopa entraîne une augmentation massive des taux de dopamine dans le striatum (zone rose foncé sur la coupe de cerveau). Pour obtenir la surexpression de la protéine d'intérêt, le gène de GRK6 a été inséré dans un lentivirus. Ce lentivirus est ensuite chirurgicalement injecté dans le striatum. L'expression accrue des GRK6 (représenté par l'augmentation du nombre d'ovales jaunes) permet alors l'internalisation, donc le retrait de la surface des neurones des récepteurs de type D1, et, par conséquent, la diminution de la sévérité des mouvements anormaux involontaires. Les animaux dyskinétiques peuvent alors pleinement bénéficier du traitement à la L-dopa : leurs symptômes parkinsoniens sont améliorés et ils ne présentent plus de dyskinésies sévères.

en tant que cible thérapeutique d'intérêt pour traiter les dyskinésies et les fluctuations de la réponse thérapeutique à la L-dopa. Une stratégie de thérapie génique requérant l'utilisation de vecteurs viraux n'est toutefois pas privilégiée pour développer un nouveau traitement. Nous avons donc adopté une stratégie de cible pharmacologique pour identifier de petites molécules mimant l'action de GRK6. Au-delà des effets bénéfiques potentiels dans les dyskinésies induites par la L-dopa, ce type d'approche pourrait avoir un intérêt dans d'autres troubles neuropsychiatris associés à une hyperdopaminergie comme la schizophrénie et l'addiction aux psychostimulants. ♦

GRK6, a new therapeutic approach to alleviate L-dopa-induced dyskinesia

CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Thibault D, Kortleven C, Fasano C, et al. Découvertes récentes sur la fonction et la plasticité des voies dopaminergiques du cerveau. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 165-70.
2. Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R. Modification of Parkinsonism-chronic treatment with L-dopa. *N Engl J Med* 1969 ; 280 : 337-45.
3. Aubert I, Guigoni C, Hakansson K, et al. Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia. *Ann Neurol* 2005 ; 57 : 17-26.
4. Guigoni C, Doudnikoff E, Li Q, et al. Altered D1 dopamine receptor trafficking in parkinsonian and dyskinetic non-human primates. *Neurobiol Dis* 2007 ; 26 : 452-63.
5. Berthet A, Porras G, Doudnikoff E, et al. Pharmacological analysis demonstrates dramatic alteration of D1 dopamine receptor neuronal distribution in the rat analog of L-DOPA-induced dyskinesia. *J Neurosci* 2009 ; 29 : 4829-35.
6. Bezard E, Gross CE, Qin L, et al. L-DOPA reverses the MPTP-induced elevation of the arrestin2 and GRK6 expression and enhanced ERK activation in monkey brain. *Neurobiol Dis* 2005 ; 18 : 323-35.
7. Ahmed MR, Berthet A, Bychkov E, et al. Lentiviral overexpression of GRK6 alleviates L-dopa-induced dyskinesia in experimental Parkinson's disease. *Sci Transl Med* 2010 ; 2 : 28ra28.
8. Métyé T, Perdrisot R, Kraimps JL. GRK et arrestines : la piste thérapeutique ? *Med Sci (Paris)* 2006 ; 22 : 537-43.

Références Bibliographiques

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abeliovich A, Schmitz Y, Farinas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JM, Armanini M, Ryan A, Hynes M, Phillips H, Sulzer D, Rosenthal A (2000) Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25:239-252.
- Agid Y (1991) Parkinson's disease: pathophysiology. *Lancet* 337:1321-1324.
- Agid Y, Graybiel AM, Ruberg M, Hirsch E, Blin J, Dubois B, Javoy-Agid F (1990) The efficacy of levodopa treatment declines in the course of Parkinson's disease: do nondopaminergic lesions play a role? *Adv Neurol* 53:83-100.
- Agid Y, Ruberg M, Javoy-Agid F, Hirsch E, Raisman-Vozari R, Vyas S, Faucheux B, Michel P, Kastner A, Blanchard V, et al. (1993) Are dopaminergic neurons selectively vulnerable to Parkinson's disease? *Adv Neurol* 60:148-164.
- Ahmed MR, Bychkov E, Gurevich VV, Benovic JL, Gurevich EV (2008) Altered expression and subcellular distribution of GRK subtypes in the dopamine-depleted rat basal ganglia is not normalized by l-DOPA treatment. *J Neurochem* 104:1622-1636.
- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12:366-375.
- Alexander GE, Crutcher MD (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 13:266-271.
- Almirall H, Pigarev I, de la Calzada MD, Pigareva M, Herrero MT, Sagales T (1999) Nocturnal sleep structure and temperature slope in MPTP treated monkeys. *J Neural Transm* 106:1125-1134.
- Anden NE, Magnusson T, Rosengren E (1964) On the presence of dihydroxyphenylalanine decarboxylase in nerves. *Experientia* 20:328-329.
- 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.
- Arai N, Misugi K, Goshima Y, Misu Y (1990) Evaluation of a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated C57 black mouse model for parkinsonism. *Brain Res* 515:57-63.
- Arancibia-Carcamo IL, Yuen EY, Muir J, Lumb MJ, Michels G, Saliba RS, Smart TG, Yan Z, Kittler JT, Moss SJ (2009) Ubiquitin-dependent lysosomal targeting of GABA(A) receptors regulates neuronal inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:17552-17557.

- Aubert I, Ghorayeb I, Normand E, Bloch B (2000) Phenotypical characterization of the neurons expressing the D1 and D2 dopamine receptors in the monkey striatum. *J Comp Neurol* 418:22-32.
- 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.
- Aziz TZ, Peggs D, Sambrook MA, Crossman AR (1991) Lesion of the subthalamic nucleus for the alleviation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonism in the primate. *Mov Disord* 6:288-292.
- Barneoud P, Parmentier S, Mazadier M, Miquet JM, Boireau A, Dubedat P, Blanchard JC (1995) Effects of complete and partial lesions of the dopaminergic mesotelencephalic system on skilled forelimb use in the rat. *Neuroscience* 67:837-848.
- Barraud Q, Ghorayeb I Effect of dopaminergic treatments upon MPTP-induced sleep/wake disturbances (in preparation).
- Bellissimo MI, Kouzmine I, Ferro MM, de Oliveira BH, Canteras NS, Da Cunha C (2004) Is the unilateral lesion of the left substantia nigra pars compacta sufficient to induce working memory impairment in rats? *Neurobiol Learn Mem* 82:150-158.
- Belluscio L, Gold GH, Nemes A, Axel R (1998) Mice deficient in G(olf) are anosmic. *Neuron* 20:69-81.
- Benazzouz A, Gross C, Feger J, Boraud T, Bioulac B (1993) Reversal of rigidity and improvement in motor performance by subthalamic high-frequency stimulation in MPTP-treated monkeys. *Eur J Neurosci* 5:382-389.
- Benazzouz A, Boraud T, Feger J, Burbaud P, Bioulac B, Gross C (1996) Alleviation of experimental hemiparkinsonism by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus in primates: a comparison with L-Dopa treatment. *Mov Disord* 11:627-632.
- Bennett BD, Bolam JP (1994a) Localisation of parvalbumin-immunoreactive structures in primate caudate-putamen. *J Comp Neurol* 347:340-356.
- Bennett BD, Bolam JP (1994b) Synaptic input and output of parvalbumin-immunoreactive neurons in the neostriatum of the rat. *Neuroscience* 62:707-719.
- Benovic JL, Strasser RH, Caron MG, Lefkowitz RJ (1986) Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:2797-2801.
- Bergman H, Wichmann T, DeLong MR (1990) Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science* 249:1436-1438.

- Bergman H, Wichmann T, Karmon B, DeLong MR (1994) The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism. *J Neurophysiol* 72:507-520.
- Bergman H, Raz A, Feingold A, Nini A, Nelken I, Hansel D, Ben-Pazi H, Reches A (1998) Physiology of MPTP tremor. *Mov Disord* 13 Suppl 3:29-34.
- Bergson C, Mrzljak L, Smiley JF, Pappy M, Levenson R, Goldman-Rakic PS (1995) Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain. *J Neurosci* 15:7821-7836.
- 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.
- Bezard E, Brotchie JM, Gross CE (2001a) Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia : Potential for new therapies. *Nature Rev Neurosci* 2:577-588.
- Bezard E, Imbert C, Deloire X, Bioulac B, Gross CE (1997) A chronic MPTP model reproducing the slow evolution of Parkinson's disease: evolution of motor symptoms in the monkey. *Brain Res* 766:107-112.
- Bezard E, Gerlach I, Moratalla R, Gross CE, Jork R (2006) 5-HT1A receptor agonist-mediated protection from MPTP toxicity in mouse and macaque models of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 23:77-86.
- Bezard E, Gross CE, Qin L, Gurevich VV, Benovic JL, Gurevich EV (2005) L-DOPA reverses the MPTP-induced elevation of the arrestin2 and GRK6 expression and enhanced ERK activation in monkey brain. *Neurobiol Dis* 18:323-335.
- 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.
- Bezard E, Dovero S, Prunier C, Ravenscroft P, Chalon S, Guilloteau D, Crossman AR, Bioulac B, Brotchie JM, Gross CE (2001b) Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 21:6853-6861.
- Bingol B, Schuman EM (2006) Activity-dependent dynamics and sequestration of proteasomes in dendritic spines. *Nature* 441:1144-1148.
- Birkmayer W, Hornykiewicz O (1961) [The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia.]. *Wien Klin Wochenschr* 73:787-788.
- Björklund A, Dunnett SB (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 30:194-202.

- Blaschko H (1939) The specific action of L-dopa decarboxylase. *J Physiol* 96:50-51.
- Bloch B, Dumartin B, Bernard V (1999) In vivo regulation of intraneuronal trafficking of G protein-coupled receptors for neurotransmitters. *Trends Pharmacol Sci* 20:315-319.
- Bloem BR (1992) Postural instability in Parkinson's disease. *Clin Neurol Neurosurg* 94 Suppl:S41-45.
- Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM (2001) Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 65:135-172.
- Bolam JP, Smith Y (1990) The GABA and substance P input to dopaminergic neurones in the substantia nigra of the rat. *Brain Res* 529:57-78.
- Bonuccelli U, Lucetti C, Del Dotto P, Ceravolo R, Gambaccini G, Bernardini S, Rossi G, Piaggesi A (2003) Orthostatic hypotension in de novo Parkinson disease. *Arch Neurol* 60:1400-1404.
- Boraud T, Bezard E, Bioulac B, Gross CE (2001) Dopamine agonist-induced dyskinesias are correlated to both firing pattern and frequency alterations of pallidal neurones in the MPTP-treated monkey. *Brain* 124:546-557.
- 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.
- 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.
- Borg M, Bayreuther C (2008) [Dopamine dysregulation syndrome in Parkinson's disease]. *Rev Neurol (Paris)* 164:310-321.
- Bouthenet ML, Souil E, Martres MP, Sokoloff P, Giros B, Schwartz JC (1991) Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain Res* 564:203-219.
- Braak H, Del Tredici K, Bratzke H, Hamm-Clement J, Sandmann-Keil D, Rub U (2002) Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *J Neurol* 249 Suppl 3:III/1-5.
- Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24:197-211.

- Bradke F, Dotti CG (1998) Membrane traffic in polarized neurons. *Biochim Biophys Acta* 1404:245-258.
- Braga R, Kouzmine I, Canteras NS, Da Cunha C (2005) Lesion of the substantia nigra, pars compacta impairs delayed alternation in a Y-maze in rats. *Exp Neurol* 192:134-141.
- Braun BC, Glickman M, Kraft R, Dahlmann B, Kloetzel PM, Finley D, Schmidt M (1999) The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol* 1:221-226.
- Brooks DJ, Sagar H (2003) Entacapone is beneficial in both fluctuating and non-fluctuating patients with Parkinson's disease: a randomised, placebo controlled, double blind, six month study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74:1071-1079.
- Bunemann M, Hosey MM (1999) G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling. *J Physiol* 517 (Pt 1):5-23.
- 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.
- Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM, Kopin IJ (1983) A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:4546-4550.
- Byrne JH, Kandel ER (1996) Presynaptic facilitation revisited: state and time dependence. *J Neurosci* 16:425-435.
- Caille I, Dumartin B, Bloch B (1996) Ultrastructural localization of D1 dopamine receptor immunoreactivity in rat striatonigral neurons and its relation with dopaminergic innervation. *Brain Res* 730:17-31.
- Calon F, Morissette M, Ghribi O, Goulet M, Grondin R, Blanchet PJ, Bedard PJ, Di Paolo T (2002) Alteration of glutamate receptors in the striatum of dyskinetic 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated monkeys following dopamine agonist treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26:127-138.
- Caparros-Lefebvre D, Elbaz A (1999) Possible relation of atypical parkinsonism in the French West Indies with consumption of tropical plants: a case-control study. Caribbean Parkinsonism Study Group. *Lancet* 354:281-286.
- Carboni E, Imperato A, Perezzi L, Di Chiara G (1989) Amphetamine, cocaine, phencyclidine and nomifensine increase extracellular dopamine concentrations preferentially in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Neuroscience* 28:653-661.

- Carlsson A (1959) The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol Rev* 11:490-493.
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T (1957) 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* 180:1200.
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T, Waldeck B (1958) On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science* 127:471.
- Carman CV, Benovic JL (1998) G-protein-coupled receptors: turn-ons and turn-offs. *Curr Opin Neurobiol* 8:335-344.
- Carman LS, Gage FH, Shults CW (1991) Partial lesion of the substantia nigra: relation between extent of lesion and rotational behavior. *Brain Res* 553:275-283.
- Carta M, Carlsson T, Kirik D, Bjorklund A (2007) Dopamine released from 5-HT terminals is the cause of L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats. *Brain* 130:1819-1833.
- Cash R, Dennis T, L'Heureux R, Raisman R, Javoy-Agid F, Scatton B (1987) Parkinson's disease and dementia: norepinephrine and dopamine in locus ceruleus. *Neurology* 37:42-46.
- 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.
- Cenci MA, Whishaw IQ, Schallert T (2002) Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? *Nat Rev Neurosci* 3:574-579.
- Chain DG, Casadio A, Schacher S, Hegde AN, Valbrun M, Yamamoto N, Goldberg AL, Bartsch D, Kandel ER, Schwartz JH (1999) Mechanisms for generating the autonomous cAMP-dependent protein kinase required for long-term facilitation in Aplysia. *Neuron* 22:147-156.
- Chaumette T, Lebouvier T, Aubert P, Lardeux B, Qin C, Li Q, Accary D, Bezard E, Bruley des Varannes S, Derkinderen P, Neunlist M (2009) Neurochemical plasticity in the enteric nervous system of a primate animal model of experimental Parkinsonism. *Neurogastroenterol Motil* 21:215-222.
- Chia LG, Ni DR, Cheng LJ, Kuo JS, Cheng FC, Dryhurst G (1996) Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 5,7-dihydroxytryptamine on the locomotor activity and striatal amines in C57BL/6 mice. *Neurosci Lett* 218:67-71.
- Chiang MC, Chen HM, Lai HL, Chen HW, Chou SY, Chen CM, Tsai FJ, Chern Y (2009) The A2A adenosine receptor rescues the urea cycle deficiency of Huntington's disease by enhancing the activity of the ubiquitin-proteasome system. *Hum Mol Genet* 18:2929-2942.

- Choi WS, Machida CA, Ronnekleiv OK (1995) Distribution of dopamine D₁, D₂, and D₅ receptor mRNAs in the monkey brain: ribonuclease protection assay analysis. *Brain Res Mol Brain Res* 31:86-94.
- Ciechanover A (2005) Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:79-87.
- Ciechanover A, Schwartz AL (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of protein death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2727-2730.
- Ciliax BJ, Nash N, Heilman C, Sunahara R, Hartney A, Tiberi M, Rye DB, Caron MG, Niznik HB, Levey AI (2000) Dopamine D(5) receptor immunolocalization in rat and monkey brain. *Synapse* 37:125-145.
- Citri A, Soler-Llavina G, Bhattacharyya S, Malenka RC (2009) N-methyl-D-aspartate receptor- and metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression are differentially regulated by the ubiquitin-proteasome system. *Eur J Neurosci* 30:1443-1450.
- Civelli O, Bunzow JR, Grandy DK (1993) Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33:281-307.
- Cohen G (1984) Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. *Neurotoxicology* 5:77-82.
- Cole GM, Frautschy SA (2006) Alzheimer's amyloid story finds its star. *Trends Mol Med* 12:395-396.
- Cools R, Barker RA, Sahakian BJ, Robbins TW (2001) Mechanisms of cognitive set flexibility in Parkinson's disease. *Brain* 124:2503-2512.
- Corvol JC, Studler JM, Schonn JS, Girault JA, Herve D (2001) Galphago(olf) is necessary for coupling D₁ and A_{2a} receptors to adenylyl cyclase in the striatum. *J Neurochem* 76:1585-1588.
- Corvol JC, Muriel MP, Valjent E, Feger J, Hanoun N, Girault JA, Hirsch EC, Herve D (2004) Persistent increase in olfactory type G-protein alpha subunit levels may underlie D₁ receptor functional hypersensitivity in Parkinson disease. *J Neurosci* 24:7007-7014.
- Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R (1969) Modification of Parkinsonism--chronic treatment with L-dopa. *N Engl J Med* 280:337-345.
- Coux O, Tanaka K, Goldberg AL (1996) Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 65:801-847.
- Cox PA, Sacks OW (2002) Cycad neurotoxins, consumption of flying foxes, and ALS-PDC disease in Guam. *Neurology* 58:956-959.

- Cuenca N, Herrero MT, Angulo A, de Juan E, Martinez-Navarrete GC, Lopez S, Barcia C, Martin-Nieto J (2005) Morphological impairments in retinal neurons of the scotopic visual pathway in a monkey model of Parkinson's disease. *J Comp Neurol* 493:261-273.
- Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN (2004) Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* 2004:re16.
- Da Cunha C, Wietzikoski S, Wietzikoski EC, Miyoshi E, Ferro MM, Anselmo-Franci JA, Canteras NS (2003) Evidence for the substantia nigra pars compacta as an essential component of a memory system independent of the hippocampal memory system. *Neurobiol Learn Mem* 79:236-242.
- Da Cunha C, Gevaerd MS, Vital MA, Miyoshi E, Andreatini R, Silveira R, Takahashi RN, Canteras NS (2001) Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. *Behav Brain Res* 124:9-18.
- Dahlstrom A, Fuxe K (1964) Evidence For The Existence Of Monoamine-Containing Neurons In The Central Nervous System. I. Demonstration Of Monoamines In The Cell Bodies Of Brain Stem Neurons. *Acta Physiol Scand Suppl*:SUPPL 232:231-255.
- Dal Toso R, Sommer B, Ewert M, Herb A, Pritchett DB, Bach A, Shivers BD, Seburg PH (1989) The dopamine D₂ receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO J* 8:4025-4034.
- Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM (1999) The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain* 122 (Pt 8):1437-1448.
- Dauer W, Przedborski S (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889-909.
- de Rijk MC, Tzourio C, Breteler MM, Dartigues JF, Amaducci L, Lopez-Pousa S, Manubens-Bertran JM, Alperovitch A, Rocca WA (1997) Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the EUROPARKINSON Collaborative Study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 62:10-15.
- 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.
- Decamp E, Schneider JS (2004) Attention and executive function deficits in chronic low-dose MPTP-treated non-human primates. *Eur J Neurosci* 20:1371-1378.
- DeLong MR (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci* 13:281-285.

- Delwaide PJ, Sabbatino M, Delwaide C (1986) Some pathophysiological aspects of the parkinsonian rigidity. *J Neural Transm Suppl* 22:129-139.
- DiAntonio A, Hicke L (2004) Ubiquitin-dependent regulation of the synapse. *Annu Rev Neurosci* 27:223-246.
- Diaz J, Levesque D, Griffon N, Lammers CH, Martres MP, Sokoloff P, Schwartz JC (1994) Opposing roles for dopamine D₂ and D₃ receptors on neurotensin mRNA expression in nucleus accumbens. *Eur J Neurosci* 6:1384-1387.
- Diaz J, Levesque D, Lammers CH, Griffon N, Martres MP, Schwartz JC, Sokoloff P (1995) Phenotypical characterization of neurons expressing the dopamine D₃ receptor in the rat brain. *Neuroscience* 65:731-745.
- DiFiglia M, Pasik P, Pasik T (1976) A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. *Brain Res* 114:245-256.
- DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, Aronin N (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277:1990-1993.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61.
- Dotti CG, Banker G (1991) Intracellular organization of hippocampal neurons during the development of neuronal polarity. *J Cell Sci Suppl* 15:75-84.
- Doudet D, Gross C, Lebrun-Grandie P, Bioulac B (1985) MPTP primate model of Parkinson's disease: a mechanographic and electromyographic study. *Brain Res* 335:194-199.
- Drinnan SL, Hope BT, Snutch TP, Vincent SR (1991) G(olf) in the basal ganglia. *Mol Cell Neurosci* 2:66-70.
- Dumartin B, Caille I, Gonon F, Bloch B (1998) Internalization of D₁ dopamine receptor in striatal neurons *in vivo* as evidence of activation by dopamine agonists. *J Neurosci* 18:1650-1661.
- Dumartin B, Jaber M, Gonon F, Caron MG, Giros B, Bloch B (2000) Dopamine tone regulates D₁ receptor trafficking and delivery in striatal neurons in dopamine transporter-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1879-1884.
- Dunah AW, Wang Y, Yasuda RP, Kameyama K, Huguenin RL, Wolfe BB, Standaert DG (2000) Alterations in subunit expression, composition, and phosphorylation of striatal N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in a rat 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Mol Pharmacol* 57:342-352.

- Ehlers MD (2003) Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nat Neurosci* 6:231-242.
- 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.
- Embong ME, Moirano J, Schafernak KT, Moirano M, Evans M, Konecny T, Roitberg B, Ambarish P, Mangubat E, Ma Y, Eidelberg D, Holden J, Kordower JH, Leestma JE (2006) Basal ganglia lesions after MPTP administration in rhesus monkeys. *Neurobiol Dis* 23:281-289.
- Evans AH, Katzenschlager R, Paviour D, O'Sullivan JD, Appel S, Lawrence AD, Lees AJ (2004) Punding in Parkinson's disease: its relation to the dopamine dysregulation syndrome. *Mov Disord* 19:397-405.
- Evans AH, Pavese N, Lawrence AD, Tai YF, Appel S, Doder M, Brooks DJ, Lees AJ, Piccini P (2006) Compulsive drug use linked to sensitized ventral striatal dopamine transmission. *Ann Neurol* 59:852-858.
- Everitt BJ, Robbins TW (1997) Central cholinergic systems and cognition. *Annu Rev Psychol* 48:649-684.
- Fahn S (1998) Medical treatment of Parkinson's disease. *J Neurol* 245:P15-24.
- Fahn S, Oakes D, Shoulson I, Kieburtz K, Rudolph A, Lang A, Olanow CW, Tanner C, Marek K (2004) Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *N Engl J Med* 351:2498-2508.
- Farrer M, Kachergus J, Forno L, Lincoln S, Wang DS, Hulihan M, Maraganore D, Gwinn-Hardy K, Wszolek Z, Dickson D, Langston JW (2004) Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications. *Ann Neurol* 55:174-179.
- Fearnley JM, Lees AJ (1991) Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114 (Pt 5):2283-2301.
- Fenelon G, Gimenez-Roldan S, Montastruc JL, Bermejo F, Durif F, Bourdeix I, Pere JJ, Galiano L, Schadrack J (2003) Efficacy and tolerability of entacapone in patients with Parkinson's disease treated with levodopa plus a dopamine agonist and experiencing wearing-off motor fluctuations. A randomized, double-blind, multicentre study. *J Neural Transm* 110:239-251.
- Ferguson SS, Caron MG (1998) G protein-coupled receptor adaptation mechanisms. *Semin Cell Dev Biol* 9:119-127.

- Ferguson SS, Downey WE, 3rd, Colapietro AM, Barak LS, Menard L, Caron MG (1996) Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science* 271:363-366.
- Ferrell K, Wilkinson CR, Dubiel W, Gordon C (2000) Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. *Trends Biochem Sci* 25:83-88.
- Fiorentini C, Busi C, Spano P, Missale C (2010) Dimerization of dopamine D1 and D3 receptors in the regulation of striatal function. *Curr Opin Pharmacol* 10:87-92.
- Fiorentini C, Busi C, Gorruso E, Gotti C, Spano P, Missale C (2008) Reciprocal regulation of dopamine D1 and D3 receptor function and trafficking by heterodimerization. *Mol Pharmacol*.
- Fonseca R, Vabulas RM, Hartl FU, Bonhoeffer T, Nagerl UV (2006) A balance of protein synthesis and proteasome-dependent degradation determines the maintenance of LTP. *Neuron* 52:239-245.
- Ford B (2010) Pain in Parkinson's disease. *Mov Disord* 25 Suppl 1:S98-103.
- Forno LS, Langston JW, DeLaney LE, Irwin I (1988) An electron microscopic study of MPTP-induced inclusion bodies in an old monkey. *Brain Res* 448:150-157.
- Forno LS, DeLaney LE, Irwin I, Langston JW (1993) Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonism and Parkinson's disease. Neuropathologic considerations. *Adv Neurol* 60:600-608.
- Forno LS, Langston JW, DeLaney LE, Irwin I, Ricaurte GA (1986) Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys. *Ann Neurol* 20:449-455.
- Fremeau RT, Jr., Duncan GE, Fornaretto MG, Dearry A, Gingrich JA, Breese GR, Caron MG (1991) Localization of D1 dopamine receptor mRNA in brain supports a role in cognitive, affective, and neuroendocrine aspects of dopaminergic neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3772-3776.
- Friguet B, Bulteau AL, Chondrogianni N, Conconi M, Petropoulos I (2000) Protein degradation by the proteasome and its implications in aging. *Ann N Y Acad Sci* 908:143-154.
- Garris PA, Ciolkowski EL, Pastore P, Wightman RM (1994) Efflux of dopamine from the synaptic cleft in the nucleus accumbens of the rat brain. *J Neurosci* 14:6084-6093.
- Gerfen CR, Miyachi S, Paetzki 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, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Sibley DR (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250:1429-1432.
- Gerlach M, Riederer P (1996) Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J Neural Transm* 103:987-1041.
- Giasson BI, Duda JE, Quinn SM, Zhang B, Trojanowski JQ, Lee VM (2002) Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. *Neuron* 34:521-533.
- Gibb WR, Scott T, Lees AJ (1991) Neuronal inclusions of Parkinson's disease. *Mov Disord* 6:2-11.
- Gilman AG (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 56:615-649.
- Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG (1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 379:606-612.
- 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.
- Goedert M, Spillantini MG, Davies SW (1998) Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases. *Curr Opin Neurobiol* 8:619-632.
- Goetz CG, Stebbins GT (1995) Mortality and hallucinations in nursing home patients with advanced Parkinson's disease. *Neurology* 45:669-671.
- Goetz CG, Poewe W, Rascol O, Sampaio C (2005) Evidence-based medical review update: pharmacological and surgical treatments of Parkinson's disease: 2001 to 2004. *Mov Disord* 20:523-539.
- Gold SJ, Hoang CV, Potts BW, Porras G, Pioli E, Kim KW, Nadjar A, Qin C, LaHoste GJ, Li Q, Bioulac BH, Waugh JL, Gurevich E, Neve RL, Bezard E (2007) RGS9-2 negatively modulates L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia in experimental Parkinson's disease. *J Neurosci* 27:14338-14348.
- Goldberg AL (2005) Nobel committee tags ubiquitin for distinction. *Neuron* 45:339-344.
- Goldberg AL, Rock KL (1992) Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* 357:375-379.

- Goldberg AL, Cascio P, Saric T, Rock KL (2002) The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol Immunol* 39:147-164.
- Goldman JE, Yen SH, Chiu FC, Peress NS (1983) Lewy bodies of Parkinson's disease contain neurofilament antigens. *Science* 221:1082-1084.
- Gomez-Mancilla B, Boucher R, Bedard PJ (1991) Effect of clonidine and atropine on rest tremor in the MPTP monkey model of parkinsonism. *Clin Neuropharmacol* 14:359-366.
- Grandy DK, Litt M, Allen L, Bunzow JR, Marchionni M, Makam H, Reed L, Magenis RE, Civelli O (1989) The human dopamine D2 receptor gene is located on chromosome 11 at q22-q23 and identifies a TaqI RFLP. *Am J Hum Genet* 45:778-785.
- Greengard P, Allen PB, Nairn AC (1999) Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron* 23:435-447.
- Gross CE, Ravenscroft P, Dovero S, Jaber M, Bioulac B, Bezard E (2003) Pattern of levodopa-induced striatal changes is different in normal and MPTP-lesioned mice. *J Neurochem* 84:1246-1255.
- Guehl D, Pessiglione M, Francois C, Yelnik J, Hirsch EC, Feger J, Tremblay L (2003) Tremor-related activity of neurons in the 'motor' thalamus: changes in firing rate and pattern in the MPTP vervet model of parkinsonism. *Eur J Neurosci* 17:2388-2400.
- Guigoni C, Bezard E (2009) Involvement of canonical and non-canonical D1 dopamine receptor signalling pathways in L-dopa-induced dyskinesia. *Parkinsonism Relat Disord* 15 Suppl 3:S64-67.
- 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.
- 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.
- Guo L, Wang Y (2007) Glutamate stimulates glutamate receptor interacting protein 1 degradation by ubiquitin-proteasome system to regulate surface expression of GluR2. *Neuroscience* 145:100-109.
- Gurevich VV, Gurevich EV (2008) Rich tapestry of G protein-coupled receptor signaling and regulatory mechanisms. *Mol Pharmacol* 74:312-316.

- Haas KF, Miller SL, Friedman DB, Broadie K (2007) The ubiquitin-proteasome system postsynaptically regulates glutamatergic synaptic function. *Mol Cell Neurosci* 35:64-75.
- Haberstock-Debic H, Wein M, Barrot M, Colago EE, Rahman Z, Neve RL, Pickel VM, Nestler EJ, von Zastrow M, Svingos AL (2003) Morphine acutely regulates opioid receptor trafficking selectively in dendrites of nucleus accumbens neurons. *J Neurosci* 23:4324-4332.
- Hallett PJ, Dunah AW, Ravenscroft P, Zhou S, Bezard E, Crossman AR, Brotchie JM, Standaert DG (2005) Alterations of striatal NMDA receptor subunits associated with the development of dyskinesia in the MPTP-lesioned primate model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology* 48:503-516.
- Halliday GM, Blumbergs PC, Cotton RG, Blessing WW, Geffen LB (1990a) Loss of brainstem serotonin- and substance P-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain Res* 510:104-107.
- Halliday GM, Li YW, Blumbergs PC, Joh TH, Cotton RG, Howe PR, Blessing WW, Geffen LB (1990b) Neuropathology of immunohistochemically identified brainstem neurons in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 27:373-385.
- Hanna J, Finley D (2007) A proteasome for all occasions. *FEBS Lett* 581:2854-2861.
- Hanyaloglu AC, von Zastrow M (2008) Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48:537-568.
- Hassler R (1938) Zur Pathologie der Paralysis agitans und des postenzephalitischen Parkinsonismus. *J Psychol Neurol* 48:387-476.
- Hatcher JM, Pennell KD, Miller GW (2008) Parkinson's disease and pesticides: a toxicological perspective. *Trends Pharmacol Sci* 29:322-329.
- Hegde AN, Goldberg AL, Schwartz JH (1993) Regulatory subunits of cAMP-dependent protein kinases are degraded after conjugation to ubiquitin: a molecular mechanism underlying long-term synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7436-7440.
- Hegde AN, Inokuchi K, Pei W, Casadio A, Ghirardi M, Chain DG, Martin KC, Kandel ER, Schwartz JH (1997) Ubiquitin C-terminal hydrolase is an immediate-early gene essential for long-term facilitation in Aplysia. *Cell* 89:115-126.
- Heikkila RE, Hess A, Duvoisin RC (1984) Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice. *Science* 224:1451-1453.
- Hely MA, Morris JG, Reid WG, Trafficante R (2005) Sydney Multicenter Study of Parkinson's disease: non-L-dopa-responsive problems dominate at 15 years. *Mov Disord* 20:190-199.

- Hernandez-Lopez S, Tkatch T, Perez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H, Surmeier DJ (2000) D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLC[beta]1-IP3-calcineurin-signaling cascade. *J Neurosci* 20:8987-8995.
- Herrero MT, Hirsch EC, Kastner A, Ruberg M, Luquin MR, Laguna J, Javoy-Agid F, Obeso JA, Agid Y (1993) Does neuromelanin contribute to the vulnerability of catecholaminergic neurons in monkeys intoxicated with MPTP? *Neuroscience* 56:499-511.
- 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.
- Hershko A, Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67:425-479.
- Herve D, Levi-Strauss M, Marey-Semper I, Verney C, Tassin JP, Glowinski J, Girault JA (1993) G(olf) and Gs in rat basal ganglia: possible involvement of G(olf) in the coupling of dopamine D1 receptor with adenylyl cyclase. *J Neurosci* 13:2237-2248.
- Hicke L (2001) Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:195-201.
- Hikosaka O, Nakamura K, Sakai K, Nakahara H (2002) Central mechanisms of motor skill learning. *Curr Opin Neurobiol* 12:217-222.
- Hirsch E, Graybiel AM, Agid YA (1988) Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 334:345-348.
- Huang Q, Zhou D, Chase K, Gusella JF, Aronin N, DiFiglia M (1992) Immunohistochemical localization of the D1 dopamine receptor in rat brain reveals its axonal transport, pre- and postsynaptic localization, and prevalence in the basal ganglia, limbic system, and thalamic reticular nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11988-11992.
- Huntley GW, Morrison JH, Prikhzhian A, Sealfon SC (1992) Localization of multiple dopamine receptor subtype mRNAs in human and monkey motor cortex and striatum. *Brain Res Mol Brain Res* 15:181-188.
- Jackson DM, Westlind-Danielsson A (1994) Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol Ther* 64:291-370.
- Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH (1985) Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:2173-2177.

- Javoy-Agid F, Agid Y (1980) Is the mesocortical dopaminergic system involved in Parkinson disease? *Neurology* 30:1326-1330.
- Jellinger KA (1991) Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Mol Chem Neuropathol* 14:153-197.
- Jiang YH, Armstrong D, Albrecht U, Atkins CM, Noebels JL, Eichele G, Sweatt JD, Beaudet AL (1998) Mutation of the Angelman ubiquitin ligase in mice causes increased cytoplasmic p53 and deficits of contextual learning and long-term potentiation. *Neuron* 21:799-811.
- Jones DT, Masters SB, Bourne HR, Reed RR (1990) Biochemical characterization of three stimulatory GTP-binding proteins. The large and small forms of Gs and the olfactory-specific G-protein, Golf. *J Biol Chem* 265:2671-2676.
- Kales A, Ansel RD, Markham CH, Scharf MB, Tan TL (1971) Sleep in patients with Parkinson's disease and normal subjects prior to and following levodopa administration. *Clin Pharmacol Ther* 12:397-406.
- Karpova A, Mikhaylova M, Thomas U, Knopfel T, Behnisch T (2006) Involvement of protein synthesis and degradation in long-term potentiation of Schaffer collateral CA1 synapses. *J Neurosci* 26:4949-4955.
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995) Striatal interneurones: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* 18:527-535.
- Kebabian JW, Calne DB (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277:93-96.
- Khan ZU, Gutierrez A, Martin R, Penafiel A, Rivera A, de la Calle A (2000) Dopamine D5 receptors of rat and human brain. *Neuroscience* 100:689-699.
- Ki CS, Stavrou EF, Davanos N, Lee WY, Chung EJ, Kim JY, Athanassiadou A (2007) The Ala53Thr mutation in the alpha-synuclein gene in a Korean family with Parkinson disease. *Clin Genet* 71:471-473.
- Kishino T, Lalande M, Wagstaff J (1997) UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat Genet* 15:70-73.
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392:605-608.
- Klaaidman LK, Adams JD, Jr., Leung AC, Kim SS, Cadena E (1993) Redox cycling of MPP⁺: evidence for a new mechanism involving hydride transfer with xanthine oxidase, aldehyde dehydrogenase, and lipoamide dehydrogenase. *Free Radic Biol Med* 15:169-179.

- Kloetzel PM (2001) Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:179-187.
- Ko JL, Arvidsson U, Williams FG, Law PY, Elde R, Loh HH (1999) Visualization of time-dependent redistribution of delta-opioid receptors in neuronal cells during prolonged agonist exposure. *Brain Res Mol Brain Res* 69:171-185.
- Kobayashi T, Washiyama K, Ikeda K (2004) Modulators of G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels: potentially therapeutic agents for addictive drug users. *Ann N Y Acad Sci* 1025:590-594.
- Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S (1999) A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96:635-644.
- Koenig JA, Edwardson JM (1994) Kinetic analysis of the trafficking of muscarinic acetylcholine receptors between the plasma membrane and intracellular compartments. *J Biol Chem* 269:17174-17182.
- Koenig JA, Edwardson JM (1997) Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 18:276-287.
- Krack P, Batir A, Van Blercom N, Chabardes S, Fraix V, Ardouin C, Koudsie A, Limousin PD, Benazzouz A, LeBas JF, Benabid AL, Pollak P (2003) Five-year follow-up of bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med* 349:1925-1934.
- Kreiss DS, Mastropietro CW, Rawji SS, Walters JR (1997) The response of subthalamic nucleus neurons to dopamine receptor stimulation in a rodent model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 17:6807-6819.
- Krueger KM, Daaka Y, Pitcher JA, Lefkowitz RJ (1997) The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J Biol Chem* 272:5-8.
- Krug M, Lossner B, Ott T (1984) Anisomycin blocks the late phase of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Brain Res Bull* 13:39-42.
- Lam YA, Xu W, DeMartino GN, Cohen RE (1997) Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome. *Nature* 385:737-740.
- Landwehrmeyer B, Mengod G, Palacios JM (1993a) Dopamine D3 receptor mRNA and binding sites in human brain. *Brain Res Mol Brain Res* 18:187-192.
- Landwehrmeyer B, Mengod G, Palacios JM (1993b) Differential visualization of dopamine D2 and D3 receptor sites in rat brain. A comparative study using in situ hybridization histochemistry and ligand binding autoradiography. *Eur J Neurosci* 5:145-153.

- Lang AE, Lozano AM (1998) Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* 339:1044-1053.
- Langston JW (1996) The etiology of Parkinson's disease with emphasis on the MPTP story. *Neurology* 47:S153-160.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219:979-980.
- Langston JW, Irwin I, Langston EB, Forno LS (1984) 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺): identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra. *Neurosci Lett* 48:87-92.
- Lannuzel A, Hoglinger GU, Champy P, Michel PP, Hirsch EC, Ruberg M (2006) Is atypical parkinsonism in the Caribbean caused by the consumption of Annonaceae? *J Neural Transm Suppl*:153-157.
- Larsen JP (2003) Sleep disorders in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 91:329-334.
- Le Couteur DG, McLean AJ, Taylor MC, Woodham BL, Board PG (1999) Pesticides and Parkinson's disease. *Biomed Pharmacother* 53:122-130.
- 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.
- Le Moine C, Bloch B (1996) Expression of the D3 dopamine receptor in peptidergic neurons of the nucleus accumbens: comparison with the D1 and D2 dopamine receptors. *Neuroscience* 73:131-143.
- Le Moine C, Normand E, Bloch B (1991) Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing the D1 dopamine receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4205-4209.
- 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.
- Lebouvier T, Chaumette T, Paillusson S, Duyckaerts C, Bruley des Varannes S, Neunlist M, Derkinderen P (2009) The second brain and Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 30:735-741.
- Lee BH, Lee MJ, Park S, Oh DC, Elsasser S, Chen PC, Gartner C, Dimova N, Hanna J, Gygi SP, Wilson SM, King RW, Finley D (2010) Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature* 467:179-184.

- Lee CK, Klopp RG, Weindruch R, Prolla TA (1999) Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* 285:1390-1393.
- Lee DH, Goldberg AL (1998) Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* 8:397-403.
- Lee MK, Stirling W, Xu Y, Xu X, Qui D, Mandir AS, Dawson TM, Copeland NG, Jenkins NA, Price DL (2002) Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 --> Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8968-8973.
- Lees AJ, Shaw KM, Stern GM (1977) "Off period" dystonia and "on period" choreoathetosis in levodopa-treated patients with Parkinson's disease. *Lancet* 2:1034.
- Lees AJ, Blackburn NA, Campbell VL (1988) The nighttime problems of Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol* 11:512-519.
- Lemmon SK, Traub LM (2000) Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells. *Curr Opin Cell Biol* 12:457-466.
- Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH (1998) The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 395:451-452.
- Levesque D, Martres MP, Diaz J, Griffon N, Lammers CH, Sokoloff P, Schwartz JC (1995) A paradoxical regulation of the dopamine D3 receptor expression suggests the involvement of an anterograde factor from dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1719-1723.
- Levesque D, Diaz J, Pilon C, Martres MP, Giros B, Souil E, Schott D, Morgat JL, Schwartz JC, Sokoloff P (1992) Identification, characterization, and localization of the dopamine D3 receptor in rat brain using 7-[3H]hydroxy-N,N-di-n-propyl-2-aminotetralin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8155-8159.
- Levesque M, Parent A (2005) The striatofugal fiber system in primates: a reevaluation of its organization based on single-axon tracing studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11888-11893.
- Levey AI, Hersch SM, Rye DB, Sunahara RK, Niznik HB, Kitt CA, Price DL, Maggio R, Brann MR, Ciliax BJ (1993) Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8861-8865.
- Limousin P, Krack P, Pollak P, Benazzouz A, Ardouin C, Hoffmann D, Benabid AL (1998) Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med* 339:1105-1111.

- Limousin P, Pollak P, Benazzouz A, Hoffmann D, Le Bas JF, Broussolle E, Perret JE, Benabid AL (1995) Effect of parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation. *Lancet* 345:91-95.
- Liu Y, Roghani A, Edwards RH (1992) Gene transfer of a reserpine-sensitive mechanism of resistance to N-methyl-4-phenylpyridinium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:9074-9078.
- Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z, Lansbury PT, Jr. (2002) The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* 111:209-218.
- Lo Bianco C, Ridet JL, Schneider BL, Deglon N, Aebischer P (2002) alpha-Synucleinopathy and selective dopaminergic neuron loss in a rat lentiviral-based model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10813-10818.
- Lo Bianco C, Schneider BL, Bauer M, Sajadi A, Brice A, Iwatsubo T, Aebischer P (2004) Lentiviral vector delivery of parkin prevents dopaminergic degeneration in an alpha-synuclein rat model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:17510-17515.
- Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990) beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* 248:1547-1550.
- Lopez-Salon M, Alonso M, Vianna MR, Viola H, Mello e Souza T, Izquierdo I, Pasquini JM, Medina JH (2001) The ubiquitin-proteasome cascade is required for mammalian long-term memory formation. *Eur J Neurosci* 14:1820-1826.
- Lowe J, McDermott H, Landon M, Mayer RJ, Wilkinson KD (1990) Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (PGP 9.5) is selectively present in ubiquitinated inclusion bodies characteristic of human neurodegenerative diseases. *J Pathol* 161:153-160.
- Lowe J, Stock D, Jap B, Zwickl P, Baumeister W, Huber R (1995) Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* 268:533-539.
- Lundblad M, Andersson M, Winkler C, Kirik D, Wierup N, Cenci MA (2002) Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 15:120-132.
- Lundblad M, Usiello A, Carta M, Hakansson K, Fisone G, Cenci MA (2005) Pharmacological validation of a mouse model of l-DOPA-induced dyskinesia. *Exp Neurol* 194:66-75.
- Luquin MR, Scipioni O, Vaamonde J, Gershnik O, Obeso JA (1992) Levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: clinical and pharmacological classification. *Mov Disord* 7:117-124.

- Marcellino D, Ferre S, Casado V, Cortes A, Le Foll B, Mazzola C, Drago F, Saur O, Stark H, Soriano A, Barnes C, Goldberg SR, Lluis C, Fuxe K, Franco R (2008) Identification of Dopamine D1-D3 Receptor Heteromers: Indications for a role of synergistic D1-D3 receptor interactions in the striatum. *J Biol Chem* 283:26016-26025.
- Markey SP, Johannessen JN, Chiueh CC, Burns RS, Herkenham MA (1984) Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature* 311:464-467.
- Martin-Negrier M, Charron G, Bloch B (2000) Agonist stimulation provokes dendritic and axonal dopamine D(1) receptor redistribution in primary cultures of striatal neurons. *Neuroscience* 99:257-266.
- Martin-Negrier ML, Charron G, Bloch B (2006) Receptor recycling mediates plasma membrane recovery of dopamine D1 receptors in dendrites and axons after agonist-induced endocytosis in primary cultures of striatal neurons. *Synapse* 60:194-204.
- Martinez-Vicente M, Sovak G, Cuervo AM (2005) Protein degradation and aging. *Exp Gerontol* 40:622-633.
- Matsuura T, Sutcliffe JS, Fang P, Galjaard RJ, Jiang YH, Benton CS, Rommens JM, Beaudet AL (1997) De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome. *Nat Genet* 15:74-77.
- Mayer RA, Kindt MV, Heikkila RE (1986) Prevention of the nigrostriatal toxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by inhibitors of 3,4-dihydroxyphenylethylamine transport. *J Neurochem* 47:1073-1079.
- Meador-Woodruff JH, Mansour A, Bunzow JR, Van Tol HH, Watson SJ, Jr., Civelli O (1989) Distribution of D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7625-7628.
- Meador-Woodruff JH, Mansour A, Grandy DK, Damask SP, Civelli O, Watson SJ, Jr. (1992) Distribution of D5 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Neurosci Lett* 145:209-212.
- Metz GA, Whishaw IQ (2002) Drug-induced rotation intensity in unilateral dopamine-depleted rats is not correlated with end point or qualitative measures of forelimb or hindlimb motor performance. *Neuroscience* 111:325-336.
- Middleton FA, Strick PL (2000) Basal ganglia and cerebellar loops: motor and cognitive circuits. *Brain Res Brain Res Rev* 31:236-250.
- Migliore L, Coppede F (2009) Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases. *Mutat Res* 667:82-97.
- Miranda M, Sorkin A (2007) Regulation of receptors and transporters by ubiquitination: new insights into surprisingly similar mechanisms. *Mol Interv* 7:157-167.

- Mishto M, Bellavista E, Santoro A, Stolzing A, Ligorio C, Nacmias B, Spazzafumo L, Chiappelli M, Licastro F, Sorbi S, Pession A, Ohm T, Grune T, Franceschi C (2006) Immunoproteasome and LMP2 polymorphism in aged and Alzheimer's disease brains. *Neurobiol Aging* 27:54-66.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78:189-225.
- Mitchell IJ, Sambrook MA, Crossman AR (1985a) Subcortical changes in the regional uptake of [³H]-2-deoxyglucose in the brain of the monkey during experimental choreiform dyskinesia elicited by injection of a gamma-aminobutyric acid antagonist into the subthalamic nucleus. *Brain* 108 (Pt 2):405-422.
- Mitchell IJ, Cross AJ, Sambrook MA, Crossman AR (1985b) Sites of the neurotoxic action of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the macaque monkey include the ventral tegmental area and the locus coeruleus. *Neurosci Lett* 61:195-200.
- Miyasaki JM, Al Hassan K, Lang AE, Voon V (2007) Funding prevalence in Parkinson's disease. *Mov Disord* 22:1179-1181.
- Mizuno Y, Suzuki K, Sone N, Saitoh T (1988) Inhibition of mitochondrial respiration by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in mouse brain in vivo. *Neurosci Lett* 91:349-353.
- 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.
- 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.
- Montagu KA (1957) Catechol compounds in rat tissues and in brains of different animals. *Nature* 180:244-245.
- Moore CA, Milano SK, Benovic JL (2007) Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol* 69:451-482.
- Moratalla R, Quinn B, DeLaney LE, Irwin I, Langston JW, Graybiel AM (1992) Differential vulnerability of primate caudate-putamen and striosome-matrix dopamine systems to the neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3859-3863.
- Morissette M, Goulet M, Grondin R, Blanchet P, Bedard PJ, Di Paolo T, Levesque D (1998) Associative and limbic regions of monkey striatum express high levels of dopamine D₃ receptors: effects of MPTP and dopamine agonist replacement therapies. *Eur J Neurosci* 10:2565-2573.

- Morrish PK, Sawle GV, Brooks DJ (1996) An [18F]dopa-PET and clinical study of the rate of progression in Parkinson's disease. *Brain* 119 (Pt 2):585-591.
- Moss A, Blackburn-Munro G, Garry EM, Blakemore JA, Dickinson T, Rosie R, Mitchell R, Fleetwood-Walker SM (2002) A role of the ubiquitin-proteasome system in neuropathic pain. *J Neurosci* 22:1363-1372.
- Mrzljak L, Bergson C, Pappy M, Huff R, Levenson R, Goldman-Rakic PS (1996) Localization of dopamine D4 receptors in GABAergic neurons of the primate brain. *Nature* 381:245-248.
- Mukhopadhyay D, Riezman H (2007) Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* 315:201-205.
- Myllyla VV, Kultalahti ER, Haapaniemi H, Leinonen M (2001) Twelve-month safety of entacapone in patients with Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 8:53-60.
- Nadjar A, Brotchie JM, Guigoni C, Li Q, Zhou SB, Wang GJ, Ravenscroft P, Georges F, Crossman AR, Bezard E (2006) Phenotype of striatofugal medium spiny neurons in parkinsonian and dyskinetic nonhuman primates: a call for a reappraisal of the functional organization of the basal ganglia. *J Neurosci* 26:8653-8661.
- Nakachi N, Kiuchi Y, Inagaki M, Inazu M, Yamazaki Y, Oguchi K (1995) Effects of various dopamine uptake inhibitors on striatal extracellular dopamine levels and behaviours in rats. *Eur J Pharmacol* 281:195-203.
- Nash JE, Johnston TH, Collingridge GL, Garner CC, Brotchie JM (2005) Subcellular redistribution of the synapse-associated proteins PSD-95 and SAP97 in animal models of Parkinson's disease and L-DOPA-induced dyskinesia. *FASEB J* 19:583-585.
- Navailles S, Bioulac B, Gross C, De Duerwaerdere P (2010) Serotonergic neurons mediate ectopic release of dopamine induced by L-DOPA in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 38:136-143.
- Neer EJ (1995) Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80:249-257.
- Nestler EJ (2005) Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci* 8:1445-1449.
- Nishi A, Snyder GL, Fienberg AA, Fisone G, Aperia A, Nairn AC, Greengard P (1999) Requirement for DARPP-32 in mediating effect of dopamine D2 receptor activation. *Eur J Neurosci* 11:2589-2592.
- Nishi K, Kondo T, Narabayashi H (1991) Destruction of norepinephrine terminals in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mice reduces locomotor activity induced by L-dopa. *Neurosci Lett* 123:244-247.

- Nutt JG (1990) Levodopa-induced dyskinesia: review, observations, and speculations. *Neurology* 40:340-345.
- O'Malley KL, Harmon S, Tang L, Todd RD (1992) The rat dopamine D4 receptor: sequence, gene structure, and demonstration of expression in the cardiovascular system. *New Biol* 4:137-146.
- Oh JD, Russell DS, Vaughan CL, Chase TN (1998) Enhanced tyrosine phosphorylation of striatal NMDA receptor subunits: effect of dopaminergic denervation and L-DOPA administration. *Brain Res* 813:150-159.
- Oiwa Y, Eberling JL, Nagy D, Pivirotto P, Emborg ME, Bankiewicz KS (2003) Overlesioned hemiparkinsonian non human primate model: correlation between clinical, neurochemical and histochemical changes. *Front Biosci* 8:a155-166.
- Ossipov MH, Bazov I, Gardell LR, Kowal J, Yakovleva T, Usynin I, Ekstrom TJ, Porreca F, Bakalkin G (2007) Control of chronic pain by the ubiquitin proteasome system in the spinal cord. *J Neurosci* 27:8226-8237.
- Packard MG, White NM (1991) Dissociation of hippocampus and caudate nucleus memory systems by posttraining intracerebral injection of dopamine agonists. *Behav Neurosci* 105:295-306.
- Pamer E, Cresswell P (1998) Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 16:323-358.
- Parent A, Hazrati LN (1995a) Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev* 20:91-127.
- Parent A, Hazrati LN (1995b) Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Brain Res Rev* 20:128-154.
- Parkinson-Study-Group (2002) A controlled trial of rasagiline in early Parkinson disease: the TEMPO Study. *Arch Neurol* 59:1937-1943.
- Parkinson J (1817) An essay on the Shaking Plasy.
- Pasupathy A, Miller EK (2005) Different time courses of learning-related activity in the prefrontal cortex and striatum. *Nature* 433:873-876.
- Patrick GN, Bingol B, Weld HA, Schuman EM (2003) Ubiquitin-mediated proteasome activity is required for agonist-induced endocytosis of GluRs. *Curr Biol* 13:2073-2081.

- Pavon N, Martin AB, Mendialdua A, Moratalla R (2006) ERK phosphorylation and FosB expression are associated with L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice. *Biol Psychiatry* 59:64-74.
- Petaja-Repo UE, Hogue M, Laperriere A, Bhalla S, Walker P, Bouvier M (2001) Newly synthesized human delta opioid receptors retained in the endoplasmic reticulum are retrotranslocated to the cytosol, deglycosylated, ubiquitinated, and degraded by the proteasome. *J Biol Chem* 276:4416-4423.
- Petrucelli L, O'Farrell C, Lockhart PJ, Baptista M, Kehoe K, Vink L, Choi P, Wolozin B, Farrer M, Hardy J, Cookson MR (2002) Parkin protects against the toxicity associated with mutant alpha-synuclein: proteasome dysfunction selectively affects catecholaminergic neurons. *Neuron* 36:1007-1019.
- 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.
- Pivonello R, Ferone D, Lombardi G, Colao A, Lamberts SW, Hofland LJ (2007) Novel insights in dopamine receptor physiology. *Eur J Endocrinol* 156 Suppl 1:S13-21.
- Poewe WH, Deuschl G, Gordin A, Kultalahti ER, Leinonen M (2002) Efficacy and safety of entacapone in Parkinson's disease patients with suboptimal levodopa response: a 6-month randomized placebo-controlled double-blind study in Germany and Austria (Celomen study). *Acta Neurol Scand* 105:245-255.
- Pollak P, Benabid AL, Gross C, Gao DM, Laurent A, Benazzouz A, Hoffmann D, Gentil M, Perret J (1993) [Effects of the stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson disease]. *Rev Neurol (Paris)* 149:175-176.
- Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, Johnson WG, Ide SE, Di Iorio G, Sanges G, Stenroos ES, Pho LT, Schaffer AA, Lazzarini AM, Nussbaum RL, Duvoisin RC (1996) Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science* 274:1197-1199.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanasiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276:2045-2047.
- Premont RT, Gainetdinov RR (2007) Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol* 69:511-534.
- Prusiner SB (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13363-13383.

- Przedborski S, Kostic V, Jackson-Lewis V, Naini AB, Simonetti S, Fahn S, Carlson E, Epstein CJ, Cadet JL (1992) Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity are resistant to N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. *J Neurosci* 12:1658-1667.
- Purisai MG, McCormack AL, Langston WJ, Johnston LC, Di Monte DA (2005) Alpha-synuclein expression in the substantia nigra of MPTP-lesioned non-human primates. *Neurobiol Dis* 20:898-906.
- Quinn NP (1997) Parkinson's disease: clinical features. *Baillieres Clin Neurol* 6:1-13.
- Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC (2009) Multiple myeloma. *Lancet* 374:324-339.
- Raiborg C, Stenmark H (2009) The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 458:445-452.
- Ramsay RR, Singer TP (1986) Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. *J Biol Chem* 261:7585-7587.
- Rappaport MS, Sealfon SC, Prikhzhian A, Huntley GW, Morrison JH (1993) Heterogeneous distribution of D1, D2 and D5 receptor mRNAs in monkey striatum. *Brain Res* 616:242-250.
- 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.
- Ridray S, Griffon N, Mignon V, Souil E, Carboni S, Diaz J, Schwartz JC, Sokoloff P (1998) Coexpression of dopamine D1 and D3 receptors in islands of Calleja and shell of nucleus accumbens of the rat: opposite and synergistic functional interactions. *Eur J Neurosci* 10:1676-1686.
- Riederer P, Wuketich S (1976) Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis. *J Neural Transm* 38:277-301.
- Rock KL, Goldberg AL (1999) Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* 17:739-779.
- Rubinsztein DC (2006) The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* 443:780-786.

- Russmann H, Ghika J, Combremont P, Villemure JG, Bogousslavsky J, Burkhard PR, Vingerhoets FJ (2004) L-dopa-induced dyskinesia improvement after STN-DBS depends upon medication reduction. *Neurology* 63:153-155.
- Saliba RS, Michels G, Jacob TC, Pangalos MN, Moss SJ (2007) Activity-dependent ubiquitination of GABA(A) receptors regulates their accumulation at synaptic sites. *J Neurosci* 27:13341-13351.
- Salin P, Hajji MD, Kerkerian-le Goff L (1996) Bilateral 6-hydroxydopamine-induced lesion of the nigrostriatal dopamine pathway reproduces the effects of unilateral lesion on substance P but not on enkephalin expression in rat basal ganglia. *Eur J Neurosci* 8:1746-1757.
- Santini E, Sgambato-Faure V, Li Q, Savasta M, Dovero S, Fisone G, Bezard E (2010) Distinct changes in cAMP and extracellular signal-regulated protein kinase signalling in L-DOPA-induced dyskinesia. *PLoS One* 5.
- 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.
- 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.
- Scatton B, Rouquier L, Javoy-Agid F, Agid Y (1982) Dopamine deficiency in the cerebral cortex in Parkinson disease. *Neurology* 32:1039-1040.
- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD (1990) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 54:823-827.
- Scherman D, Desnos C, Darchen F, Pollak P, Javoy-Agid F, Agid Y (1989) Striatal dopamine deficiency in Parkinson's disease: role of aging. *Ann Neurol* 26:551-557.
- Schmid D, Munz C (2005) Immune surveillance of intracellular pathogens via autophagy. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2:1519-1527.
- Schneider JS, Sun ZQ, Roeltgen DP (1994) Effects of dopamine agonists on delayed response performance in chronic low-dose MPTP-treated monkeys. *Pharmacol Biochem Behav* 48:235-240.
- Schneider JS, Van Velzen M, Menzaghi F, Lloyd GK (1998) Effects of the nicotinic acetylcholine receptor agonist SIB-1508Y on object retrieval performance in MPTP-treated monkeys: comparison with levodopa treatment. *Ann Neurol* 43:311-317.

- Schultz W (1997) Dopamine neurons and their role in reward mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 7:191-197.
- Schwarting RK, Huston JP (1996) The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol* 50:275-331.
- Sedelis M, Schwarting RK, Huston JP (2001) Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 125:109-125.
- Semchuk KM, Love EJ, Lee RG (1992) Parkinson's disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals. *Neurology* 42:1328-1335.
- Shen H, Korutla L, Champtiaux N, Toda S, LaLumiere R, Vallone J, Klugmann M, Blendy JA, Mackler SA, Kalivas PW (2007) NAC1 regulates the recruitment of the proteasome complex into dendritic spines. *J Neurosci* 27:8903-8913.
- Sheng M, Hoogenraad CC (2007) The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu Rev Biochem* 76:823-847.
- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T (2000) Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 25:302-305.
- Shoulson I, Oakes D, Fahn S, Lang A, Langston JW, LeWitt P, Olanow CW, Penney JB, Tanner C, Kieburtz K, Rudolph A (2002) Impact of sustained deprenyl (selegiline) in levodopa-treated Parkinson's disease: a randomized placebo-controlled extension of the deprenyl and tocopherol antioxidative therapy of parkinsonism trial. *Ann Neurol* 51:604-612.
- Silverdale MA, Kobylecki C, Hallett PJ, Li Q, Dunah AW, Ravenscroft P, Bezard E, Brotchie JM (2010) Synaptic recruitment of AMPA glutamate receptor subunits in levodopa-induced dyskinesia in the MPTP-lesioned nonhuman primate. *Synapse* 64:177-180.
- Singleton AB et al. (2003) alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302:841.
- Sirinathsinghji DJ, Kupsch A, Mayer E, Zivin M, Pufal D, Oertel WH (1992) Cellular localization of tyrosine hydroxylase mRNA and cholecystokinin mRNA-containing cells in the ventral mesencephalon of the common marmoset: effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Brain Res Mol Brain Res* 12:267-274.
- Smith DM, Benaroudj N, Goldberg A (2006) Proteasomes and their associated ATPases: a destructive combination. *J Struct Biol* 156:72-83.

- 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, Diaz J, Le Foll B, Guillen O, Leriche L, Bezard E, Gross C (2006) The dopamine D3 receptor: a therapeutic target for the treatment of neuropsychiatric disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5:25-43.
- Spano PF, Trabucchi M, Di Chiara G (1977) Localization of nigral dopamine-sensitive adenylate cyclase on neurons originating from the corpus striatum. *Science* 196:1343-1345.
- Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M (1998) alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6469-6473.
- Stanley-Jones D (1956) The anatomy of rigidity and tremor. *J Nerv Ment Dis* 124:163-166.
- Stoop JC, Booij J, Drukarch B, Wolters EC (1992) The anti-parkinsonian drug amantadine inhibits the N-methyl-D-aspartic acid-evoked release of acetylcholine from rat neostriatum in a non-competitive way. *Eur J Pharmacol* 213:439-443.
- Suaud-Chagny MF, Dugast C, Chergui K, Msghina M, Gonon F (1995) Uptake of dopamine released by impulse flow in the rat mesolimbic and striatal systems in vivo. *J Neurochem* 65:2603-2611.
- Sun X, Wolf ME (2009) Nucleus accumbens neurons exhibit synaptic scaling that is occluded by repeated dopamine pre-exposure. *Eur J Neurosci* 30:539-550.
- 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.
- Svenningsson P, Le Moine C (2002) Dopamine D1/5 receptor stimulation induces c-fos expression in the subthalamic nucleus: possible involvement of local D5 receptors. *Eur J Neurosci* 15:133-142.
- Tai HC, Schuman EM (2008) Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci* 9:826-838.
- Tanaka K, Ii K, Ichihara A, Waxman L, Goldberg AL (1986) A high molecular weight protease in the cytosol of rat liver. I. Purification, enzymological properties, and tissue distribution. *J Biol Chem* 261:15197-15203.
- Tanner CM (1992) Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol Clin* 10:317-329.

- Taylor JP, Hardy J, Fischbeck KH (2002) Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* 296:1991-1995.
- Tiberi M, Jarvie KR, Silvia C, Falardeau P, Gingrich JA, Godinot N, Bertrand L, Yang-Feng TL, Fremeau RT, Jr., Caron MG (1991) Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1A receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7491-7495.
- Tolwani RJ, Jakowec MW, Petzinger GM, Green S, Wagstaff K (1999) Experimental models of Parkinson's disease: insights from many models. *Lab Anim Sci* 49:363-371.
- Tsang AH, Chung KK (2009) Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1792:643-650.
- Tsao PI, von Zastrow M (2000) Type-specific sorting of G protein-coupled receptors after endocytosis. *J Biol Chem* 275:11130-11140.
- Turmel H, Hartmann A, Parain K, Douhou A, Srinivasan A, Agid Y, Hirsch EC (2001) Caspase-3 activation in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mice. *Mov Disord* 16:185-189.
- Uitti RJ, Calne DB (1993) Pathogenesis of idiopathic parkinsonism. *Eur Neurol* 33 Suppl 1:6-23.
- Ulas J, Weihmuller FB, Brunner LC, Joyce JN, Marshall JF, Cotman CW (1994) Selective increase of NMDA-sensitive glutamate binding in the striatum of Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and mixed Parkinson's disease/Alzheimer's disease patients: an autoradiographic study. *J Neurosci* 14:6317-6324.
- Ungerstedt U (1968) 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* 5:107-110.
- Valente EM et al. (2004) Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304:1158-1160.
- van der Putten H, Wiederhold KH, Probst A, Barbieri S, Mistl C, Danner S, Kauffmann S, Hofele K, Spooren WP, Ruegg MA, Lin S, Caroni P, Sommer B, Tolnay M, Bilbe G (2000) Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein. *J Neurosci* 20:6021-6029.
- van Os J, Kapur S (2009) Schizophrenia. *Lancet* 374:635-645.
- 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.

- Varastet M, Riche D, Maziere M, Hantraye P (1994) Chronic MPTP treatment reproduces in baboons the differential vulnerability of mesencephalic dopaminergic neurons observed in Parkinson's disease. *Neuroscience* 63:47-56.
- 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.
- Vila M, Levy R, Herrero MT, Faucheux B, Obeso JA, Agid Y, Hirsch EC (1996) Metabolic activity of the basal ganglia in parkinsonian syndromes in human and non-human primates: a cytochrome oxidase histochemistry study. *Neuroscience* 71:903-912.
- Vingerhoets FJ, Villemure JG, Temperli P, Pollo C, Pralong E, Ghika J (2002) Subthalamic DBS replaces levodopa in Parkinson's disease: two-year follow-up. *Neurology* 58:396-401.
- Visanji NP, Fox SH, Johnston T, Reyes G, Millan MJ, Brotchie JM (2008) Dopamine D(3) receptor stimulation underlies the development of L-DOPA-induced dyskinesia in animal models of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*.
- Voges D, Zwickl P, Baumeister W (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 68:1015-1068.
- Voon V, Potenza MN, Thomsen T (2007) Medication-related impulse control and repetitive behaviors in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 20:484-492.
- Voon V, Hassan K, Zurowski M, Duff-Canning S, de Souza M, Fox S, Lang AE, Miyasaki J (2006) Prospective prevalence of pathologic gambling and medication association in Parkinson disease. *Neurology* 66:1750-1752.
- Weiner DM, Levey AI, Sunahara RK, Niznik HB, O'Dowd BF, Seeman P, Brann MR (1991) D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1859-1863.
- Weintraub D, Siderowf AD, Potenza MN, Goveas J, Morales KH, Duda JE, Moberg PJ, Stern MB (2006) Association of dopamine agonist use with impulse control disorders in Parkinson disease. *Arch Neurol* 63:969-973.
- Widnell K (2005) Pathophysiology of motor fluctuations in Parkinson's disease. *Mov Disord* 20 Suppl 11:S17-22.
- Willeumier K, Pulst SM, Schweizer FE (2006) Proteasome inhibition triggers activity-dependent increase in the size of the recycling vesicle pool in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 26:11333-11341.
- Wilson (1925) The Croonian lectures on some disorders of motility and muscle tone, with special reference to the corpus striatum. *Lancet* 209:53-62.

- Wise RA (1978) Catecholamine theories of reward: a critical review. *Brain Res* 152:215-247.
- Wolf ME, Sun X, Mangiavacchi S, Chao SZ (2004) Psychomotor stimulants and neuronal plasticity. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:61-79.
- Yadav PN, Chaturvedi K, Howells RD (2007) Inhibition of agonist-induced down-regulation of the delta-opioid receptor with a proteasome inhibitor attenuates opioid tolerance in human embryonic kidney 293 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 320:1186-1194.
- Yang L, Wang S, Lim G, Sung B, Zeng Q, Mao J (2008) Inhibition of the ubiquitin-proteasome activity prevents glutamate transporter degradation and morphine tolerance. *Pain* 140:472-478.
- Yao I, Takagi H, Ageta H, Kahyo T, Sato S, Hatanaka K, Fukuda Y, Chiba T, Morone N, Yuasa S, Inokuchi K, Ohtsuka T, Macgregor GR, Tanaka K, Setou M (2007) SCRAPPER-dependent ubiquitination of active zone protein RIM1 regulates synaptic vesicle release. *Cell* 130:943-957.
- Yi JJ, Ehlers MD (2007) Emerging roles for ubiquitin and protein degradation in neuronal function. *Pharmacol Rev* 59:14-39.
- Yin HH, Knowlton BJ (2006) The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat Rev Neurosci* 7:464-476.
- Zhang J, Vinuela A, Neely MH, Hallett PJ, Grant SG, Miller GM, Isacson O, Caron MG, Yao WD (2007) Inhibition of the dopamine D1 receptor signaling by PSD-95. *J Biol Chem* 282:15778-15789.
- Zhao Y, Hegde AN, Martin KC (2003) The ubiquitin proteasome system functions as an inhibitory constraint on synaptic strengthening. *Curr Biol* 13:887-898.
- Zhou C, Huang Y, Przedborski S (2008) Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance. *Ann N Y Acad Sci* 1147:93-104.
- 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.
- Zhuang X, Belluscio L, Hen R (2000) G(olf)alpha mediates dopamine D1 receptor signaling. *J Neurosci* 20:RC91.
- Zigman JM, Westerman GT, LaMendola J, Boel E, Steiner DF (1993) Human G(olf) alpha: complementary deoxyribonucleic acid structure and expression in pancreatic islets and other tissues outside the olfactory neuroepithelium and central nervous system. *Endocrinology* 133:2508-2514.

Zimmerman TR, Jr., Sage JI, Lang AE, Mark MH (1994) Severe evening dyskinesias in advanced Parkinson's disease: clinical description, relation to plasma levodopa, and treatment. *Mov Disord* 9:173-177.