

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
FAHD AWADA

LIEN ENTRE LA DOPAMINE ET LES CHANGEMENTS
DES PROTÉINES DE STRUCTURE DES NEURONES

AOÛT 2013

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Depuis mon très jeune âge, je rêvais de devenir médecin et de participer aux avancées scientifiques. Après un an d'étude médicale, ma curiosité pour la recherche m'a propulsé en maîtrise à l'UQTR où un nouveau monde palpitant s'est ouvert à moi. J'ai pu, grâce à ce mariage entre la science clinique et fondamentale, développer de meilleures aptitudes scientifiques, toutefois, sans la très généreuse aide apportée par les équipes de chercheurs, je n'aurais jamais pu réaliser cet exploit. Dans le présent mémoire, je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui ont contribué à l'élaboration de ce modeste travail ainsi qu'à la réussite de cette formidable formation. Je tiens à remercier sincèrement Dr Michel Cyr, qui, en tant que directeur de recherche, a fait preuve d'une grande générosité en m'acceptant dans son laboratoire. J'exprime ma gratitude pour la confiance qu'il a eue en moi. Dr Cyr s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de ma formation. Son expérience dans le domaine m'a permis de gagner un temps précieux dans la réalisation de ce projet. Mes remerciements s'adressent également à Geneviève Bureau, auxiliaire de recherche, Laure Chagniel, étudiante au doctorat, Julie Allyson, auxiliaire de recherche, ainsi qu'à Christine Robitaille, étudiante à la maîtrise, pour leurs contributions à la réalisation de ce projet malgré leurs charges académiques et professionnelles élevées. La rigueur et la persévérance avec laquelle vous travaillez sont exemplaires. Votre enthousiasme pour la recherche et vos charmantes personnalités ont créé une ambiance de travail extraordinaire. Je remercie également Catarina Leote Franco Pio, notre admirable secrétaire, qui a fait preuve de grande patience et qui a su m'encadrer à maintes reprises. Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers les directeurs de recherche Gilles Bronchti et Denis Boire pour avoir eu la gentillesse de m'introduire au monde de la recherche. Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à tous mes proches et amis qui m'ont toujours soutenue et encouragée au cours de la réalisation de ce travail ardu. Merci à tous et à toutes pour l'aide et le temps que vous aviez bien voulu me consacrer. Sans votre soutien, ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

RÉSUMÉ

La dopamine a un impact sur de multiples neurones et joue un rôle modulateur sur les fonctions psychiques et motrices essentielles. Elle est impliquée dans de multiples pathologies telles que le Parkinson, la Schizophrénie, le syndrome de la Tourette, etc. Dans le parkinson, une maladie dégénérative qui résulte de la mort lente et progressive des neurones à la dopamine, le précurseur lévodopa est utilisé pour améliorer les symptômes moteurs causés par la carence en dopamine. Toutefois, le traitement à long terme avec des agonistes dopaminergiques entraîne des complications motrices nommées dyskinésie. Cet effet secondaire est mal compris et nous indique que suite à des stimulations dopaminergiques répétées à long terme il se pourrait qu'il y ait des modifications de la réponse du neurone pour un même stimulus. Sachant que la structure et la fonction cellulaire vont de pairs, de nouvelles évidences démontrent que les traitements qui modifient les niveaux de dopamine dans le cerveau peuvent induire des modifications du cytosquelette des neurones. La signalisation dopaminergique dans des conditions normales de niveau de dopamine est bien connue, mais le concept, que la transmission dopaminergique pourrait modifier le cytosquelette cellulaire, est novateur et encore peu exploré. Nous avons récemment démontré dans des cultures cellulaires et des tranches de striatum de rats que l'activation des récepteurs dopaminergiques pouvait réguler des protéines de structures cellulaires comme la protéine Tau, responsable de l'organisation du cytosquelette. La présente étude investigate comment le système de transmission dopaminergique via les récepteurs est capable d'influencer le cytosquelette en étudiant la protéine Tau du striatum. Nous avons étudié les effets et les mécanismes impliqués dans la stimulation des récepteurs dopaminergiques dans des milieux *ex vivo* en utilisant des tranches de striatum de rats. Nous avons ensuite travaillé dans des milieux *in vivo* sur un modèle plus physiologique, la souris, où nous avons modifié les niveaux de dopamine du striatum à l'aide de L-DOPA et de MPTP. Nos résultats du côté *ex vivo* indiquent que l'hyperphosphorylation de Tau pourrait altérer les propriétés physico-chimiques de cette protéine. Nous avons de plus démontré que la dopamine altérerait la phosphorylation de Tau via les récepteurs du glutamate, et plus particulièrement la sous-unité NR2A des récepteurs NMDA. Au niveau *in vivo*, nous avons démontré que la dopamine avait un effet tonique sur la phosphorylation de Tau et que la dénervation des neurones dopaminergiques est une condition essentielle pour induire des changements du cytosquelette induit par la dopamine. Ces travaux ont permis de mettre en évidence de nouveaux mécanismes moléculaires dans la transmission dopaminergique lors de conditions dopaminergiques pathologiques telle que vue dans le parkinson. De plus, ils ont permis de mettre en évidence le rôle joué de la dopamine dans les altérations des constituants du cytosquelette pouvant jouer un rôle dans le fonctionnement du neurone.

Mots-clés : Tau, Dopamine, L-DOPA, Glutamate, MPTP, Parkinson

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	viii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Dopamine : généralité	1
1.1.1 Rôle central et périphérique.....	1
1.1.2 Biosynthèse et métabolisme.....	2
1.1.3 Voie de projection dopaminergique centrale et Striatum	5
1.2 Récepteurs dopaminergiques : généralité	8
1.2.1 Famille des récepteurs D1.....	10
1.2.2 Famille des récepteurs D2.....	11
1.2.3 Particularité d'adaptation des récepteurs dopaminergiques : exemple de la maladie de Parkinson	12
1.3 Signalisation dopaminergique : généralité.....	14
1.3.1 Mécanismes connus	16
1.3.1.1 CREB.....	16
1.3.1.2 DARPP-32	17
1.3.1.3 Canaux ioniques : NMDA, AMPA, GABA	17
1.3.2 Nouveaux développements	18
1.3.3 Protéines du cytosquelette	19
1.4 Rationnelle + hypothèse de recherche	23
1.4.1 Généralité.....	23
1.4.2 Est-ce que la stimulation des récepteurs dopaminergiques altère la phosphorylation de Tau de façon continue et est-ce que cette hyperphosphorylation entraîne la formation d'agrégats?	24
1.4.3 Quel est le rôle de l'activité des récepteurs glutamatergiques dans la phosphorylation de Tau induite par la stimulation dopaminergique?.....	25
1.4.4 Comment les différents niveaux dopaminergiques <i>in vivo</i> affectent la phosphorylation de Tau?.....	25

CHAPITRE II	
MATÉRIEL ET MÉTHODES	26
2.1 Partie <i>ex vivo</i>	26
2.1.1 Animaux.....	26
2.1.2 Préparation des coupes de tissus	26
2.1.3 Traitements pharmacologiques	27
2.1.4 Fractionnement au sarkosyl	28
2.1.5 Western blot.....	29
2.1.6 Anticorps.....	30
2.2 Partie <i>in vivo</i>	30
2.2.1 Animaux.....	30
2.2.2 Traitements	31
2.2.3 Préparation des tissus.....	32
2.3 Analyses statistiques.....	32
CHAPITRE III	
RÉSULTATS.....	33
3.1 SKF38393 ne modifie pas la quantité de Tau total au niveau du striatum	33
3.2 Tau sérines 199-202 et sérine 214 sont phosphorylés lorsque les tissus sont traités avec SKF38393	34
3.3 SKF38393 augmente la quantité de protéine Tau ainsi que sa phosphorylation au niveau sérines 199-202 dans sa fraction insoluble au sarkosyl.....	35
3.4 SKF38393 phosphoryle Tau au niveau des sérines 199-202 en utilisant la voie NMDA et plus spécifiquement sa sous-unité NR2A	38
3.5 Le traitement au MPTP induit une déplétion des neurones dopaminergiques dans la voie nigrostriée chez les v	39
3.6 L'effet des traitements au MPTP et de la L-DOPA ne modifie pas la quantité de Tau total	40
3.7 L'hyperstimulation des récepteurs D1 avec des traitements à la L-DOPA augmente les niveaux de p-Tau 199-202 et p-Tau 214 transitoirement	41
CHAPITRE IV	
DISCUSSION	44
4.1 Relation entre le MPTP et les protéines de structure.....	44

4.2	La phosphorylation de Tau induite par la dopamine sur les coupes de tissus de rats nécessite l'activation des récepteurs NMDA et plus spécifiquement la sous-unité NR2A	45
4.3	Altération physico-chimique de la protéine Tau lorsqu'elle est hyperphosphorylée.....	47
4.4	La dénervation est essentielle pour induire des changements du cytosquelette .	48
4.5	Effet tonique de la DA sur la phosphorylation de Tau dans les neurones du striatum	49
CHAPITRE V		
CONCLUSION.....		50
5.1	Implication des altérations des propriétés physicochimiques de Tau et les processus de développement des dyskinésies.....	50
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		52

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure		Page
1.1	Biosynthèse des catécholamines. (Tirée de P. Allain.).....	3
1.2	Synapse dopaminergique. (Tirée de Landry et Gies.).....	4
1.3	Les voies de projections dopaminergiques. (Tirée de H. Blumenfeld.).....	5
1.4	Anatomie du striatum. (Tirée de H. Blumenfeld.).....	8
1.5	Récepteur dopaminergique. (Tirée de 123bio.net.)	9
1.6	Fluctuation des niveaux de dopamine cérébrale dans la maladie de Parkinson. (Tirée de W. Poewe.)	14
1.7	Schéma de la signalisation cellulaire dopaminergique. (Tirée de M. Lebel.).....	16
1.8	Composition du cytosquelette. (Tirée de E. Kandel, J. Schwartz T. Jessel.) ..	20
1.9	Sites de phosphorylation de Tau. (Tirée de A. Delacourte.).....	23
3.1	SKF-Tau 5.....	34
3.2	SKF-p-Tau	35
3.3	SKF-Sarkosyl.....	37
3.4	SKF-NMDA.....	39
3.5	MPTP-TH	40
3.6	MPTP-Tau 5.....	41
3.7	MPTP-Tau.....	43

Tableau

1.1	Localisation des récepteurs dopaminergiques dans le système nerveux central.....	12
2.1	Résumé des principaux traitements pharmacologiques pour les groupes de souris.....	31

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AMPA	« Alpha-amino-3-hydroxy-5méthylisoazol-4-propionate »
AMPC	Adénosine 3'5'cyclique monophosphate
ATP	Adénosine triphosphate
CAMKII	Calmoduline kinase II
Cdk5	Kinase 5 cycline dépendante
COMT	Catéchol-O-méthyltransférase
CREB	« cAMP response element binding protein »
CRE	« cAMP response element »
DARPP-32	« cAMP regulated phosphoprotein of 32 KDa »
DAT	Transporteur de la dopamine
DDC	DOPA décarboxylase
ERK	« Extracellular signal-regulated kinase »
DOPAC	Acide dihydroxyphénylacétique
GABA	Acide gaba-aminobutyrique
GDP	Guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
GSK3	Glycogène synthase kinase-3
JNK	« c-JUN N-terminal kinase »
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyphénylalanine
LCR	Liquide céphalo-rachidien
MAP	Protéines associées au microtubule
MAO	Monoamines oxydases intraneurones
MAPK	« Mitogen-activated protein kinases »

MPP+	1-méthyl-4-phenylpyridinium
NMDA	N-méthyl-D-aspartique
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PP1	Protéine phosphatase 1
PP2B	Calcineurine protéine calcium dépendante
SDS-PAGE	« Sodium dodecyl sulfate- Polyacrylamide gel electrophoresis »
SNC	Substance noire pars compacta
STOP	« Stable tubule only polypeptides »
TH	Tyrosine hydroxylase
VTA	Aire tegmentale ventrale
VMAT	Transporteurs vésiculaires des monoamines

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Dopamine : généralité

La dopamine est un neurotransmetteur de faible poids moléculaire qui appartient à la famille des catécholamines. C'est un neurotransmetteur neuromodulateur comme la sérotonine, l'acétylcholine, l'histamine, etc. Il est sécrété par un groupe restreint de neurones et agit au niveau du système nerveux. Bien que la dopamine soit minoritaire dans le cerveau, elle a un impact sur de multiples neurones, et elle joue un rôle modulateur des fonctions psychiques et motrices essentielles. Elle est impliquée dans de multiples pathologies telles que le Parkinson, la Schizophrénie, le syndrome de la Tourette et l'hyperprolactinémie, ce qui fait des systèmes dopaminergiques le centre d'intérêt de beaucoup de recherches. Par exemple, des antagonistes des récepteurs dopaminergiques sont développés pour bloquer les hallucinations et les idées délirantes dans la schizophrénie alors que des agonistes des récepteurs dopaminergiques sont développés pour améliorer les symptômes moteurs parkinsoniens. Toutefois, la stimulation des récepteurs dopaminergiques par la dopamine entraîne des effets indésirables à long terme.

1.1.1 Rôle central et périphérique

La dopamine, au niveau du système nerveux central, est sécrétée par les neurones dopaminergiques. Elle est impliquée dans la motricité, les émotions, la motivation, la modulation des comportements de dépendance et les fonctions cognitives. Elle agit aussi en tant que neuro-hormone lorsqu'elle est sécrétée par l'hypothalamus pour moduler la libération de prolactine [1, 2]. Elle est également précurseure de la noradrénaline dans les neurones noradrénergiques et adrénérgiques centraux.

Au niveau du système nerveux périphérique, la dopamine est précurseur de la noradrénaline dans les neurones postganglionnaires du système sympathique de même que dans les cellules chromaffines de la médullosurrénale [3]. Elle est présente dans la circulation sanguine et exerce son effet sur plusieurs récepteurs catécholaminergiques ($\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$, D1) situés sur de nombreux tissus périphériques, d'où son action sur le système cardiovasculaire, rénal et gastro-intestinal [4].

1.1.2 Biosynthèse et métabolisme

L'étymologie du mot dopamine provient de la décarboxylation amine de la L-DOPA (Levodopamine) qui est une abréviation de L-3,4-dihydroxyphénylalanine [5]. La dopamine a été pour la première fois synthétisée par George Barger et James Ewens dans le laboratoire Wellcome en 1910 à Londres en Angleterre [5, 6]. Dans l'organisme, la dopamine est produite par les tissus nerveux et par la portion médullaire de la glande surrénale. Étant donné qu'elle ne traverse pas la barrière hématoencéphalique, la dopamine au niveau central est régulée indépendamment de son niveau périphérique [5]. Au niveau du système nerveux central, la dopamine est synthétisée dans les neurones à partir de la tyrosine, un acide aminé qui, à la suite de son hydroxylation par la tyrosine hydroxylase (TH), est transformé en L-DOPA. L'activité de TH est d'ailleurs considérée comme l'étape limitante de la biosynthèse des catécholamines [7]. La L-DOPA, à son tour, est alors métabolisée en dopamine par la DOPA décarboxylase (DDC) (Figure 1.1).

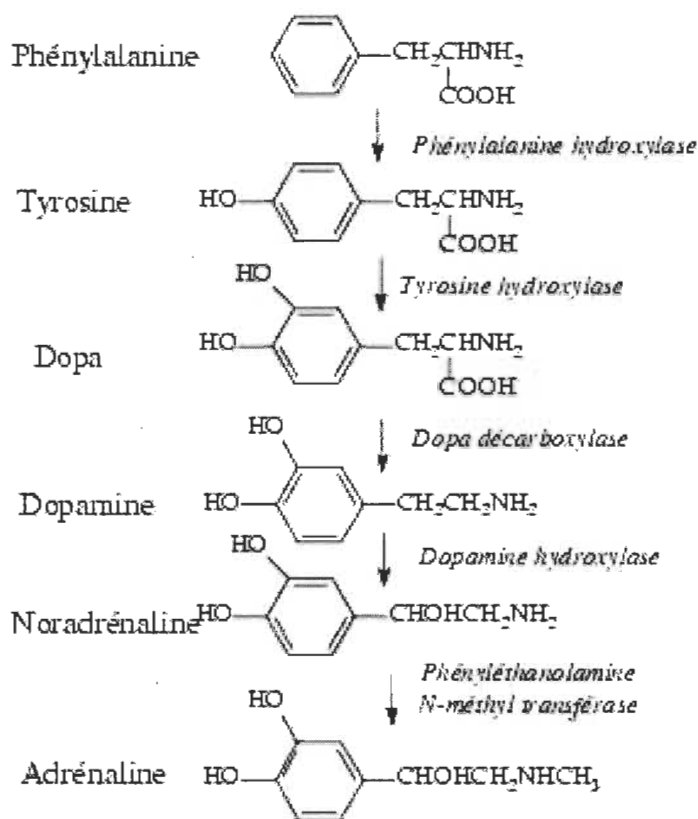


Figure 1.1 Biosynthèse des catécholamines. (Tirée de P. Allain [8].)

Le stockage de la dopamine dans les terminaisons nerveuses se fait dans des vésicules synaptiques par l'intermédiaire des transporteurs vésiculaires des monoamines VMAT-1 et -2 alors que la dopamine cytosolique libre se dégrade en acide dihydroxyphénylacétique (DOPAC) via les monoamines oxydases intraneurales (MAO) [9]. Le stockage à l'intérieur des vésicules synaptiques permet de maintenir une concentration élevée en dopamine dans les terminaisons nerveuses et subséquemment, lors de l'arrivée du potentiel d'action, de libérer une plus grande quantité de neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Ces neurotransmetteurs vont ensuite aller activer les récepteurs dopaminergiques qui se situent surtout sur les éléments postsynaptiques. Ces neurotransmetteurs peuvent également activer des autorécepteurs qui sont situés sur le neurone présynaptique et ainsi moduler la relâche de la dopamine. (Figure 1.2). À la suite de la transmission du signal, deux voies majeures d'élimination de la dopamine existent. Dans la première, il se produit un phénomène de recapture de la

dopamine par le transporteur de la dopamine (DAT) situé sur le neurone présynaptique [10]. Ceci se produit dans la plupart des régions du cerveau, incluant le striatum et les ganglions de la base. C'est ainsi qu'environ 80 % de la dopamine présente dans la fente synaptique est retirée. Une partie de la dopamine recyclée est dégradée par la MAO intraneuronale alors que le reste est emmagasiné dans des vésicules synaptiques tout comme la dopamine nouvellement synthétisée. La deuxième voie d'élimination fait intervenir le catabolisme de la dopamine résiduelle au niveau de la fente synaptique. Cette dernière est convertie en métabolite par deux enzymes : la catéchol-O-méthyltransférase (COMT) et la MAO extraneuronale [9].

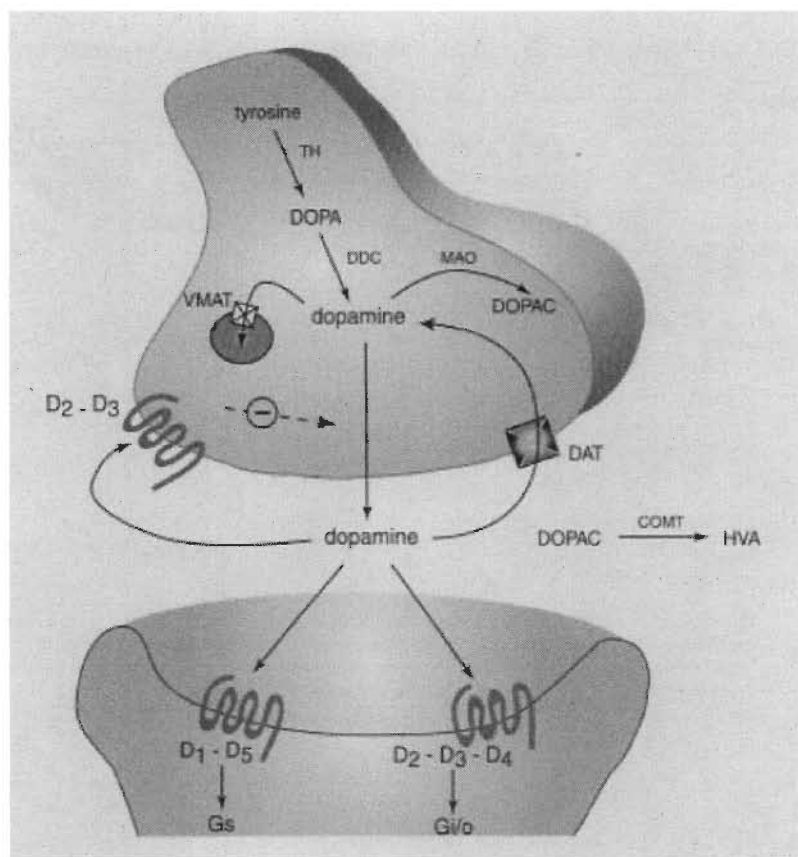


Figure 1.2 Synapse dopaminergique. (Tirée de Landry et Gies [11].)

Dans cette figure, nous voyons les étapes amenant à la synthèse et le catabolisme de la dopamine ainsi que les récepteurs sur lesquels cette dernière agit.

1.1.3 Voie de projection dopaminergique centrale et Striatum

La plupart des neurones dopaminergiques dans le système nerveux central sont situés dans le tronc cérébral et principalement au niveau de la substance noire pars compacta (SNc) et de l'aire tegmentale ventrale (VTA). Les projections axonales qui émanent des corps cellulaires de ces neurones ont pour cibles diverses structures corticales et sous-corticales. De nombreuses études ont mis en évidence plusieurs voies de projections dopaminergiques dont trois d'entre elles sont particulièrement importantes (Figure 1.3).

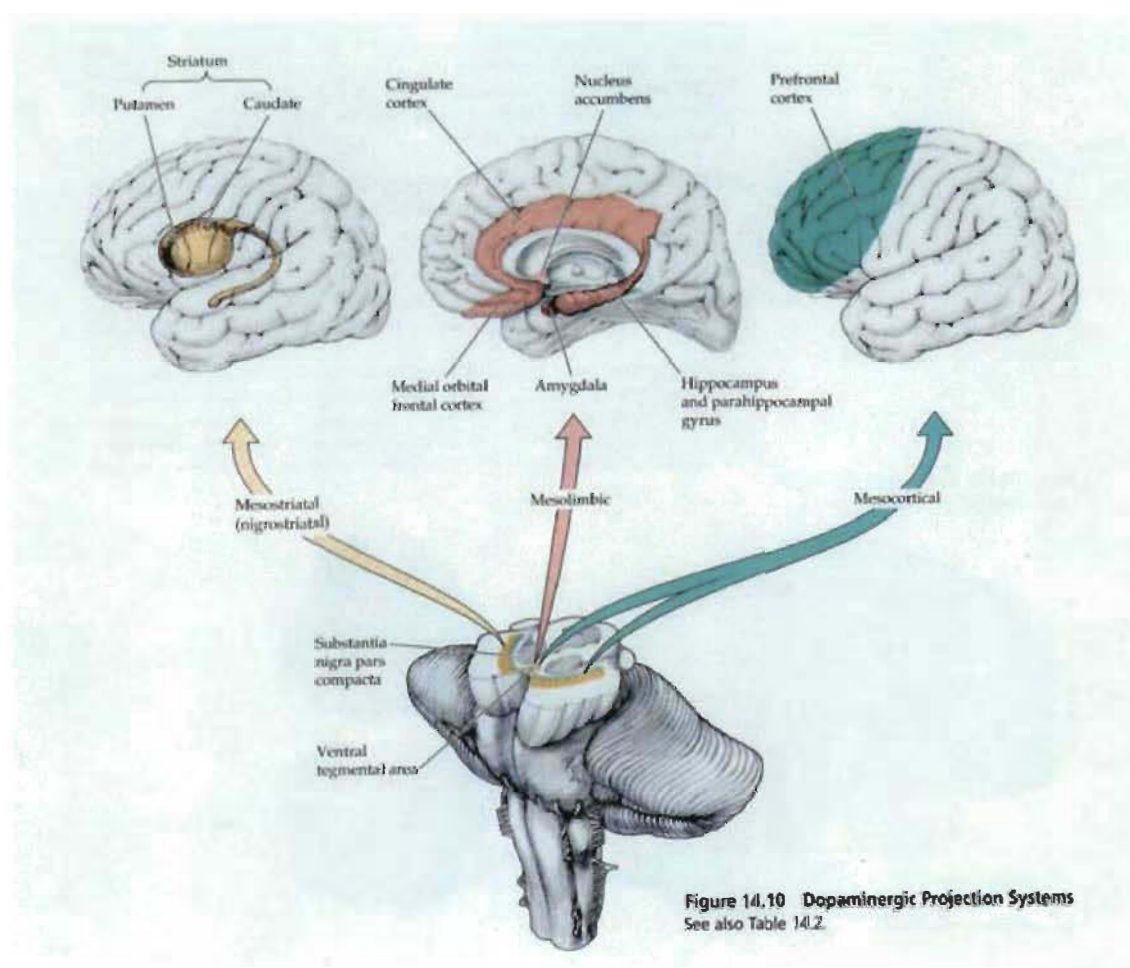


Figure 1.3 Les voies de projections dopaminergiques. (Tirée de H. Blumenfeld [12].)

La voie mésocorticale provient de la VTA et projette au cortex frontal et temporal, en particulier vers le gyrus cingulaire antérieur, l'aire enthorinale et le cortex préfrontal.

Les faisceaux dopaminergiques dans cette voie jouent un rôle dans la concentration et les fonctions exécutives comme la mémoire de travail. Des dysfonctionnements dans cette voie sont à l'origine des symptômes de la schizophrénie [13].

Les corps cellulaires des neurones dopaminergiques dans la voie mésolimbique sont situés dans la VTA, et ils ont pour cibles la région ventrale du striatum, appelée également noyau accumbens, la stria terminalis, le tubercule olfactif, le septum, l'amygdale et l'hippocampe. Cette voie représente le système de récompense et de renforcement. Elle est impliquée dans la mémoire et la motivation des comportements émotionnels. Une autre de ses fonctions importantes est son rôle dans les phénomènes de dépendance [14]. Par exemple, la cocaïne provoque une augmentation de dopamine dans les fentes synaptiques au niveau du noyau accumbens en modifiant le fonctionnement du système de recapture de la dopamine. D'ailleurs, d'autres substances psychoactives comme l'amphétamine, l'alcool et les opiacés provoquent une augmentation des taux extracellulaires de dopamine dans le noyau accumbens [15]. Des dysfonctions dans cette voie de projection sont associées à des troubles comme les psychoses, l'hyperactivité, les déficits d'attention et la dépression [16].

Les cellules nerveuses dopaminergiques de la voie nigrostriée représentent environ 95 % des neurones de cette voie [17] et 80 % des neurones dopaminergiques du système nerveux central. Ce sont des neurones qui proviennent de la SNc et irradient vers le striatum dorsal constitué du noyau caudé et du putamen. Ce réseau constitue un système modulateur des aires corticales motrices d'où son importance dans le contrôle des fonctions motrices. C'est d'ailleurs la perte de plus de 50 % des neurones dopaminergiques projetant au striatum dans cette voie qui cause des symptômes parkinsoniens. D'autres rôles tout aussi importants leur sont attribués dans des fonctions non motrices comme la cognition [18].

Le striatum est l'une des structures de noyaux sous-corticaux qui composent les ganglions de la base. Il existe un réseau enchevêtré de neurones entre les ganglions de la base et les différentes aires corticales. Le striatum avec le noyau sous-thalamique est la

principale entrée des fibres des ganglions de la base. Le striatum est composé du noyau caudé, du putamen et du noyau de l'accumbens (Figure 1.4) qui partagent de nombreux éléments au niveau de l'organisation de leur connexion [19]. Les noyaux du striatum ont la même origine embryonnaire et fusionnent antérieurement. À l'extérieur des ganglions de la base, les plus importantes connexions au striatum se font à partir du cortex cérébral. Bien que le striatum n'influence pas directement les neurones moteurs de la moelle épinière, c'est via son action indirecte sur certaines régions motrices du cortex cérébral qu'il influe sur le contrôle du mouvement. Ses connexions, topographiquement bien organisées [20], sont de nature excitatrice et utilisent le glutamate comme neurotransmetteurs. Le putamen est la portion du striatum la plus impliquée dans le contrôle du mouvement, recevant des projections des zones motrices du cortex préfrontal alors que le noyau caudé est relié aux régions associatives corticales. Le noyau accumbens et la majeure partie ventrale du putamen et du noyau caudé seraient plutôt associés aux fonctions limbiques du striatum. Au niveau des connexions intrinsèques des ganglions de la base, le striatum est la cible principale des projections dopaminergiques de la plus importante voie dopaminergique du système nerveux central soit la voie nigrostriée. Dans cette voie, les cellules latérales de la substance noire pars compacta projettent sur le striatum dorsal alors que les cellules médianes projettent sur le noyau accumbens, le striatum ventral de même que plusieurs structures limbiques. Ce sont ces deux voies dopaminergiques qui sont impliquées dans le contrôle des mouvements moteurs. On distingue une voie directe D1 et une voie indirecte D2 qui, une fois activées, pourront réguler et moduler les mouvements. Notons que les récepteurs dopaminergiques sont fortement exprimés au niveau des neurones épineux de taille moyenne qui composent 95 % de la population neuronale du striatum. Les neurones qui expriment la famille des récepteurs D1 synthétisent deux neuropeptides, la substance P et la dynorphine, et sont les composantes principales de la voie striatopallidale directe. À l'inverse, les neurones qui expriment la famille des récepteurs D2 sont riches en enképhaline et sont impliqués dans la voie striatopallidale indirecte [21].

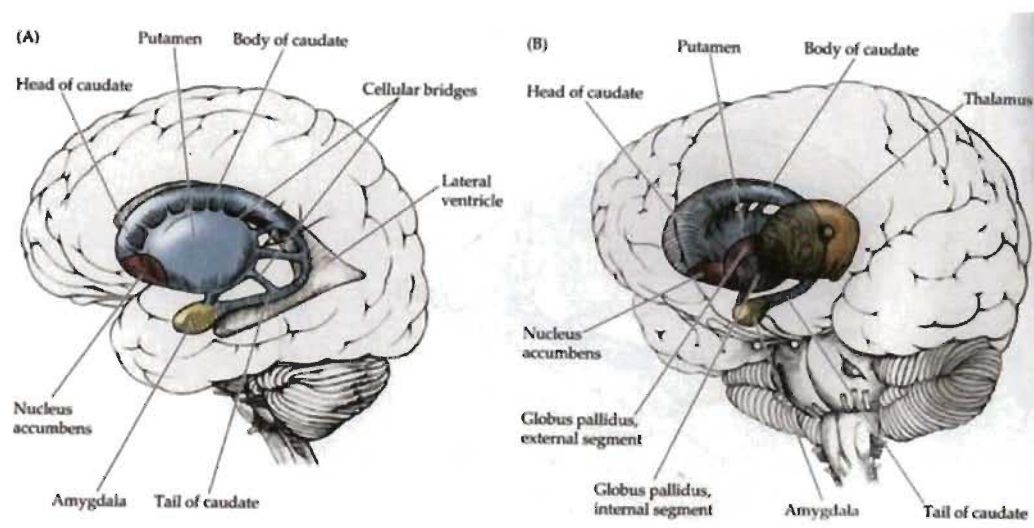


Figure 1.4 Anatomie du striatum. (Tirée de H. Blumenfeld [12].)

1.2 Récepteurs dopaminergiques : généralité

La dopamine exerce son effet sur des récepteurs spécifiques. La première évidence de l'existence de récepteurs dopaminergiques au niveau du système nerveux central a été en 1972, lorsqu'il a été démontré que la dopamine stimulait l'activité de l'adénylate cyclase [22]. Quelques années plus tard, les évidences pharmacologiques et biochimiques ont démontré la possibilité de multiples sites de liaisons de la dopamine [5, 6]. Par la suite, à la fin des années 80, il a été découvert que la dopamine exerçait son action sur deux populations de récepteurs distincts : l'une est couplée à l'adénylate cyclase et l'autre reste indépendante de celle-ci. Ces deux groupes de récepteurs ont finalement été classifiés en récepteur D1 et D2 basé sur leurs effets pharmacologiques et leurs couplages à l'adénylate cyclase. La classe des récepteurs D1 active l'adénylate cyclase et permet l'accumulation adénosine 3'5'cyclique monophosphate (AMPC), alors que la classe des récepteurs D2 inhibe l'activité de l'adénylate cyclase et diminue la quantité d'AMPC. Ce concept binaire est devenu la base de l'étude des récepteurs dopaminergique et a ouvert la voie à la récente caractérisation des récepteurs dopaminergiques. De récents développements en biologie moléculaire, incluant le clonage des gènes et/ou de l'ADN, ont révélé que l'hétérogénéité dans les caractéristiques biochimiques des récepteurs D1 et D2 indiquait la présence de

sous-types de récepteurs encore non soupçonnés [23]. Les récepteurs dopaminergiques sont exprimés dans différentes régions du cerveau et malgré la co-expression de plusieurs sous-types de récepteurs dans certaines structures cérébrales, le clonage moléculaire a permis d'étudier les propriétés individuelles des récepteurs dopaminergiques dans les cultures cellulaires. On connaît actuellement cinq types de récepteurs dopaminergiques codés par cinq gènes différents. Ce sont tous des récepteurs métabotropiques; ils font tous partie de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G, formés de sept domaines transmembranaires composés de trois sous-unités α , β et γ [24] (Figure 1.5). Lorsque le récepteur D1 est activé par son ligand, la molécule de guanosine diphosphate (GDP) liée à la sous-unité α est expulsée, et remplacée par de la guanosine triphosphate (GTP). La sous-unité α se sépare alors du dimère β - γ et active l'adénylate cyclase, transformant l'adénosine triphosphate (ATP) en AMPc. L'AMPc ainsi synthétisée active la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA). En résumé, la famille des récepteurs de type D₁, appelée D1-like, comprend les récepteurs D₁ et D₅ qui ont en commun la fonction d'être couplés à des protéines G de type G_s (s pour stimulation). Une fois activé, ces dernières croissent l'activité de l'adénylate cyclase et par conséquent, augmentent le taux de AMPc intracellulaire. À l'inverse, la famille des récepteurs D₂ appelée D2-like, comprend les récepteurs D₂-D₃-D₄. Ils sont couplés à une protéine G de type G_{i/o} qui diminue l'activité de l'adénylate cyclase et les taux de AMPc intracellulaire.

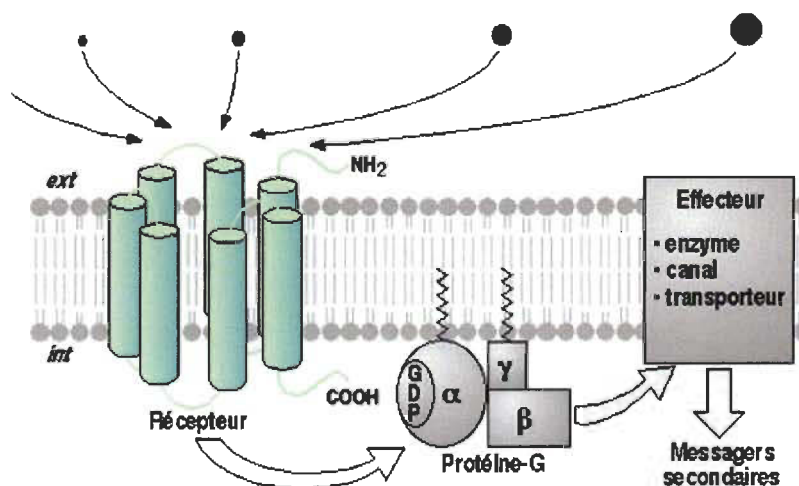


Figure 1.5 Récepteur dopaminergique. (Tirée de 123bio.net [25].)

1.2.1 Famille des récepteurs D1

L'étude de la distribution des récepteurs dopaminergiques dans le cerveau est d'un grand intérêt puisque cela met la lumière sur les rôles individuels des sous-types de récepteurs contrôlant les multiples fonctions cérébrales avec laquelle la dopamine est associée (Tableau 1.1). C'est avec l'hybridation *in situ*, méthode de choix, que les ARN messenger (ARNm) des récepteurs sont associés à la localisation des récepteurs dopaminergiques avec leurs sous-types. Les récepteurs D1-like ont une localisation somatodendritique dans le système nerveux central, et se retrouvent le plus souvent au niveau post synaptique. Cependant, il arrive que des protéines de récepteurs dopaminergiques D1-like se retrouvent au niveau présynaptique, alors que leurs ARNm n'y sont pas. Ceci suggère que ces récepteurs dopaminergiques sont principalement présents en projection par translocation axonale. Par exemple, au niveau de la substance noire pars reticulata, les projections axonales, proviennent, dans ce cas, des neurones du striatum de type GABAergique co-exprimant la substance P [23, 26]. La sous-unité D1 est la plus étendue et possède la plus forte densité dans le cerveau [23, 26]. Dans le système nerveux central de l'humain, la quantité relative des récepteurs dopaminergique est $D1 > D2 > D3 > D5 > D4$ [2]. Les récepteurs D1 se trouvent en grande quantité au niveau du striatum, noyau accumbens et le tubercule olfactif. Ils sont majoritairement localisés sur les neurones épineux de taille moyenne. Ils se trouvent également en quantité moyenne au niveau du globus pallidus, de la substance noire et du cervelet et en faible quantité au niveau du cortex cérébral [2, 4, 27].

Le récepteur D5 est exprimé à un niveau nettement plus faible que le récepteur D1 et possède une distribution plus limitée. Néanmoins, son affinité nettement supérieure à celle du récepteur D1 lui confère un rôle tout aussi important [28]. Il se retrouve principalement sur les neurones épineux de taille moyenne ainsi que sur les neurones cholinergiques du striatum avec des niveaux plus élevés au niveau du noyau accumbens et du tubercule olfactif. On le retrouve également au niveau de l'hippocampe, des noyaux parafasciculaires et mamillaires latéraux du thalamus, la SNc, l'hypothalamus, le globus pallidus et le cortex cérébral [28, 29].

1.2.2 Famille des récepteurs D2

Les récepteurs D2 sont distribués de façon très similaire aux récepteurs D1. Des travaux récents ont démontré qu'il existait deux isoformes des récepteurs D2: D2_L (long) et D2_s (court). Ils sont le produit du même gène, mais le récepteur D2_s est généré par un épissage alternatif à partir de l'ARNm du D2_L. Les récepteurs D2_L sont essentiellement postsynaptiques, alors que les récepteurs D2_s sont essentiellement présynaptiques [21]. Ils possèdent une pharmacologie identique et leurs expressions se chevauchent au niveau des régions cérébrales ainsi qu'au niveau cellulaire avec la prédominance de la longue isoforme [30, 31]. Cependant, la proportion de ces deux isoformes varie de région en région dans le cerveau et leurs régulations quantitatives en réponse à certains médicaments ciblant le système dopaminergique sont différentes [32, 33]. Le récepteur D2 est exprimé au niveau du striatum, du noyau accumbens et du tubercule olfactif. Il se retrouve principalement sur les neurones épineux de taille moyenne ainsi que sur les neurones cholinergiques du striatum [34, 35]. Il est aussi retrouvé dans la substance SNc et dans la VTA où il est exprimé par les neurones dopaminergiques [36]. Sa présence au niveau présynaptique dans les neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée suggère un rôle d'autorécepteur en ayant une fonction de rétroaction négative sur la libération de dopamine [21]. Le récepteur D2 est aussi exprimé aussi sur l'hypophyse et régule la production et sécrétion de prolactine [1].

Le récepteur D3 est fortement exprimé dans le noyau accumbens et les îlots de Calleja. Ces îlots sont situés antérieurement à proximité du striatum ventral, de l'amygdale et du tubercule olfactif. Il se retrouve aussi en plus faible quantité au niveau du globus pallidus, du thalamus, de l'amygdale, de la substance noire, de la VTA et du cervelet [37]. Son profil pharmacologique semblable à D2 possède de légères différences comme une affinité plus élevée pour l'agoniste dopaminergique quinpirole [38]. Il existe au niveau présynaptique où il a un rôle d'autorécepteur ainsi qu'au niveau postsynaptique où il favorise l'activité locomotrice [39-41].

Le récepteur D4 est exprimé préférentiellement dans le cortex frontal, l'hippocampe et l'hypothalamus. Sa concentration la plus élevée se trouve dans le noyau latéral septal et dorsomédial du thalamus [42, 43]. Sa faible présence dans les ganglions de la base en fait une cible de choix pour les antipsychotiques qui sont des antagonistes des récepteurs dopaminergiques. Cette sélectivité a permis de réduire considérablement les effets secondaires indésirables des antipsychotiques telles l'émergence de troubles extrapyramidaux et les dyskinésies tardives [41, 44] tout en gardant l'effet psychique recherché du traitement.

Tableau 1.1
Localisation des récepteurs dopaminergiques dans le système nerveux central

Famille de type D1		Famille de type D2		
D1	D5	D2	D3	D4
Striatum, Noyau Accumbens, Tubercules Olfactifs, Globus Pallidus, SNc, Cortex, Cervelet	Hippocampe, Hypothalamus, Thalamus, SNc, Globus Pallidus, Cortex, Striatum, Noyau Accumbens, Tubercule Olfactifs	Striatum, Noyau Accumbens, SNc, Tubercules Olfactifs, VTA, Hypophyse	Îlots de Calleja, Noyau Accumbens, Globus Pallidus, Thalamus, Amygdale, SNc, VTA, Cervelet	Amygdale, Cortex, Thalamus, Hippocampe, Hypothalamus

1.2.3 Particularité d'adaptation des récepteurs dopaminergiques : exemple de la maladie de Parkinson

Les récepteurs dopaminergiques sont sujets à des mécanismes de régulation rapide (couplage avec la protéine G) et à plus long terme (régulation de la densité des récepteurs). Cette particularité d'adaptation est bien démontrée dans la maladie de Parkinson. Les symptômes moteurs parkinsoniens n'apparaissent qu'après la dégénérescence d'un grand nombre (50-80 %) des neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée [12]. Cette longue phase préclinique de la maladie de Parkinson pourrait s'expliquer par l'adaptation du système dopaminergique. Premièrement, il se produit une surproduction de dopamine par les neurones survivants. Ensuite, la dopamine diffuse

vers les cellules striatales voisines où la densité des récepteurs est augmentée (hypersensibilité postsynaptique). Finalement, le mécanisme de recapture est diminué (hypersensibilité présynaptique) pour compenser au manque de dopamine. Tant que les neurones survivent en nombres suffisants, ils assument une fonction réservoir et régularisent la libération de dopamine. Avec la dégénérescence inexorable d'un nombre croissant de neurones, des suppléments en dopamine deviennent nécessaires pour traiter les symptômes parkinsoniens. La perte supplémentaire des neurones, malgré l'administration de précurseurs de la dopamine, n'arrive plus à maintenir un niveau stable de dopamine et amène des fluctuations importantes des niveaux de dopamine au niveau de la fente synaptique (Figure 1.6). À long terme, ces fluctuations peuvent devenir problématiques et amener des effets secondaires indésirables. La dyskinésie induite par la L-DOPA est un des effets secondaires le plus problématiques d'un traitement à long terme de L-DOPA. Certaines études avancent l'hypothèse que les fluctuations exagérées de dopamine peuvent altérer la cascade d'événements dans la signalisation dopaminergique et auraient des répercussions sur l'architecture du cytosquelette des neurones [45, 46].

Notons qu'il est difficile en clinique d'utiliser un mode d'administration permettant un apport en L-DOPA stable et continue. Premièrement, car la dopamine est une molécule très instable pour être conservée dans les timbres dermiques ou autres formulations à long terme. Deuxièmement, les effets secondaires et les complications techniques associés à ses traitements découragent leurs usages [47].

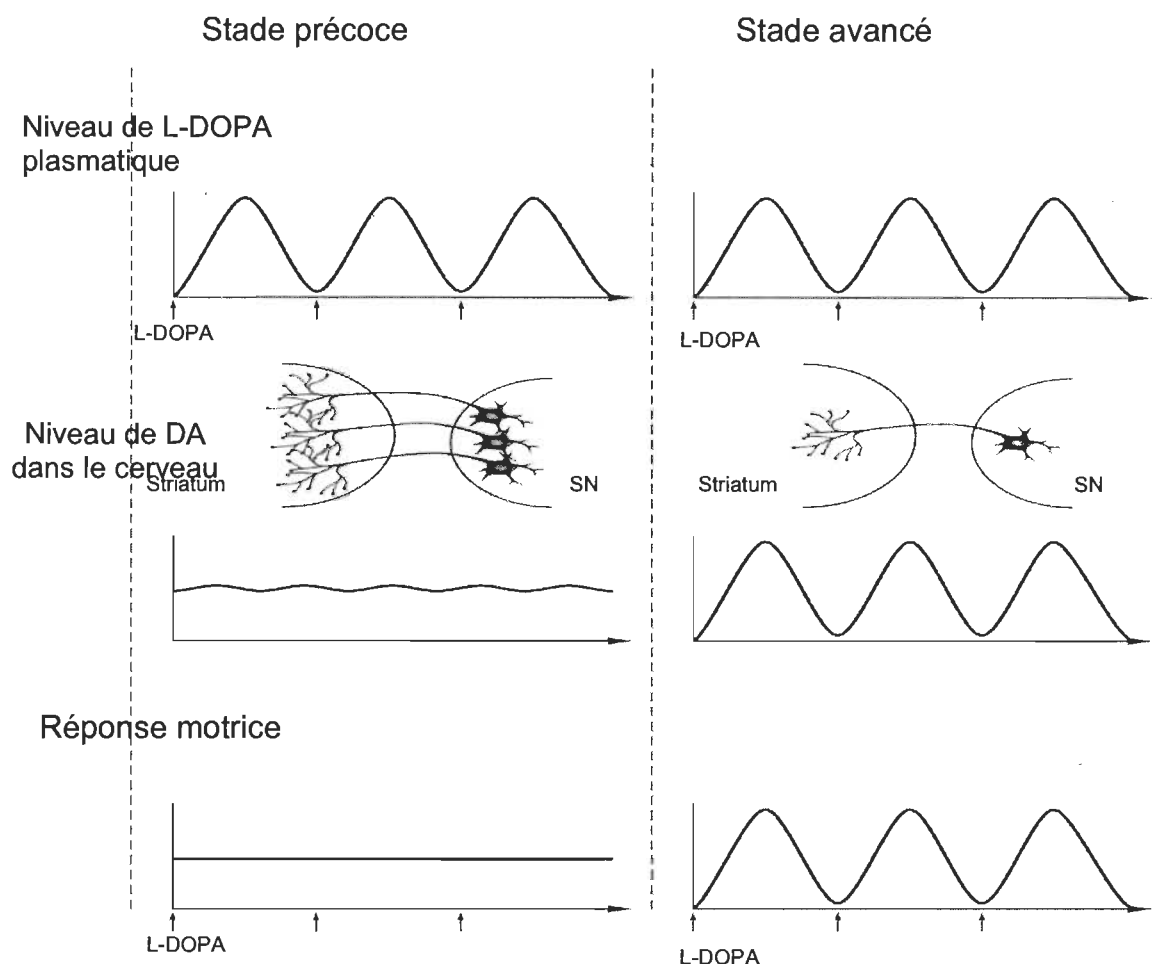


Figure 1.6 Fluctuation des niveaux de dopamine cérébrale dans la maladie de Parkinson. (Tirée de W. Poewe [48].)

Les niveaux de dopamine cérébrale fluctuent considérablement après les traitements avec la L-DOPA dans un stade avancé de la maladie (à droite) comparativement à un stade précoce de la maladie (à gauche). Cette fluctuation caractéristique est associée à la baisse du nombre de neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée. Le stockage de la dopamine étant, de ce fait, moins important, les niveaux de dopamine varient directement en fonction des concentrations bio-disponibles de L-DOPA.

1.3 Signalisation dopaminergique : généralité

Plusieurs voies de signalisations faisant intervenir la dopamine peuvent mener à des modifications du cytosquelette [46]. Tout d'abord, il existe plusieurs façons d'activer les récepteurs dopaminergiques. Certaines drogues agissent directement sur les récepteurs dopaminergiques alors que d'autres sont des précurseurs de la dopamine

comme la L-DOPA. La dopamine et les agonistes dopaminergiques différencient facilement la famille des récepteurs D1-like de la famille D2-like [41, 49]. Cependant, elles ne différencient pas clairement les membres d'une même famille de récepteurs. Par exemple, l'agoniste dopaminergique SKF38393 possède une affinité similaire à la même famille de récepteurs D1-like soit D1 et D5 [49]. Lorsque les récepteurs D1-like sont activés, l'adenylate cyclase transforme l'ATP en AMPc qui va alors activer PKA. Par phosphorylation, PKA régule un éventail de substrats protéiques comprenant entre autres : cAMP response element binding protein (CREB), cAMP regulated phosphoprotein of 32 KDa (DARPP-32), des canaux ioniques tels que les récepteurs N-méthyl-D-aspartique (NMDA), les alpha-amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate (AMPA) et l'acide gaba-aminobutyrique (GABA). Ces substrats sont impliqués dans diverses cascades de signalisations cellulaires et seront abordés dans la sous-section 1.3.1 [50]. D'un autre côté, la stimulation des récepteurs de la famille D2 inhibe l'adenylate cyclase et active la phospholipase C (PLC). La PLC active la calcineurine protéine calcium dépendante (PP2B) en mobilisant le calcium cytoplasmique. Notons que l'augmentation de calcium intracellulaire rend l'exocytose de dopamine plus difficile et c'est de cette manière que les récepteurs D2 et D3 présynaptique modulent la relâche de dopamine dans la fente synaptique. Ensuite, PP2B active CREB et inhibe DARPP-32 (Figure 1.7). De récents développements suggèrent que PKA pourrait avoir d'autres substrats parmi des mitogen-activated protein kinases (MAPK) dont extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 MAPK et c-JUN N-terminal kinase (JNK) [51].

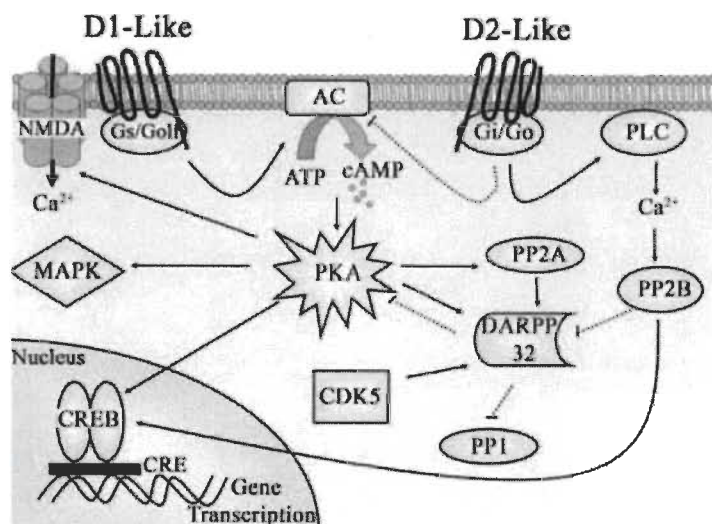


Figure 1.7 Schéma de la signalisation cellulaire dopaminergique. (Tirée de M. Lebel [52].)

1.3.1 Mécanismes connus

1.3.1.1 CREB

L'activation de CREB se fait par plusieurs voies, dont la principale fait intervenir PKA qui phosphoryle CREB sur le résidu sérine 133 dans la voie D1-like. Lorsque phosphorylé, CREB se lie à son élément de réponse cAMP response element (CRE) sur l'ADN. Ce dernier induit la transcription de plusieurs gènes, dont certains, comme c-Fos, sont aussi des facteurs de transcription responsables d'une seconde vague d'expression génique [53]. Les autres voies par lesquelles la dopamine active CREB fait intervenir ERK, NMDA et PLC β 1. L'activation des récepteurs D1 ou D2 augmente la phosphorylation du résidu sérine 133 de CREB via l'activation de ERK [54]. Aussi, l'activation du récepteur D1 est responsable de la phosphorylation indirecte de la sous-unité NR1 des récepteurs à glutamate NMDA. Cette phosphorylation est responsable de l'augmentation des niveaux de calcium intracellulaire qui induisent aussi une activation de CREB. Une augmentation de calcium intracellulaire est aussi produite après la stimulation des récepteurs D2 via l'activation de la PLC β 1. D'une part, la phosphorylation de CREB est importante parce qu'elle est produite à la suite de la stimulation des deux récepteurs D1 et D2. D'autre part à cause de son expression

génique qui joue un rôle capital dans la plasticité synaptique et contribue probablement à des réarrangements synaptiques. Il est intéressant de noter que certains de ses réarrangements sont en lien avec la persistance de phénomènes de dépendance [55]. De plus, l'accumulation d'isoforme de c-Fos, témoin de stimulation dopaminergique répétée, jouerait un rôle dans les modifications comportementales à long terme induites par la L-DOPA [56].

1.3.1.2 DARPP-32

DARPP-32 est une cible importante de PKA et possède un rôle bifonctionnel pour réguler la transmission dopaminergique. Lorsque phosphorylé par PKA ou d'autres kinases sur la thréonine 34, DARPP-32 est en mesure d'inhiber la protéine phosphatase 1 (PP1) [57] (Figure 1.7). En inhibant PP1, DARPP-32 amplifie certains effets de PKA en empêchant la déphosphorylation de plusieurs protéines substrats de PKA. De plus, PKA active la phospholipase 2A qui déphosphoryle DARPP-32 au niveau de la thréonine 75. Ceci empêche l'inhibition de PKA par DARPP-32 lorsqu'il est phosphorylé au niveau thréonine 75 et permet d'amplifier le signal médié par PKA en le gardant activé [50]. D'autre part, la phosphorylation de DARPP-32 sur la thréonine 75 par la kinase 5 cycline dépendante (Cdk5) mène à l'inhibition de PKA [58]. Étant donné son rôle d'amplificateur et d'inhibiteur de la cascade de signalisation médiée par PKA ainsi que son pouvoir modulateur sur PP1, DARPP-32 joue dans plusieurs réponses physiologiques aux drogues [59]. Notons aussi que la stimulation des récepteurs D2 module à la baisse l'activité de DARPP-32 de deux manières : en diminuant l'AMPc et avec l'activation de la voie de la cascade PP2B [60].

1.3.1.3 Canaux ioniques : NMDA, AMPA, GABA

La stimulation des récepteurs D1-like augmente la phosphorylation, par PKA, de plusieurs canaux ioniques voltage et ligand dépendant. Ceci se produit de deux façons ; soit en catalysant la phosphorylation de canaux ioniques directement par PKA ou bien par l'inhibition de PP1 via DARPP32. PKA activé augmente l'activité des canaux

calciques de type L et diminue l'activité des canaux calciques de type N et P/Q. De plus, PKA module le flux des récepteurs AMPA et GABA. PKA augmente également l'activité des récepteurs NMDA via la phosphorylation de sa sous-unité NR1. D'autre part, lorsque DARPP-32 est activé par PKA, il empêche la déphosphorylation de la sous-unité NR1 des récepteurs NMDA et contribue aussi à l'activation des récepteurs NMDA[50]. En plus de leurs effets indirects sur les récepteurs NMDA, certains récepteurs D1 sont colocalisés avec des récepteurs NMDA dans la densité postsynaptique des neurones du striatum. Il a été démontré que ce regroupement de récepteurs D1 avec les récepteurs NMDA reflète l'existence d'interactions directes [61]. Cette interaction sera discutée dans la sous-section 1.3.2.

1.3.2 Nouveaux développements

Les récepteurs couplés à la protéine G, dont font partie les récepteurs dopaminergiques, sont classiquement connus pour exister sous une forme monomérique. À la suite de leurs activations, il en découle une cascade d'activation impliquant de multiples protéines et de canaux effecteurs. Les dernières années de recherche ont permis d'établir que le modèle de récepteurs sous forme monomérique est simpliste par rapport à leur flexibilité fonctionnelle. La vision courante de l'organisation de ses récepteurs assume qu'ils forment des hétéromères ayant des interactions directes récepteurs à récepteurs [39]. Ses interactions surviennent entre les membres d'une même famille de récepteurs ou bien avec des récepteurs qui ont des structures et des fonctions différentes appartenant à d'autres familles [62-64]. Il a été démontré que les quantités d'homodimères et d'hétérodimères sont comparables et parmi les interactions entre hétérodimères elles sont plus fréquentes parmi les récepteurs d'une même famille [64]. De plus, il existe des mosaïques hétéromères complexes entre récepteurs formés de plus de deux récepteurs et qui interagissent avec une multitude de protéines adaptatrices et régulatrices [65, 66]. Les interactions de récepteurs à récepteurs modifient l'attache du ligand à son récepteur et créent de nouveaux sites de liaisons. Ils influencent aussi la spécificité de la protéine G et jouent un rôle dans la désensibilisation des récepteurs [67]. Par exemple, une augmentation synergique du signal peut se produire lorsque

deux agonistes sont présents ou bien le signal peut s'atténuer lorsque des hétérodimères interagissent entre eux négativement. Deux importants hétérodimères dopaminergiques sont constitués de l'interaction des récepteurs D1-D3 et des récepteurs D1-NMDA. Au niveau de l'interaction D1-D3, il a été démontré que ces récepteurs sont hautement co-localisés dans les neurones de la voie striato-nigrée et plusieurs évidences démontrent qu'ils interagissent directement. En effet, la stimulation du récepteur D1 induit l'expression d'ARN messager D3 dans le striatum de rats [68]. Pour ce qui est de l'interaction D1-NMDA, nous savons que les neurones du striatum expriment un haut niveau de récepteurs NMDA. Les analyses de structure et les études de fractionnement indiquent que les récepteurs D1 et NMDA sont co-localisés plus spécifiquement dans la membrane des dendrites des neurones du striatum [69]. De plus, de multiples autres approches ont démontré plus particulièrement que le récepteur D1 interagit avec NR1 et NR2A, mais pas avec la sous-unité NR2B du récepteur NMDA [69]. D'un point de vue pharmacologique, ces observations suggèrent que ces complexes de récepteurs représentent une cible potentielle de nouveaux médicaments. Pouvoir moduler l'activité de ces récepteurs pourrait conduire à d'éventuelles percées des traitements des maladies neurologiques et neuropsychiatriques.

1.3.3 Protéines du cytosquelette

Les trois éléments du cytosquelette du neurone sont les microfilaments d'actine, les neurofilaments et les microtubules (Figure 1.8). Les microfilaments sont de longues fibres protéiques de 7 nm de diamètre. Ils sont constitués de deux chaînes protéiques entrelacées formées de molécules d'actine. Ces dernières, en se polymérisant, confèrent à la cellule une viscosité accrue du cytosol ainsi que sa structure tridimensionnelle. Ils sont présents dans tout le neurone, mais ils sont particulièrement abondants le long des neurites. Quant aux neurofilaments, ce sont les structures les plus stables du cytosquelette. Ils sont formés de protéines fibrillaires assemblées de façon hélicoïdale de 10 nm de diamètre, intermédiaire entre les microfilaments et les microtubules. Ils sont présents dans tout le neurone, mais ils sont particulièrement abondants le long des axones. Ils sont composés de la copolymérisation de protéines appelées NF-L, NF-M et

NF-H qui forment des dimères. Ces dimères s'assemblent pour former des tétramères et huit tétramères s'agrègent à leur tour pour former un neurofilament. Les neurofilaments concourent largement au maintien de la forme cellulaire et à l'ancrage des organites cellulaires. Enfin, les microtubules sont les constituants les plus rigides du cytosquelette et sont particulièrement abondants au niveau de l'axe longitudinal des dendrites et de l'axone. Ils sont constitués de fibres protéiques de 20 nm de diamètre. Ses fibres protéiques sont constituées par la polymérisation de dimères de α et de β tubuline qui forment des protofilaments. Les protofilaments, au nombre de 13, sont disposés côte à côte de façon à former un tube creux. Les microtubules participent au mouvement de matériaux dans la cellule et sont impliqués dans la facilitation du mouvement cellulaire. Un groupe de protéines appelées protéines associées au microtubule (MAP) sont responsables de l'assemblage et la stabilisation des microtubules. Les MAP sont divisées en MAP de mobilisation comprenant entre autres la kinésine et la dynéine, les MAP de stabilisation comprenant Stable tubule only polypeptides (STOP) et finalement les MAP d'assemblage MAP-2 et Tau. J'élaborerai davantage cette dernière protéine, car elle est au centre de mes travaux de recherche.

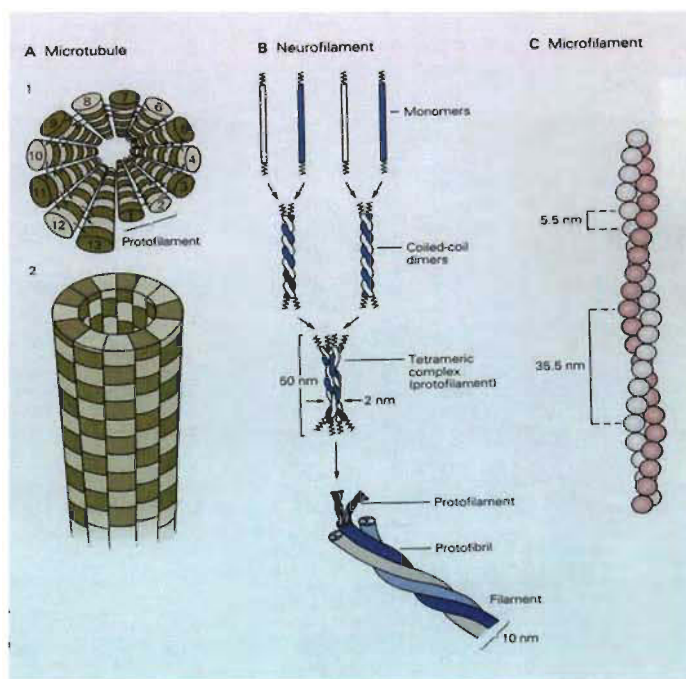


Figure 1.8 Composition du cytosquelette. (Tirée de E. Kandel, J. Shwartz T. Jessel [70].)

La protéine Tau est principalement située dans les portions distales des axones des neurones, mais elle est également présente au niveau des compartiments somato-dendritiques des cellules gliales et des astrocytes. Cela contraste avec STOP présent dans la portion proximale des axones et avec MAP2 présent dans les dendrites. La protéine Tau est le produit d'épissage alternatif à partir d'un gène unique (MAPT). Ce gène codant la protéine Tau est situé sur le bras long du chromosome 17 et est localisé plus précisément sur la position 17q21. Les isoformes de la protéine Tau sont le résultat de l'épissage alternatif dans les exons 2, 3, et 10 du gène Tau. Les 6 isoformes de Tau ainsi produits se distinguent par leur nombre de domaines de liaison : trois isoformes ont trois domaines de liaisons et les trois autres ont quatre domaines de liaisons. Les isoformes à quatre domaines de liaison stabilisent mieux les microtubules que celles avec trois domaines de liaison. Les domaines de liaison sont localisés à la terminaison carboxy de la protéine et ils sont positivement chargés, ce qui leur permet de lier le microtubule chargé négativement. La fonction principale de la protéine Tau est d'interagir avec les microtubules via des domaines spécifiques de liaison et de favoriser l'assemblage et la stabilité des microtubules. La protéine Tau contrôle la stabilité des microtubules par sa phosphorylation.

Tau est une phosphoprotéine qui contient environ 80 sites potentiels de phosphorylations sur des sites sérines thréonines. En général, une hyperphosphorylation de la protéine Tau diminue son affinité pour les microtubules, ce qui peut entraîner leur déstabilisation et par conséquent, une désorganisation du cytosquelette. Cependant, il a été démontré que sous sa forme phosphorylée au niveau des sites n'étant pas compris dans les domaines de liaison aux microtubules, la protéine Tau favorise la stabilisation et l'assemblage des microtubules nécessaires à la croissance et au transport axonal. D'un autre côté, la phosphorylation de Tau situés dans les domaines de liaison à la tubuline compromet la liaison avec les microtubules et en provoque son détachement [71]. Ce détachement peut causer des anomalies dans le transport axonal et des dysfonctions dans la neurotransmission des signaux en plus de favoriser l'agrégation des microtubules [72]. Ces dysfonctions amènent la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires et sont caractéristiques de plusieurs maladies neurodégénératives [73-75]. Ces enchevêtrements

neurofibrillaires sont composés principalement d'agrégats intracellulaires de protéines Tau hyperphosphorylées insolubles. L'analyse de Tau insoluble est un outil puissant pour mesurer l'évolution des maladies reliées à la protéine Tau (Taupathies). Il existe deux principales procédures expérimentales pour étudier la formation d'agrégats causés par l'hyperphosphorylation de Tau [76]. La première est décrite par Greenberg et Davies et mesure la solubilité de Tau dans 1 % de sarkosyl [77]. La deuxième est décrite par Trojanowski et Lee et consiste à étudier la solubilité de Tau dans un tampon RIPA suite à son extraction avec 70 % d'acide formique [78]. Prendre une méthode ou l'autre n'est pas crucial lors de l'analyse de souris modèle de Taupathies déjà bien caractérisée. Le choix de la méthode devient crucial lorsque nous étudions un nouveau modèle animal de Tau transgénique ou lors d'analyse de protéines Tau d'un animal qui n'est pas porteur d'anomalie génique pour Tau. La raison est, que plusieurs autres protéines que Tau peuvent être inclus dans les agrégats insolubles (comme des neurofilaments ou des protéines MAP2) et peuvent avoir des interactions avec les protéines Tau phosphorylées et non phosphorylées. La méthode au sarkosyl a retenu notre attention pour les raisons citées ci-haut et pour la possibilité d'analyser les agrégats par microscopie électronique si nécessaire.

La phosphorylation de Tau est exécutée par plusieurs kinases (Figure 1.9). Ces kinases sont subdivisées en deux groupes. Le premier groupe est dirigé contre les prolines et comprend Cdk5, la glycogène synthase kinase-3 (GSK3), la caséine kinase 1, p38, MAPkinase ainsi que JNK. Le deuxième groupe n'est pas dirigé contre les prolines et comprend PKA, la protéine kinase C (PKC) et la calmoduline kinase II (CAMKII). PKA, Cdk5 et GSK3 sont parmi les candidats les plus susceptibles de phosphoryler Tau et sont également des acteurs moléculaires principaux dans la signalisation des récepteurs dopaminergiques (Figure 1.9) [79, 80].

D1 à leur surface. À la lumière de ces résultats, nous avons voulu observer le rôle tenu par l'activité des récepteurs dopaminergiques dans l'hyperphosphorylation de la protéine Tau dans différents milieux et conditions dopaminergiques.

1.4.2 Est-ce que la stimulation des récepteurs dopaminergiques altère la phosphorylation de Tau de façon continue et est-ce que cette hyperphosphorylation entraîne la formation d'agrégats?

Puisque la voie nigro-striée est riche en dopamine et le striatum est l'endroit où la majorité de la dopamine est projetée, ce dernier est particulièrement intéressant pour étudier les effets modulateurs de la dopamine sur la protéine Tau. Nous avons donc utilisé des tranches de cerveaux de rats contenant le striatum que nous avons traitées avec un agoniste des récepteurs à la dopamine D1.

Premièrement, nous nous sommes interrogés sur l'hyperphosphorylation de Tau, à savoir si elle était permanente ou transitoire, puisqu'une étude récente a démontré que la réorganisation structurale des neurones causée par la stimulation dopaminergique persisterait à long terme [83] alors que la phosphorylation de Tau était transitoire dans les tranches des striatum de rats [84]. Donc, dans notre première expérience, nous avons vérifié les quantités de Tau phosphorylées en fonction du temps lors de la stimulation continue des récepteurs dopaminergiques.

Ensuite, pour mieux comprendre la nature physique de Tau lorsque la protéine est hyperphosphorylée, nous avons regardé si cette hyperphosphorylation entraînait la formation d'agrégats. Des études ont associé l'augmentation de la phosphorylation de Tau à sa solubilité dans le sarkosyl sur des souris porteuses de la maladie d'Alzheimer. Ils ont démontré dans ces études que Tau insoluble dans le sarkosyl (sous forme d'agrégats) est augmenté en fonction de la phosphorylation de Tau. En fait, ses souris transgéniques sont porteuses d'une taupathie et plus elles sont âgées, plus la protéine Tau est phosphorylée [85, 86]. Ces expérimentations nous amènent à nous demander si l'hyperphosphorylation de Tau en lien avec la dopamine peut aussi amener à la formation d'agrégats. Cette association entre la dopamine et les changements dans les

propriétés physico-chimiques de la protéine Tau n'a jamais encore été démontrée et permettrait de mieux comprendre l'effet du système dopaminergique sur les constituants du cytosquelette.

1.4.3 Quel est le rôle de l'activité des récepteurs glutamatergiques dans la phosphorylation de Tau induite par la stimulation dopaminergique?

La stimulation des récepteurs dopaminergiques sur des cellules SK-N-MC amène une augmentation de la phosphorylation de Tau. Cette phosphorylation semble être causée par des mécanismes calcium-dépendant médiés par PKA [84]. Des études *in vivo* ont démontré que PKA interagit avec des récepteurs glutamatergiques impliqués dans l'entrée de calcium intracellulaire [87, 88]. Dans notre étude, nous avons voulu chercher si les récepteurs glutamatergiques étaient impliqués dans l'hyperphosphorylation de Tau induite par la dopamine étant donné leurs interactions avec des éléments dans la signalisation dopaminergique et de l'entrée de calcium intracellulaire.

1.4.4 Comment les différents niveaux dopaminergiques *in vivo* affectent la phosphorylation de Tau?

Dans cette expérience, nous avons voulu reproduire une partie de nos études sur les effets de la transmission dopaminergique dans un modèle *in vivo* et donc un modèle plus physiologique. Étant donné que les tranches coronales de striatum de rat sont coupées de l'innervation dopaminergique, elles sont considérées « dénervées » de cellules dopaminergiques, notre étude s'est basée sur un modèle animal traité avec la neurotoxine MPTP. Cette toxine, suite à son administration systémique, s'attaque sélectivement aux neurones dopaminergiques, principalement de la voie nigro-striée, et permet de réduire considérablement les niveaux de dopamine. Ainsi, il est possible de créer un milieu similaire à la dénervation dopaminergique qui était retrouvé *in vitro* dans les tranches de striatum. La perte de neurones dopaminergiques, suite à l'application systémique de MPTP, a été démontrée chez plusieurs espèces animales, dont les singes, les souris, les chiens et les chats [89]; [90]; [91]. Nous avons ensuite stimulé les neurones du striatum à l'aide du précurseur de la synthèse de dopamine, la lévodopa.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le chapitre qui suit est divisé en deux sections. Dans la première section, je présente les traitements et les analyses faits sur des tranches de cerveaux de rats dans notre laboratoire afin de répondre à la question *ex vivo* de notre problématique. La deuxième, quant à elle, comporte les traitements et les analyses faites sur des souris afin de répondre à la partie *in vivo* de notre problématique. Toutes les procédures qui suivent ont été approuvées par le Conseil de bons soins aux animaux de l'UQTR et sont en accord avec les protocoles du Conseil canadien de protection des animaux.

2.1 Partie *ex vivo*

2.1.1 Animaux

Dans le cadre de cette étude, 36 rats Sprague-Dawley, mâles, âgés entre 6 et 7 semaines, ont été achetés de Charles River laboratoires (Montréal, QC, Canada). Les rats étaient logés une semaine avant les traitements dans des cages à l'intérieur de chambres à température contrôlée et ils ont eu un libre accès à l'eau et à la nourriture.

2.1.2 Préparation des coupes de tissus

Les rats sont initialement anesthésiés par inhalation d'isoflurane (Baxter Corp., Toronto, ON, Canada) puis guillotisés dans le but d'extraire leurs cerveaux de telle sorte que ces derniers ne subissent pas de nécrose liée à la mort de l'animal. Le cerveau est rapidement retiré et placé dans un tampon froid pour coupe de liquide céphalo-rachidien artificiel (LCR : NaCl 126 mM, KCl 3.5 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, MgCl₂ 2.3 mM, CaCl₂ 1 mM, NaHCO₃ 25 mM, glucose 11 mM et saturée avec 95 % O₂/5 % CO₂ à un pH de 7.4). Les cerveaux sont ensuite coupés en tranche contenant le striatum de 350 µm

d'épaisseur en utilisant le vibratome (Technical products international Inc., St. Louis, MO, É.-U.). Les coupes, par la suite, sont transférées dans du liquide céphalo-rachidien artificiel (LCR : NaCl 126 mM, KCl 3,5 mM, NaH_2PO_4 1.2 mM, MgCl_2 1.3 mM, CaCl_2 2 mM, NaHCO_3 25 mM, glucose 11 mM et saturées avec 95 % O_2 /5 % CO_2) dans lequel elles sont pré-incubées à 32 °C pendant 30 min avant les traitements pharmacologiques. Il faut noter que le second tampon LCR contient une concentration plus physiologique en magnésium et en calcium que le premier. Le premier tampon LCR va ainsi bloquer le canal NMDA, et de pair avec une concentration diminuée en calcium, éviter l'apparition d'excitotoxicité propre à ce récepteur. De plus, les coupes sont faites à 4 °C aussi pour diminuer l'activité intrinsèque des neurones et éviter l'apparition d'excitotoxicité NMDA. Lors des traitements, le second tampon est utilisé et la température des coupes ramenée à 32 °C.

2.1.3 Traitements pharmacologiques

Selon la situation, voici les principaux agents pharmacologiques utilisés. Lorsque deux traitements sont faits sur les mêmes coupes, le traitement au SKF38393, un agoniste des récepteurs D1, est toujours à la suite du premier traitement. Notons que nos solutions sont dissoutes dans une solution saline contenant de l'acide ascorbique 0.01 % possédant des propriétés anti-oxydantes.

1. NBQX : Les coupes de cerveaux contenant le striatum sont traitées avec 10 μM de cet antagoniste des récepteurs AMPA (Tocris Bioscience, Ellisville, MO, É.-U.) pendant 30 min avant le traitement au SKF38393 et continué jusqu'à la fin du traitement au SKF38393.
2. AP5 : Les coupes de cerveaux contenant le striatum sont traitées avec 50 μM de cet antagoniste des récepteurs NMDA (Tocris Bioscience, Ellisville, MO, É.-U.) pendant 30 min avant le traitement au SKF38393.
3. NVP-AAM077 : Les coupes de cerveaux contenant le striatum sont traitées avec 50 μM de cet antagoniste des récepteurs NMDA sélectif de la sous-unité

NR2A, un présent du Dr Yves Auberson (Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland), pendant 60 min avant le traitement au SKF38393.

4. RO25-6981 : Les coupes de cerveaux contenant le striatum sont traitées avec 1 μ M de cet antagoniste des récepteurs NMDA sélectifs de la sous-unité NR2B (Tocris Bioscience, Ellisville, MO, É.-U.) pendant 60 min avant le traitement au SKF38393.
5. SKF38393 : Les coupes de cerveaux contenant le striatum sont traitées avec 10 μ M de SKF38393 (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) pendant 30 min ou 60 min.

Après les traitements pharmacologiques, les coupes sont lavées plusieurs fois avec du LCR artificiel constamment saturé avec 95 % O₂/5 % CO₂. Le striatum est alors disséqué du reste du cerveau et les coupes de striatum sont homogénéisées dans un tampon RIPA froid servant à la lyse cellulaire (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1 %, sodium deoxycholate 0.25 % et EDTA 1 mM supplémenté à un mélange d'inhibiteurs de phosphatases et de protéases comme leupeptin 10 μ M, phenylmethylsulfonyl fluoride 1 μ g/ml et N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone 1 μ g/ml).

2.1.4 Fractionnement au sarkosyl

Les coupes de striatum traitées au SKF38393 ou avec de l'acide ascorbique 0.01 % pour contrôle sont homogénéisées dans un tampon RIPA froid comme décrit ci-haut. L'homogénat est alors centrifugé à 20 000 \times g pendant 20 min à 4 °C et le surnageant obtenu est utilisé comme fraction brute de Tau (homogénats non fractionnés). Ensuite, la fraction brute de Tau est chauffée à 100 °C pendant 5 min, puis centrifugée à 20 000 \times g pendant 20 min à température ambiante. Le surnageant obtenu est alors utilisé en tant que fraction soluble de Tau stable à la chaleur. Ensuite, la fraction soluble de Tau stable à la chaleur est traitée avec du sarkosyl (concentration finale de 1 %) pendant 30 min, à température ambiante, et ultra centrifugée à 100 000 \times g pendant 1 h à 4 °C. Le précipité obtenu est utilisé pour la fraction de Tau insoluble au sarkosyl. Les échantillons de

fractions solubles et insolubles au sarkosyl sont par la suite solubilisés dans un tampon Tris (SDS 2.3 %, 2-mercaptoethanol 5 %, glycerol 10 %, bromophenol bleu 0.01 % et un mélange d'inhibiteurs de phosphatases et de protéases). La concentration de protéines est déterminée à l'aide du réactif de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, É.-U.) et du spectrophotomètre. Par la suite, la quantité de Tau ainsi que sa phosphorylation sont analysées par la technique de Western blot.

2.1.5 Western blot

La concentration des protéines extraites du striatum est mesurée à l'aide de la méthode Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, É.-U.). L'électrophorèse des protéines est faite sur un gel polyacrylamide 10 % (SDS-PAGE; Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis) en déposant 40 µg de protéines par puits de migrations sauf pour la sous-unité NR2B pour laquelle nous avons utilisé 80 µg de protéines. Les protéines séparées selon leur poids moléculaire sont par la suite transférées sur une membrane de nitrocellulose. Par la suite, pour éviter un marquage non spécifique des anticorps, le blocage de la membrane est fait en l'incubant dans un tampon phosphate salin de pH 7,4 composé de BSA 5 % (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, É.-U.) et de TBS-Tween durant 1 h à température ambiante. Suite au blocage, les membranes sont incubées dans l'anticorps primaire toute la nuit à 4 °C. Ultérieurement à cette période d'incubation, les membranes subissent trois lavages consécutifs dans une solution de TBS-Tween 0.1 % pour enlever l'excédent d'anticorps primaire libres. Les membranes sont ensuite incubées pendant 2 h à température ambiante dans l'anticorps secondaire approprié couplé à horseradish peroxidase (1 :5000, Thermo scientific). Les deux anticorps, primaire et secondaire, sont dilués dans du BSA 1 % et du TBS-Tween avant leur emploi. La mise en évidence des protéines est fait par chimioluminescence (Epi-chemi CDD camera, UVP) avec le réactif Super Signal West Femto (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, É.-U.) qui possède une activité peroxydase. Les bandes immunoréactives sont dévoilées et quantitativement analysées par le logiciel Vision Works Image Acquisition et Analysis Softwar (UVP Bioimaging, Upland, CA, É.-U.). L'analyse densitométrique de ces bandes est exprimée en densité optique relative.

2.1.6 Anticorps

Dépendamment de la situation, voici la liste des principaux anticorps utilisés :

A. Anticorps primaire

- Rabbit polyclonal antibody against GAPDH (1:1000; Abcam, Cambridge, MA, É.-U.),
- Mouse polyclonal antibody against Tau-5 (1: 500; AbCam, Cambridge, MA, É.-U.),
- Rabbit polyclonal antibody against p-Tau 199-202 (1:1000, AbCam, Cambridge, MA, É.-U.),
- Rabbit polyclonal antibody against p-Tau 214 (1:1000, AbCam, Cambridge, MA, É.-U.),
- Rabbit polyclonal antibody against tyrosine hydroxylase (1:1000; AbCam, Cambridge, MA, É.-U.).

B. Anticorps secondaire

- Anti-rabbit (1:5000, Thermo scientific, Ottawa, ON, Canada),
- Anti-mouse (1:5000, Thermo scientific, Ottawa, ON, Canada).

2.2 Partie *in vivo*

2.2.1 Animaux

Dans le cadre de cette étude, 25 souris mâles C57bl/6j âgés entre 10 et 12 semaines ont été achetées de Charles River Laboratories (St-Constant, QC, Canada). Les souris pesaient en moyenne 28 g et étaient logées dans des cages séparément à l'intérieur de chambre à température contrôlée. À leurs arrivées, une période d'acclimatation de 5 jours leur fut accordée avant le début de tests. Elles avaient un libre accès à l'eau et à la nourriture. Par la suite, nous avons formé 5 groupes de 5 souris pour les traitements pharmacologiques.

2.2.2 Traitements

- ***MPTP***

Pour induire une déplétion des neurones dopaminergiques, trois groupes de cinq souris ont subi un traitement chronique de MPTP. Ce traitement consiste à administrer une injection sous-cutanée (*s.c*) de 30 mg/kg de MPTP par jour pendant 5 jours consécutifs. Le MPTP est dilué préalablement avec de la saline 0.9 %. Les 10 souris restantes ont reçu une quantité équivalente de saline (Tableau 2.1).

- ***L-DOPA***

Un temps de repos de 10 jours est accordé aux souris après la dernière injection de MPTP. Par la suite, la L-DOPA 25 mg/kg et 12,5 mg/kg de benzerazide est injectée en 5 doses IP, 1 fois tous les 12 h. Les groupes de souris contrôles ont reçu une quantité équivalente de saline.

Tableau 2.1

Résumé des principaux traitements pharmacologiques pour les groupes de souris

Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4	Groupe 5
Saline	Saline	MPTP	MPTP	MPTP
Saline	L-dopa	Saline	L-dopa 1 h	L-dopa 24 h

- ***Traitement de support***

Le MPTP induit une phase d'intoxication chez l'animal sous forme d'hypothermie, d'altération de la tension artérielle, de tremblement et d'une diminution de l'appétit qui peut s'avérer mortelle [92, 93]. Ainsi, un traitement de support est donné aux souris afin d'améliorer leurs survies. Voici la liste des principaux traitements de supports durant les jours d'injection de MPTP.

- Injection de dextrose-saline 1 ml *s.c*. 2 fois par jour.
- Lampe chauffante (24 degrés) pendant 5 h.

- Préparation de nourriture molle.
- Lors d'une perte de poids importante, un gavage de nourriture molle ou de Jello ainsi qu'une injection de dextrose-saline 1 ml *s.c.* supplémentaire sont donnés.

2.2.3 Préparation des tissus

Les souris sont sacrifiées 1 h ($n = 20$) ou 24 h ($n = 5$) après leur dernière dose de traitements de saline ou de L-DOPA. Les animaux sont euthanasiés dans des cages saturées en CO₂ puis sont guillotinés afin de retirer leurs striatum. Le striatum extrait est déposé rapidement sur de la glace sèche dans un tube de type eppendorf. Les striatum sont conservés dans un congélateur à -80 °C jusqu'à l'extraction des protéines. L'extraction des protéines, leurs dosages, leurs préparations et leurs analyses par le Western blot sont semblables à celle des rats (voir section 2.1).

2.3 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été faites à l'aide du logiciel Graph Pad Prism (version 5.0, Graph Pad Software, San Diego, CA, É.-U.). Les données ont été évaluées par le test d'analyse de la variance (one-way ANOVA) suivie du post test de Newman-Keuls. Les résultats présentés représentent la moyenne des animaux pour chaque traitement \pm S.E.M. et le seuil de signification statistique a été fixé à $p < 0.05$.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 SKF38393 ne modifie pas la quantité de Tau total au niveau du striatum

Nous avons préalablement démontré dans notre laboratoire que la protéine Tau est phosphorylée lorsque les récepteurs dopaminergiques sont stimulés sur des cellules de neuroblastomes humains SK-N-MC [46]. Dans cette expérience *ex vivo*, nous avons traité des coupes de striatum de rats au SKF38393. Nous avons établi une courbe dose réponse et avons trouvé que 10 μM de SKF38393 est la concentration minimale pour entraîner une phosphorylation significative de Tau. Notons que SKF38393, à dose élevée (100 μM), pourrait être cytotoxique et affecter la viabilité cellulaire [94, 95]. En premier lieu, nous avons voulu vérifier par Western blot si la stimulation des récepteurs dopaminergiques modifie la quantité de protéines Tau. Nos résultats démontrent qu'à une dose de 10 μM , cet agoniste D1 n'a pas d'effet significatif sur la quantité de Tau total par rapport aux coupes de striatum de rats contrôles (Figure 3.1). Notons aussi que l'effet de la dopamine a été vérifié à différent temps (0.5 h et 1 h) afin de rechercher si une augmentation de la quantité de Tau total peut être transitoire, ce qui n'est pas le cas dans cette expérience. Nous avons rapporté les résultats sur les niveaux de GAPDH quantifiés comme contrôle de chargement des protéines.

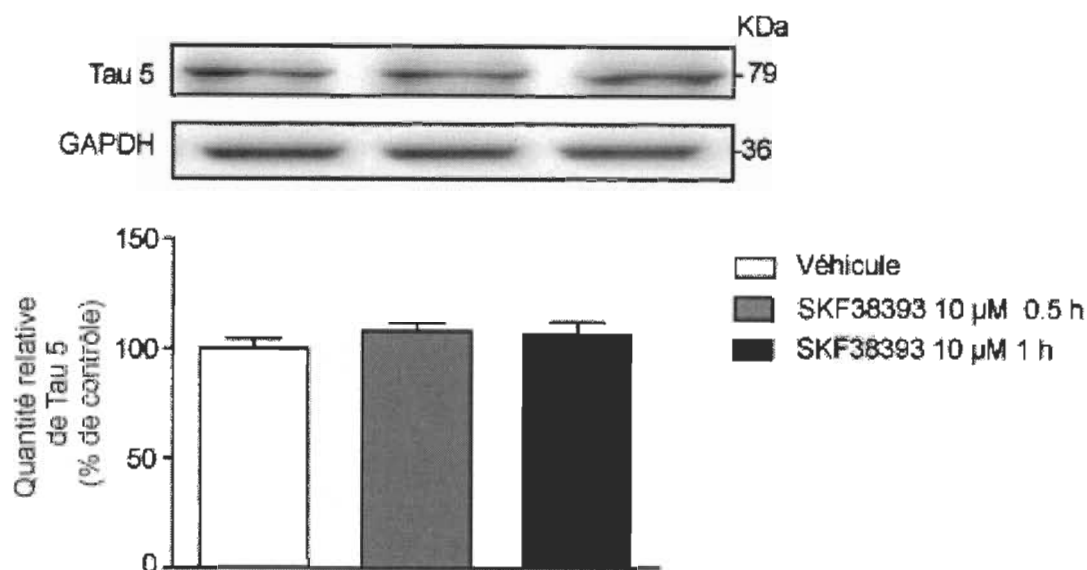


Figure 3.1 SKF-Tau 5.

Effet de SKF38393 sur les quantités de Tau phosphorylés et de Tau non phosphorylés évaluées par l'utilisation de l'anticorps Tau 5 au niveau du striatum de rats contrôles (véhicule) ou de rats traités avec SKF38393 après 0.5 h et 1 h. Les valeurs obtenues sont exprimées relativement à GAPDH et représentent la moyenne relative de la densité optique en pourcentage de quantité obtenue chez le rat contrôle \pm SEM, $n = 4$ rats/groupe. Les statistiques réalisées ne sont pas significatives dans la description de ses résultats.

3.2 Tau sérines 199-202 et sérine 214 sont phosphorylés lorsque les tissus sont traités avec SKF38393

Nous avons voulu vérifier la phosphorylation de la protéine Tau au niveau des sérines 199-202 ou de la sérine 214 dans nos tissus comme celles obtenues avec les cellules SK-N-MC [46]. Nous avons donc traité les coupes de striatum avec 10 µM de SKF38393 à différent temps (0.5 h et 1 h) et avons évalué la phosphorylation de Tau au niveau des sérines 199-202 et 214 par Western blot. Nous avons observé une augmentation de la phosphorylation (p-Tau) de la sérine 214 à 0.5 h, mais celle-ci est transitoire et retourne à peu près aux mêmes valeurs que les rats contrôles 1 h après le traitement au SKF38393 (Figure 3.2). D'autre part, on note une augmentation soutenue de la phosphorylation de Tau au niveau des sérines 199-202 à 0.5 h et celle-ci est encore plus élevée après 1 h de traitements au SKF38393.

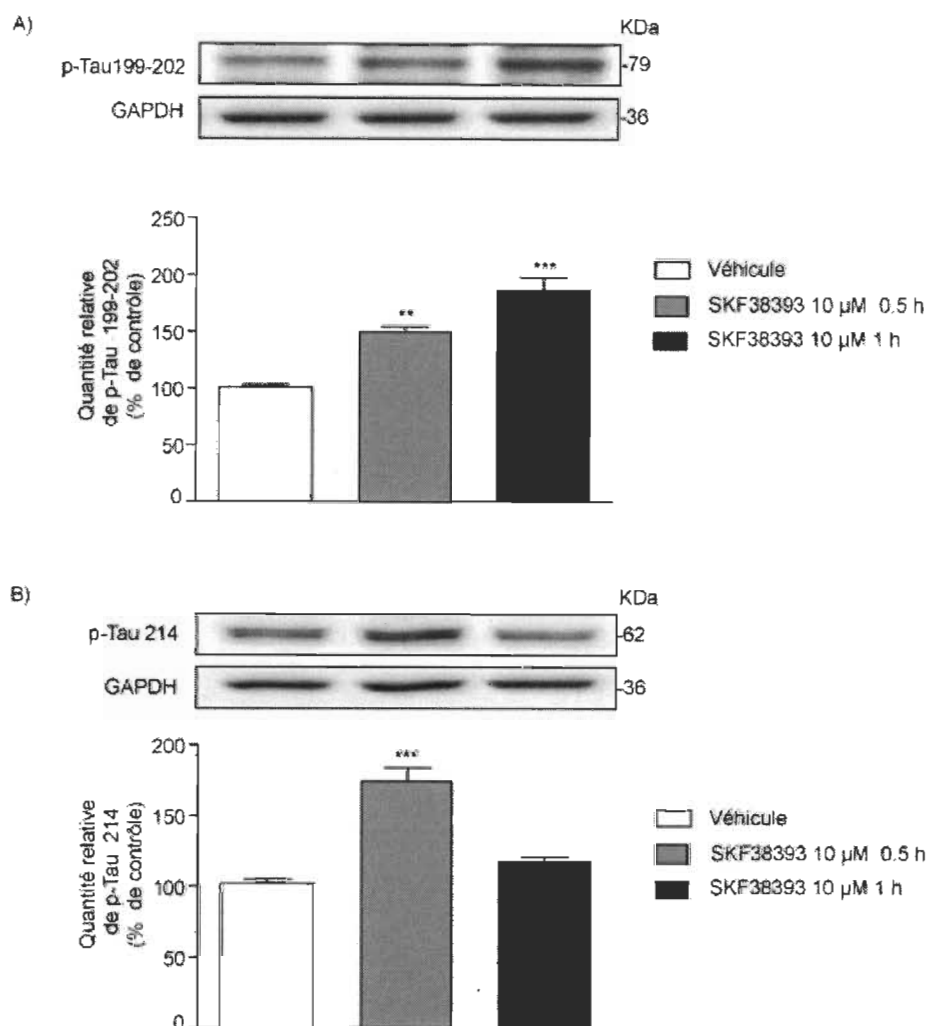


Figure 3.2 SKF-p-Tau.

Effet de SKF38393 sur la quantité de la protéine Tau phosphorylée aux serines 199 et 202 ou à la serine 214 dans le striatum de rats. (A) Quantité de p-Tau sérines 199-202 chez les rats contrôles (véhicule), rats traités avec SKF38393 après 0.5 h et 1 h. (B) Quantité de p-Tau 214 chez les rats contrôles (véhicule), rats traités avec SKF38393 après 0.5 h et 1 h. Les valeurs obtenues sont exprimées relativement à la quantité de GAPDH et représentent la moyenne relative de la densité optique en pourcentage de quantité obtenue chez le rat contrôle \pm SEM $n = 4$ rats/groupe. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.3 SKF38393 augmente la quantité de protéine Tau ainsi que sa phosphorylation au niveau sérines 199-202 dans sa fraction insoluble au sarkosyl

Il a été démontré que la quantité de Tau total soluble et insoluble dans le sarkosyl a une relation étroite avec la phosphorylation de Tau dans l'hippocampe [85].

L'augmentation de la fraction insoluble de Tau est associée à une perte de neurones [96]. Dans nos expériences précédentes (Figures 3.1 et 3.2), l'agoniste dopaminergique D1 ne change pas la quantité de Tau total, mais en augmente sa phosphorylation. Nous avons donc vérifié par Western blot si la phosphorylation de Tau est modifiée dans sa fraction soluble et insoluble au sarkosyl suite à un traitement au SKF38393 dans le striatum de rats. Nous avons également regardé si SKF38393 modifie la quantité de Tau total dans sa fraction soluble et insoluble au sarkosyl. À la figure 3.3A, la quantité de Tau 5 diminue dans sa fraction soluble et augmente dans sa fraction insoluble au sarkosyl suite à un traitement de 1 h de 10 μ M de SKF38393. À la figure 3.3B, la quantité de p-Tau 199-202 diminue dans la fraction soluble et augmente dans la fraction insoluble suite à un traitement de 1 h de 10 μ M de SKF38393. Il existerait donc une corrélation entre l'augmentation de la phosphorylation de Tau et la formation d'agrégats dans le sarkosyl.

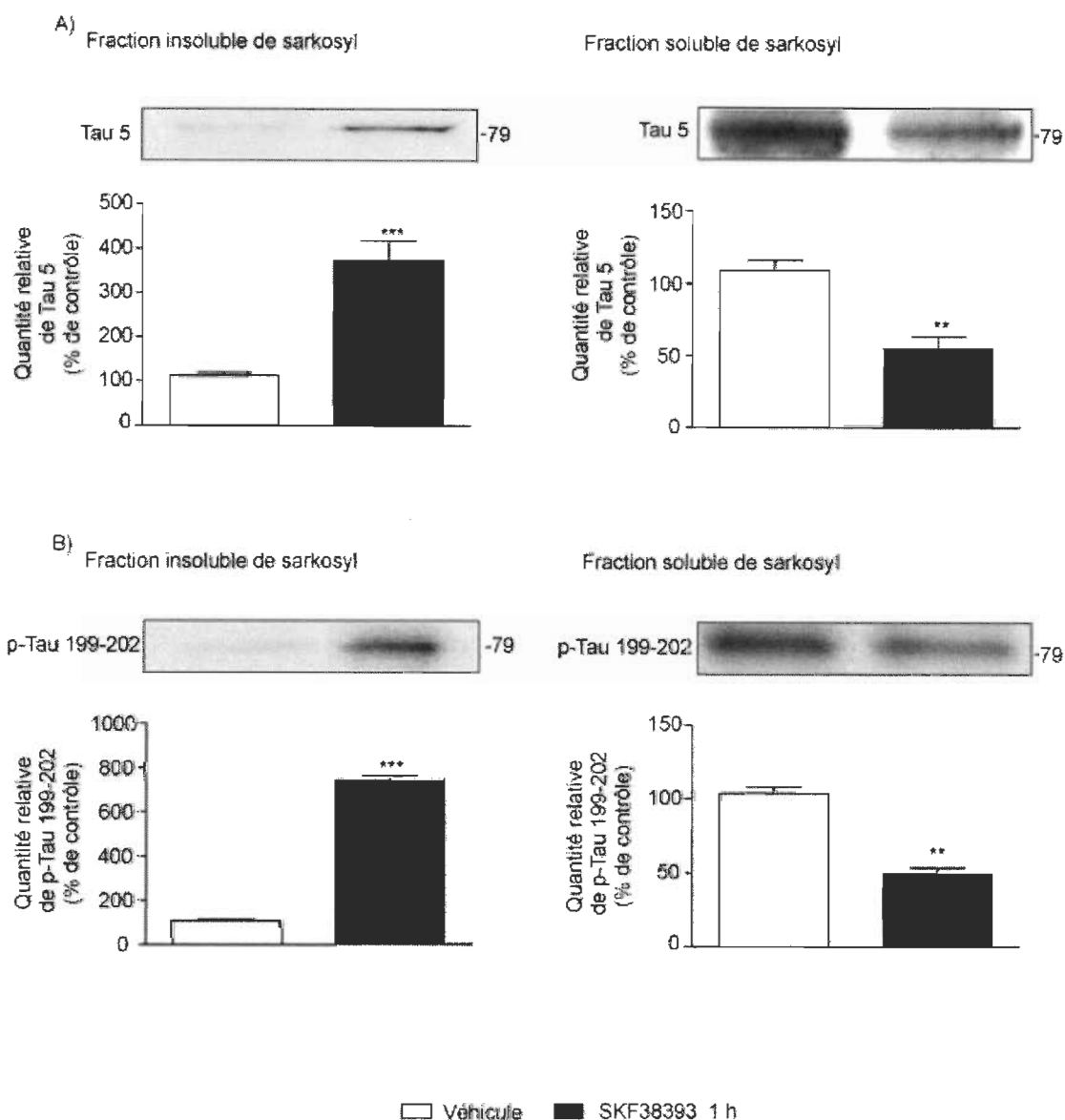


Figure 3.3 SKF-Sarkosyl.

L'effet de SKF38393 sur la solubilité de la protéine Tau au niveau du striatum de rats. A) La quantité de Tau 5 (Tau total) dans sa fraction soluble et insoluble de sarkosyl suite à un traitement au SKF38393 ou à l'acide ascorbique 0.01 % (véhicule). B) La quantité de p-tau 199-202 dans sa fraction soluble et insoluble de sarkosyl suite à un traitement au SKF38393 ou à l'acide ascorbique 0.01 % (véhicule). Les valeurs obtenues sont exprimées relativement à la quantité de Tau 5 (Tau total) et de GAPDH et représentent la moyenne relative de la densité optique en pourcentage de quantité obtenue chez le rat contrôle \pm SEM $n = 4$ rats/groupe. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.4 SKF38393 phosphoryle Tau au niveau des sérines 199-202 en utilisant la voie NMDA et plus spécifiquement sa sous-unité NR2A

Dans cette étude, nous avons voulu explorer la voie de signalisation de la phosphorylation de Tau lorsque les tissus de striatum sont traités avec 10 μ M de SKF38393. Nous avons donc incubé des coupes de striatum frais de rats avec des antagonistes de récepteurs AMPA (NBQX 10 μ M) et NMDA (AP5 50 μ M) avant un traitement de 1 h au SKF38393. Nous avons par la suite quantifié p-Tau 199-202 par Western blot. Nous voyons, à la figure 3.4A, que Tau est phosphorylé lorsque les récepteurs AMPA sont bloqués, mais les quantités sont semblables aux valeurs contrôles lorsque les récepteurs NMDA sont bloqués. Nous concluons donc que l'hyperphosphorylation de Tau 199-202 passe par l'activation des récepteurs NMDA et non suite à l'activation des récepteurs AMPA. À la suite des résultats obtenus, nous avons voulu explorer quelles sous-unités des récepteurs NMDA sont impliquées dans l'hyperphosphorylation de Tau. Nous avons donc incubé des coupes de striatum frais de rats avec 50 nM de NVP-AAM077 et 1 μ M de R025-6981, deux composés qui bloquent préférentiellement la sous-unité NR2A et NR2B, respectivement, des récepteurs NMDA [97, 98]. À la figure 3.4B, Tau 199-202 est phosphorylé lorsque la sous-unité NR2B est bloquée, mais elle a des valeurs semblables aux valeurs contrôles lorsque la sous-unité NR2A est bloquée. Les résultats obtenus démontrent que la sous-unité NR2A est responsable de l'hyperphosphorylation de Tau 199-202.

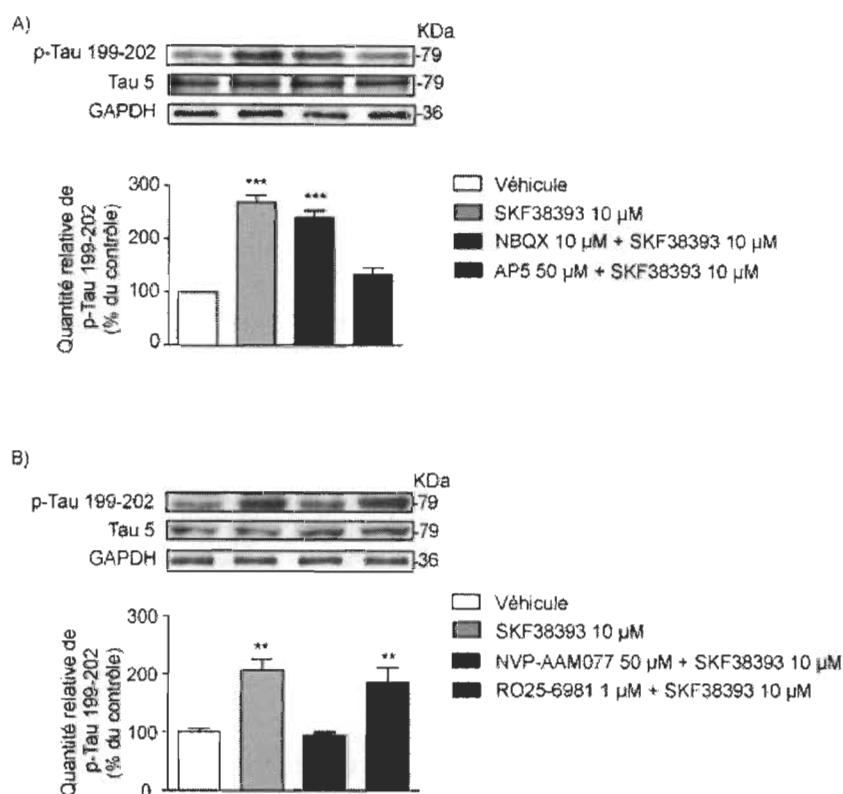


Figure 3.4 SKF-NMDA.

Rôle des récepteurs au glutamate dans la phosphorylation de Tau au niveau des sérines 199-202 lorsque les tissus de striatum de rats sont traités au SKF38393. Quantité de p-Tau sérines 199-202 chez les rats contrôles (véhicule), traités avec SKF38393 seul ou en combinaison avec un antagoniste des récepteurs AMPA (NBQX 10 μ M) ou un antagoniste des récepteurs NMDA (50 μ M). (B) Quantité de p-Tau 199-202 chez les rats contrôles (véhicule), traités avec SKF38393 seul ou en combinaison avec un antagoniste des récepteurs NR2A (NVP AAM077, 50 μ M), ou un antagoniste des récepteurs NR2B (RO 25-6981, 1 μ M). Les valeurs obtenues sont exprimées relativement à la quantité de Tau 5 (Tau total) et de GAPDH et représentent la moyenne relative de la densité optique en pourcentage de quantité obtenue chez le rat contrôle \pm SEM $n = 4$ rats/groupe. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.5 Le traitement au MPTP induit une déplétion des neurones dopaminergiques dans la voie nigrostriée chez les souris

Afin de vérifier la modulation des récepteurs dopaminergiques sur la quantité de protéines Tau phosphorylées dans un modèle animal *in vivo*, notre étude s'est basée sur le

modèle de la souris MPTP ayant une déplétion en dopamine. Nous avons traité nos souris avec 30 mg/kg de MPTP i.p. pendant 5 jours selon un protocole bien établi [93]. L'étendue de la déplétion dopaminergique au striatum des souris est estimée par un marqueur connu des neurones dopaminergiques, la tyrosine hydroxylase (TH) [99]. Nous remarquons une déplétion d'environ 50 % chez les souris MPTP et les différents traitements L-DOPA n'altèrent pas les niveaux de la protéine TH au striatum.

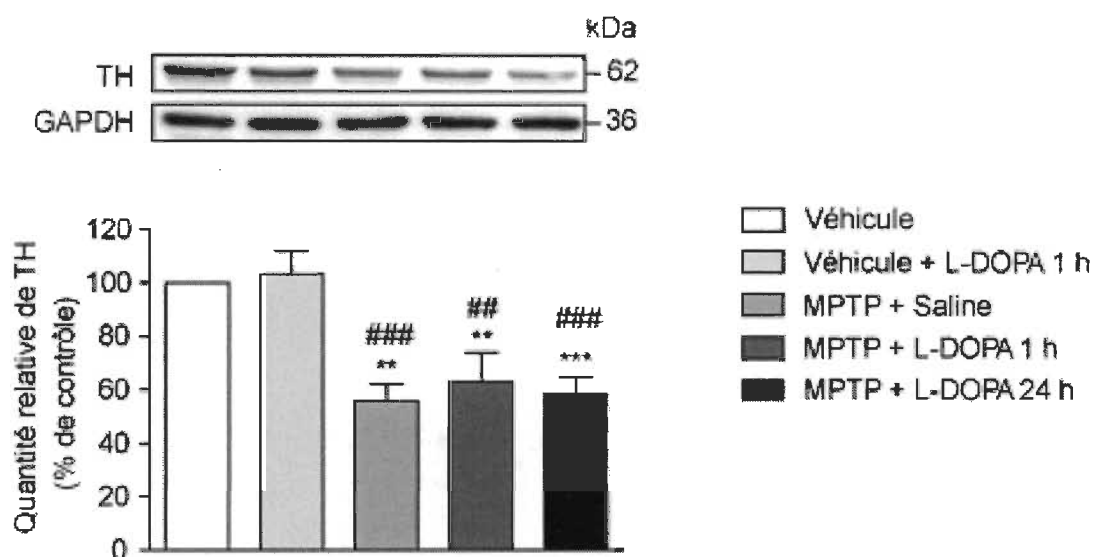


Figure 3.5 MPTP-TH.

L'effet des traitements au MPTP et à la L-DOPA sur la quantité de TH au niveau du striatum de souris. Les valeurs sont obtenues à partir de souris contrôles (véhicule), traitées à la L-DOPA, lésées au MPTP, lésées au MPTP puis traitées avec de la L-DOPA et sacrifiées 1 h ou 24 h post traitement. Les valeurs sont exprimées relativement à la quantité de GAPDH et représentent la moyenne relative de la densité optique en pourcentage de quantité obtenue chez les souris contrôles \pm SEM. Les valeurs sont obtenues en triplicatas d'animaux et d'expériences; $n = 4$ souris/groupes. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. contrôles; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. contrôles traitées à la L-DOPA.

3.6 L'effet des traitements au MPTP et de la L-DOPA ne modifie pas la quantité de Tau total

Comme dans nos coupes de striatum traitées au SK38393 (Figure 3.1), nous avons vérifié si la quantité de Tau total dans le striatum était modifiée lors de nos différents

traitements dans cette expérience *in vivo*. Nous avons analysé par Western blot 40 μ g de protéines provenant du striatum de souris contrôles, traitées à la L-DOPA, lésées au MPTP, lésées au MPTP puis traitées avec de la L-DOPA et sacrifiées 1 h ou 24 h post traitement (Figure 3.6). Nos résultats démontrent que nos traitements n'ont pas d'effet significatif sur la quantité de Tau total. Nous avons rapporté les résultats obtenus de Tau 5 sur GAPDH comme contrôle de chargement des protéines.

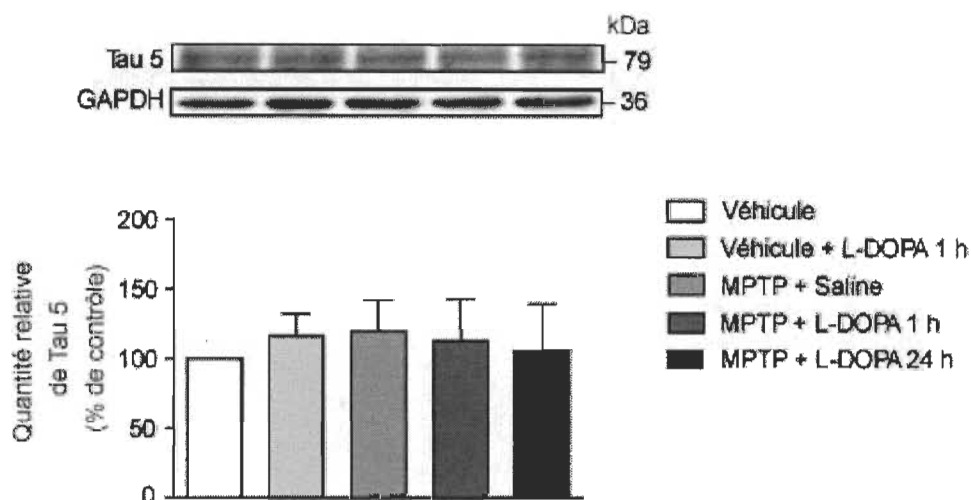


Figure 3.6 MPTP-Tau 5.

L'effet des traitements MPTP et de L-DOPA sur la quantité de Tau 5 (Tau total) au niveau du striatum de souris. Les valeurs sont obtenues à partir de souris contrôles (véhicule), traitées à la L-DOPA, lésées au MPTP, lésées au MPTP puis traitées avec de la L-DOPA et sacrifiées 1 h ou 24 h post traitement. Les valeurs sont exprimées relativement à la quantité de GAPDH et représentent la moyenne relative de la densité optique en pourcentage de quantité obtenue chez les souris contrôles \pm SEM. Les valeurs sont obtenues en triplicatas d'animaux et d'expériences; n = 4 souris/groupes.

3.7 L'hyperstimulation des récepteurs D1 avec des traitements à la L-DOPA augmente les niveaux de p-Tau 199-202 et p-Tau 214 transitoirement

Afin de vérifier si nous avons une phosphorylation de Tau dans nos tissus de striatum suite à la stimulation des récepteurs dopaminergiques, nous avons recherché la phosphorylation de Tau au niveau des sérines 199-202 et de la sérine 214 identiquement

à nos expériences *ex vivo* (Figure 3.2). Nous avons analysé par Western blot 40 µg de protéines provenant du striatum de souris contrôles, traitées à la L-DOPA, lésées au MPTP, lésées au MPTP puis traitées avec de la L-DOPA et sacrifiées 1 h ou 24 h post traitement. Nous apercevons à la figure 3.7 que l'hyperstimulation des récepteurs D1 avec des traitements à la L-DOPA 1 h post traitement augmentent la phosphorylation de Tau au niveau (A) sérines 199-202 et (B) sérine 214 dans le striatum de souris MPTP. Cette phosphorylation semble être transitoire puisque qu'après 24 h, la quantité de p-Tau 199-202 et p-Tau 214 redeviennent comparables au groupe contrôle. Ses résultats confirment que la stimulation des récepteurs dopaminergiques dans le striatum de modèles de souris déplétées à 50 % en dopamine cause une phosphorylation de Tau comme obtenue chez le rat [84]. Cependant, nous avons trouvé que cette phosphorylation était transitoire.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Plusieurs études ont rapporté que la signalisation dopaminergique pouvait induire des changements au niveau de l'organisation structurale des neurones. En nous basant sur des expériences *ex vivo* dans notre laboratoire qui démontraient que la stimulation des récepteurs dopaminergiques sur des cellules SK-N-MC causait une phosphorylation de Tau, nous avons voulu explorer les différentes facettes de la stimulation des récepteurs dopaminergiques dans la modification de la protéine Tau. La discussion qui suit présente les principales observations de l'effet de différentes conditions dopaminergiques sur la phosphorylation de Tau sur des rongeurs dans des milieux *ex vivo* et *in vivo*.

4.1 Relation entre le MPTP et les protéines de structure

Le MPTP a été utilisé dans nos expériences pour induire une déplétion de dopamine dans le striatum afin de vérifier les effets de la dopamine sur les protéines de structure de ce dernier. Il est intéressant de noter que certaines études ont vérifié les effets du MPTP sur les protéines de structures des neurones de la substance noire. Le MPTP est une neurotoxine qui provoque les symptômes permanents de la maladie de Parkinson en détruisant les neurones dopaminergiques. Elle est utilisée pour créer des modèles animaux parkinsoniens surtout chez le singe alors que les rongeurs sont beaucoup moins sensibles à son effet. Les rats sont presque à l'abri des effets négatifs du MPTP. On pense que le niveau plus faible de la MAO B dans les capillaires du cerveau des rongeurs peut être responsable de ce fait[100]. Le MPTP lui-même n'est pas toxique, mais comme tout composé liposoluble, il peut traverser la barrière hémato-encéphalique. Une fois à l'intérieur du cerveau, le MPTP est métabolisé en une substance toxique le 1-méthyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) par l'enzyme MAO-B des cellules gliales. Le

MPP+ détruit essentiellement les neurones dopaminergiques de la substantia nigra. Le MPP+ interfère avec le complexe I de la chaîne respiratoire, un élément du métabolisme des mitochondries, ce qui conduit à la mort cellulaire et provoque l'accumulation de radicaux libres, des molécules toxiques qui contribuent ultérieurement à la destruction des cellules [101]. Le MPTP possède la capacité de détruire sélectivement les neurones dopaminergiques, apparemment, grâce à une grande affinité d'absorption par les terminaisons nerveuses dans le processus normalement utilisé pour la recapture de la dopamine une fois qu'elle a été libérée dans la fente synaptique. Le transporteur de la dopamine entraîne le MPP+ à l'intérieur de la cellule. Il en résulte un épuisement des neurones dopaminergiques avec de graves répercussions sur le contrôle des mouvements moteurs. Il est intéressant de noter que dans des études *in vitro* et *in vivo*, il a été démontré que la toxicité du MPTP est liée à une accumulation d'alpha-Synucléine sur les cellules dopaminergiques [102, 103]. Cette accumulation a été associée à la phosphorylation de Tau puisque l'alpha-Synucléine lie les microtubules et est localisée avec Tau dans les cellules et forme des complexes hétérodimériques [102, 104]. Il faut noter que le MPTP n'aura pas d'effets toxiques sur les neurones du striatum, car ses derniers n'expriment pas de transporteur de la dopamine. Notons aussi que d'autres sources de produits toxiques utilisés dans nos expériences ont la capacité d'influencer les niveaux de phosphorylations de Tau. Par exemple, l'anesthésie à l'isofluorane chez nos souris, ou au CO₂, chez nos rats, sont capables de modifier la phosphorylation de Tau [105]. Nous avons minimisé les effets de ces facteurs de confusions en rapportant nos résultats sur les niveaux de pourcentage de souris contrôles.

4.2 La phosphorylation de Tau induite par la dopamine sur les coupes de tissus de rats nécessite l'activation des récepteurs NMDA et plus spécifiquement la sous-unité NR2A

La démonstration de l'implication du calcium intracellulaire dans l'augmentation des niveaux de phosphorylation de la protéine Tau à la suite d'une activation des récepteurs dopaminergiques, lui suggère un rôle central dans la modification du cytosquelette cellulaire [84, 106]. En fait, ces études ont montré que l'inhibition de l'entrée de calcium intracellulaire pouvait prévenir l'hyperphosphorylation de tau lors

d'une stimulation dopaminergique. Étant donné que les récepteurs glutamatergiques sont une cible potentielle de PKA suite à une stimulation dopaminergique, ceci nous amène à investiguer le rôle de la dopamine dans cette augmentation de calcium intra cellulaire en lien avec la potentialisation de l'activité des récepteurs glutaminergiques.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la potentialisation de l'activité des récepteurs glutaminergiques par la dopamine. D'abord, à la suite de la stimulation des récepteurs D1, il y aurait une augmentation de l'expression de surface des récepteurs NMDA [107]. Ou encore la phosphorylation des sous-unités GluR1 des récepteurs AMPA pourrait également être modulée par PKA, un substrat de l'activation des récepteurs dopaminergiques [108]. De plus, il existerait une interaction directe protéine-protéine des récepteurs D1 et NMDA comme discuté dans l'introduction. Il avait été proposé qu'une augmentation de la transmission dopaminergique serait en mesure d'activer les récepteurs NMDA, menant ainsi à l'entrée massive de calcium dans la cellule [109-111]. Dans notre étude, à l'aide de moyens pharmacologiques, nous avons pu démontrer ces hypothèses en faisant un lien direct entre l'activation des récepteurs dopaminergiques, les récepteurs NMDA et l'augmentation des niveaux de phosphorylation de Tau sur les sérines 199-202. De plus, nous avons poussé plus loin nos expériences et avons trouvé que c'est la sous-unité NR2A des récepteurs NMDA qui serait responsable de cette hyperphosphorylation. Cette association directe entre l'activation des récepteurs dopaminergiques et l'activité de la sous-unité NR2A n'avait jamais encore été démontrée. Ceci est cohérent avec l'emplacement des sous-unités dans la cellule. La sous-unité NR2B est surtout localisée en extra synaptique alors que la sous-unité NR2A est principalement synaptique. Ceci fait des sous-unités NR2A des éléments plus proches physiquement des récepteurs dopaminergiques, ce qui faciliterait leurs interactions. La relation étroite entre les systèmes de neurotransmissions dopaminergiques et glutaminergiques pourrait donc être à la base de mécanisme moléculaire pouvant expliquer les phénomènes de réarrangement du cytosquelette des neurones.

4.3 Altération physico-chimique de la protéine Tau lorsqu'elle est hyperphosphorylée

Pour jouer un rôle dans l'organisation du cytosquelette, la protéine Tau nécessite un certain degré de phosphorylation. Cependant, quand elle devient hyperphosphorylée sur certains résidus, elle pourrait provoquer des modifications neurodégénératives et, à long terme, mener à la mort cellulaire [112]. Par exemple, dans la maladie d'Alzheimer, les neurones en dégénérescence ont des filaments intraneuronaux en paires appariés en hélices et constitués principalement de la protéine Tau. Ces protéines Tau sont modifiées; elles deviennent insolubles et leur migration dans le SDS-PAGE est ralentie en raison de leur haut taux de phosphorylation. Cependant, nous comprenons toujours mal la manière dont la phosphorylation de Tau sur certains sites peut mettre en péril la survie neuronale. On peut soupçonner que cela est en relation avec la distribution intraneuronale de la protéine. En fait, on sait que dans les neurones en bonne santé, la protéine Tau s'associe principalement aux microtubules des axones alors que dans un contexte pathologique, l'état d'hyperphosphorylation ferait détacher la protéine des microtubules en faveur d'une localisation dendritique et somatique. Des souris transgéniques développant des enchevêtrements neurofibrillaires ont été étudiées et il a été démontré qu'il y avait une augmentation de la fraction insoluble de Tau dans le sarkosyl lorsque Tau était hyperphosphorylée [113]. Nous nous sommes inspirés de ces expériences afin de voir si l'hyperphosphorylation de Tau dans nos tranches de striatum pouvait changer la nature physique de Tau. Nos expériences avec le sarkosyl nous a permis d'avancer que Tau, lorsqu'elle est hyperphosphorylée, était relocalisée dans le cytosol de la cellule à la place d'être au niveau de la membrane plasmique. Ceci est fondé sur le fait que nos procédés avec le sarkosyl isolent les protéines membranaires des protéines du cytosol. En plus d'être cytosolique, les niveaux de Tau hyperphosphorylés augmentent dans le sarkosyl insoluble. Nous ne pouvons conclure que cette hyperphosphorylation est pathogénique, mais il est certain que les propriétés physico-chimiques sont altérées et qu'il peut en découler une altération du fonctionnement de la protéine Tau. Une étude récente nous en apprend davantage à ce sujet [114]. Par des expériences de micromutagenèse, une anomalie de phosphorylation de Tau a été produite qui favorise sa localisation préférentielle au sein des épines

dendritiques. Celle-ci conduit à une altération du fonctionnement synaptique, elle-même associée à une expression diminuée de diverses protéines postsynaptiques. Nous concluons donc qu'une altération des propriétés physico-chimiques des protéines de structures peut modifier le cytosquelette de la cellule et ainsi avoir de graves répercussions sur le fonctionnement des neurones.

4.4 La dénervation est essentielle pour induire des changements du cytosquelette

Nos expériences ont établi qu'une augmentation des niveaux de DA dans un striatum dénervé est capable de provoquer des changements dans la protéine de structure Tau tant au niveau *in vitro* qu'*in vivo*. Cette dénervation préalable du striatum semble être une condition essentielle pour obtenir une hyperphosphorylation de Tau. Des études ont démontré que lorsque les niveaux DAergique sont faibles, la sensibilité des récepteurs à la dopamine augmentait. Ceci est expliqué par plusieurs mécanismes, mais le principal étant le blocage de l'internalisation des récepteurs DAergiques sur les neurones restants. Ce processus d'internalisation des récepteurs DAergique est encore mal compris et semble probablement dû aux interactions des récepteurs DAergique avec les récepteurs NMDA. Cette augmentation de la sensibilité DAergique amène probablement des voies de signalisation alternative inconnue dans le rôle habituel de la dopamine discuté dans plusieurs études et fait intervenir des substrats comme le calcium intracellulaire, PKA, GSK, etc. [115-117].

Notons qu'une étude a démontré qu'un ordre de déplétion dopaminergique striatal très important pouvait hyperphosphoryler Tau [102]. Il existerait donc un lien direct entre la phosphorylation de Tau et la diminution de la dopamine synaptique. Nos résultats ne montrent pas une hyperphosphorylation de Tau avec la diminution seule de la dopamine striatale. Cependant, nous n'avons obtenu que 50 % de déplétion dopaminergique alors que le niveau de déplétion dans ces études était de l'ordre de 80 %. Nous concluons donc que l'étendue de la dénervation est importante dans la phosphorylation de Tau et le seuil de dénervation pour hyperphosphoryler Tau pourrait se situer entre 50 et 80 %.

4.5 L'effet tonique de la DA sur la phosphorylation de Tau dans les neurones du striatum

Nos expériences sur la phosphorylation de Tau induit par la DA en fonction du temps nous ont permis d'établir que le processus d'hyperphosphorylation de Tau se produisait de façon transitoire. Cet effet tonique est expliqué par le retour au niveau de base de la phosphorylation de Tau lorsque la stimulation DAergique s'allonge ou lorsque la stimulation DAergique cesse après un bref moment d'activité. Par exemple, nous obtenons une hyperphosphorylation de Tau dans nos tranches de striatum pour les sérines 199-202 après 30 min de stimulation DAergique, toutefois cette hyperphosphorylation s'estompe après 1 h de traitement. On peut supposer que cette stimulation continue des récepteurs DAergique peut diminuer l'hypersensibilité des récepteurs à la DA et ainsi inhiber la voie « alternative » de transmission DAergique permettant de phosphoryler Tau. On peut faire un parallèle à cette observation avec des études antérieures sur des rats hemiparkinsoniens. Ces études démontraient qu'une stimulation intermittente des récepteurs à la dopamine par la L-DOPA peut augmenter la phosphorylation de Tau striatal alors qu'une stimulation en continu n'en change pas les niveaux de phosphorylation [82, 84]. Il est proposé que cette administration pulsatile de DA dans un striatum dénervé active de manière non physiologique les récepteurs à la DA et particulièrement les récepteurs DAergique D1 [118]. Dans nos expériences *in vivo*, les niveaux de Tau phosphorylés retrouvent un niveau semblable au niveau de Tau des souris contrôles 24 h après la dernière stimulation DAergique. L'effet tonique dans cet exemple peut s'expliquer par la clairance, la courte demi-vie et le recyclage rapide de la DA dans les terminaisons nerveuses. Cette modification transitoire observée au pic d'effet de la L-DOPA dans un striatum dénervé illustre une influence tonique de la DA sur la phosphorylation de Tau. Cet effet tonique peut être responsable de changements cytoarchitecturaux non réversibles à long terme.

CHAPITRE V

CONCLUSION

5.1 Implication des altérations des propriétés physicochimiques de Tau et les processus de développement des dyskinésies

Normalement, les neurones dopaminergiques de la SNc délivrent la dopamine au striatum avec une relative constance [119]. Dans la maladie de Parkinson, la dégénérescence des neurones dopaminergiques rend le système toujours diminué en dopamine et il y a probablement comme conséquence une hypersensibilité des récepteurs DAergiques qui se développe. Avec la dénervation et les doses répétées de précurseurs dopaminergiques pour améliorer les symptômes de la maladie, il se produit des oscillations incontrôlées de dopamine dans le striatum qui s'amplifient avec la progression de la maladie [48]. Cette activation « interrupteur » des récepteurs causés par l'administration répétée de DA participerait selon certaines études au développement de troubles moteurs appelés dyskinésies [46]. La dyskinésie survient habituellement après 5-10 ans de traitement avec des agonistes DAergiques chez 70 % des patients parkinsoniens. Elle est caractérisée par des mouvements anormaux choréiformes survenant initialement au pic de dose de la L-DOPA et devient incapacitante avec la progression de la maladie. Il a été démontré dans une expérience *in vivo*, chez des rats, modèle hémiparkinsonien lésés au 6-OHDA et traités avec de la L-DOPA, qu'il existait une augmentation notable de la phosphorylation de Tau chez les rats dyskinétiques [40]. Dans nos expériences, nous avons utilisé un système de transmission à la DA semblable au système de transmission DAergique chez les patients parkinsoniens. Nous avançons donc l'hypothèse que cette oscillation de DA dans le striatum avec les changements structuraux des neurones associés peut être en partie responsable de ces mouvements moteurs involontaires observés chez les patients parkinsoniens. Nous savons que l'hyperphosphorylation change les propriétés physico-chimiques de la protéine Tau et que sa solubilité dans le sarkosyl en devient altérée. Nous pensons donc qu'il se pourrait

qu'à long terme, ces changements de la cytoarchitecture du squelette cellulaire altèrent les signaux de transmission responsable du mouvement et expliquerait les dyskinésies. D'autres recherches devraient être entreprises pour vérifier le lien entre la dyskinésie et la phosphorylation de Tau.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 Caron, M.G., M. Beaulieu, V. Raymond, B. Gagne, J. Drouin, R.J. Lefkowitz, and F. Labrie, *Dopaminergic receptors in the anterior pituitary gland. Correlation of [3H]dihydroergocryptine binding with the dopaminergic control of prolactin release*. The Journal of biological chemistry, 1978. **253**(7): p. 2244-53.
- 2 Jaber, M., S.W. Robinson, C. Missale, and M.G. Caron, *Dopamine receptors and brain function*. Neuropharmacology, 1996. **35**(11): p. 1503-19.
- 3 Gardner, D.G., *Greenspan's basic & clinical endocrinology*. 8th ed. N.Y.L.M.-H. Medical2007.
- 4 Missale, C., S.R. Nash, S.W. Robinson, M. Jaber, and M.G. Caron, *Dopamine receptors: from structure to function*. Physiological reviews, 1998. **78**(1): p. 189-225.
- 5 Fahn, S., *The history of dopamine and levodopa in the treatment of Parkinson's disease*. Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society, 2008. **23 Suppl 3**: p. S497-508.
- 6 Hornykiewicz, O., *Dopamine miracle: from brain homogenate to dopamine replacement*. Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society, 2002. **17**(3): p. 501-8.
- 7 Connors, M.F.B., *Neurosciences : à la découverte du cerveau*, éd. Pradel 1997.
- 8 Allain, P. *Pharmacorama*. Les médicaments 2004 2013 [cited 2013 6 mars]; 3ème édition [Available from: <http://www.pharmacorama.com/Rubriques/Output/Catecholaminesa2.php>]
- 9 Youdim, M.B., D. Edmondson, and K.F. Tipton, *The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors*. Nature reviews. Neuroscience, 2006. **7**(4): p. 295-309.
- 10 Eriksen, J., T.N. Jorgensen, and U. Gether, *Regulation of dopamine transporter function by protein-protein interactions: new discoveries and methodological challenges*. Journal of neurochemistry, 2010. **113**(1): p. 27-41.
- 11 Landry, J.-P.G.e.Y., *Pharmacologie: Des cibles vers l'indication thérapeutique* 2009.

- 12 Blumenfeld, H., *Neuroanatomy through clinical cases* ed. M.S. Sunderlandc 2002.
- 13 Schlagenhauf, F., M. Dinges, A. Beck, T. Wustenberg, E. Friedel, T. Dembler, R. Sarkar, J. Wrase, J. Gallinat, G. Juckel, and A. Heinz, *Switching schizophrenia patients from typical neuroleptics to aripiprazole: effects on working memory dependent functional activation*. Schizophrenia research, 2010. **118**(1-3): p. 189-200.
- 14 Nestler, E.J., *Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction*. Nature reviews. Neuroscience, 2001. **2**(2): p. 119-28.
- 15 Di Chiara, G. and A. Imperato, *Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1988. **85**(14): p. 5274-8.
- 16 Dunlop, B.W. and C.B. Nemeroff, *The role of dopamine in the pathophysiology of depression*. Archives of general psychiatry, 2007. **64**(3): p. 327-37.
- 17 van der Kooy, D., D.V. Coscina, and T. Hattori, *Is there a non-dopaminergic nigrostriatal pathway?* Neuroscience, 1981. **6**(3): p. 345-57.
- 18 McClure, S.M., G.S. Berns, and P.R. Montague, *Temporal prediction errors in a passive learning task activate human striatum*. Neuron, 2003. **38**(2): p. 339-46.
- 19 Crossman, A.R., *Functional anatomy of movement disorders*. Journal of anatomy, 2000. **196** (Pt 4): p. 519-25.
- 20 Alexander, G.E., M.R. DeLong, and P.L. Strick, *Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex*. Annual review of neuroscience, 1986. **9**: p. 357-81.
- 21 Sealfon, S.C. and C.W. Olanow, *Dopamine receptors: from structure to behavior*. Trends in neurosciences, 2000. **23**(10 Suppl): p. S34-40.
- 22 Keibadian, J.W., G.L. Petzold, and P. Greengard, *Dopamine-sensitive adenylate cyclase in caudate nucleus of rat brain, and its similarity to the "dopamine receptor"*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1972. **69**(8): p. 2145-9.
- 23 Dearry, A., J.A. Gingrich, P. Falardeau, R.T. Fremeau, Jr., M.D. Bates, and M.G. Caron, *Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor*. Nature, 1990. **347**(6288): p. 72-6.

- 24 Kortagere, S. and W.J. Welsh, *Development and application of hybrid structure based method for efficient screening of ligands binding to G-protein coupled receptors*. Journal of computer-aided molecular design, 2006. **20**(12): p. 789-802.
- 25 123bio.net. *biologie et recherche*. La famille des récepteurs couplés aux protéines-G 2013 [cited 2013 6 mars]; Available from: <http://www.123bio.net/cours/liaison/partie43.html>
- 26 Freneau, R.T., Jr., G.E. Duncan, M.G. Fornaretto, A. Dearry, J.A. Gingrich, G.R. Breese, and M.G. Caron, *Localization of D1 dopamine receptor mRNA in brain supports a role in cognitive, affective, and neuroendocrine aspects of dopaminergic neurotransmission*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. **88**(9): p. 3772-6.
- 27 Vallone, D., R. Picetti, and E. Borrelli, *Structure and function of dopamine receptors*. Neuroscience and biobehavioral reviews, 2000. **24**(1): p. 125-32.
- 28 Khan, Z.U., A. Gutierrez, R. Martin, A. Penafiel, A. Rivera, and A. de la Calle, *Dopamine D5 receptors of rat and human brain*. Neuroscience, 2000. **100**(4): p. 689-99.
- 29 Ciliax, B.J., N. Nash, C. Heilman, R. Sunahara, A. Hartney, M. Tiberi, D.B. Rye, M.G. Caron, H.B. Niznik, and A.I. Levey, *Dopamine D(5) receptor immunolocalization in rat and monkey brain*. Synapse, 2000. **37**(2): p. 125-45.
- 30 Giros, B., P. Sokoloff, M.P. Martres, J.F. Riou, L.J. Emorine, and J.C. Schwartz, *Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms*. Nature, 1989. **342**(6252): p. 923-6.
- 31 Monsma, F.J., Jr., L.D. McVittie, C.R. Gerfen, L.C. Mahan, and D.R. Sibley, *Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing*. Nature, 1989. **342**(6252): p. 926-9.
- 32 Kukstas, L.A., C. Domec, L. Bascles, J. Bonnet, D. Verrier, J.M. Israel, and J.D. Vincent, *Different expression of the two dopaminergic D2 receptors, D2415 and D2444, in two types of lactotroph each characterised by their response to dopamine, and modification of expression by sex steroids*. Endocrinology, 1991. **129**(2): p. 1101-3.
- 33 Martres, M.P., P. Sokoloff, B. Giros, and J.C. Schwartz, *Effects of dopaminergic transmission interruption on the D2 receptor isoforms in various cerebral tissues*. Journal of neurochemistry, 1992. **58**(2): p. 673-9.

- 34 Aubert, I., I. Ghorayeb, E. Normand, and B. Bloch, *Phenotypical characterization of the neurons expressing the D1 and D2 dopamine receptors in the monkey striatum*. The Journal of comparative neurology, 2000. **418**(1): p. 22-32.
- 35 Gerfen, C.R., K.A. Keefe, and E.B. Gauda, *D1 and D2 dopamine receptor function in the striatum: coactivation of D1- and D2-dopamine receptors on separate populations of neurons results in potentiated immediate early gene response in D1-containing neurons*. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 1995. **15**(12): p. 8167-76.
- 36 Weiner, D.M., A.I. Levey, R.K. Sunahara, H.B. Niznik, B.F. O'Dowd, P. Seeman, and M.R. Brann, *D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. **88**(5): p. 1859-63.
- 37 Diaz, J., D. Levesque, C.H. Lammers, N. Griffon, M.P. Martres, J.C. Schwartz, and P. Sokoloff, *Phenotypical characterization of neurons expressing the dopamine D3 receptor in the rat brain*. Neuroscience, 1995. **65**(3): p. 731-45.
- 38 Malmberg, A. and N. Mohell, *Characterization of [3H]quinpirole binding to human dopamine D2A and D3 receptors: effects of ions and guanine nucleotides*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 1995. **274**(2): p. 790-7.
- 39 Missale, C., C. Fiorentini, G. Collo, and P. Spano, *The neurobiology of dopamine receptors: evolution from the dual concept to heterodimer complexes*. Journal of receptor and signal transduction research, 2010. **30**(5): p. 347-54.
- 40 Chen, P.C., C.L. Lao, and J.C. Chen, *The D(3) dopamine receptor inhibits dopamine release in PC-12/hD3 cells by autoreceptor signaling via PP-2B, CK1, and Cdk-5*. Journal of neurochemistry, 2009. **110**(4): p. 1180-90.
- 41 Civelli, O., J.R. Bunzow, and D.K. Grandy, *Molecular diversity of the dopamine receptors*. Annual review of pharmacology and toxicology, 1993. **33**: p. 281-307.
- 42 Murray, A.M., T.M. Hyde, M.B. Knable, M.M. Herman, L.B. Bigelow, J.M. Carter, D.R. Weinberger, and J.E. Kleinman, *Distribution of putative D4 dopamine receptors in postmortem striatum from patients with schizophrenia*. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 1995. **15**(3 Pt 2): p. 2186-91.

- 43 Primus, R.J., A. Thurkauf, J. Xu, E. Yevich, S. McInerney, K. Shaw, J.F. Tallman, and D.W. Gallagher, *II. Localization and characterization of dopamine D4 binding sites in rat and human brain by use of the novel, D4 receptor-selective ligand [3H]NGD 94-1*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 1997. **282**(2): p. 1020-7.
- 44 Van Tol, H.H., J.R. Bunzow, H.C. Guan, R.K. Sunahara, P. Seeman, H.B. Niznik, and O. Civelli, *Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine*. Nature, 1991. **350**(6319): p. 610-4.
- 45 Konta, B. and W. Frank, *The treatment of Parkinson's disease with dopamine agonists*. GMS health technology assessment, 2008. **4**: p. Doc05.
- 46 Lebel, M., L. Chagniel, G. Bureau, and M. Cyr, *Striatal inhibition of PKA prevents levodopa-induced behavioural and molecular changes in the hemiparkinsonian rat*. Neurobiology of disease, 2010. **38**(1): p. 59-67.
- 47 Lv, Q. and B. Zhang, *Application of the concept of continuous dopaminergic stimulation for the management of Parkinson's disease*. Neurosci Bull, 2013.
- 48 Poewe, W., A. Antonini, J.C. Zijlmans, P.R. Burkhard, and F. Vingerhoets, *Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: an old drug still going strong*. Clinical interventions in aging, 2010. **5**: p. 229-38.
- 49 Gingrich, J.A. and M.G. Caron, *Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors*. Annual review of neuroscience, 1993. **16**: p. 299-321.
- 50 Neve, K.A., J.K. Seamans, and H. Trantham-Davidson, *Dopamine receptor signaling*. Journal of receptor and signal transduction research, 2004. **24**(3): p. 165-205.
- 51 Lebel, M., P. Robinson, and M. Cyr, *Canadian Association of Neurosciences Review: the role of dopamine receptor function in neurodegenerative diseases*. The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques, 2007. **34**(1): p. 18-29.
- 52 Chappie, T.A., J.M. Humphrey, M.P. Allen, K.G. Estep, C.B. Fox, L.A. Lebel, S. Liras, E.S. Marr, F.S. Menniti, J. Pandit, C.J. Schmidt, M. Tu, R.D. Williams, and F.V. Yang, *Discovery of a series of 6,7-dimethoxy-4-pyrrolidylquinazoline PDE10A inhibitors*. J Med Chem, 2007. **50**(2): p. 182-5.
- 53 Cole, R.L., C. Konradi, J. Douglass, and S.E. Hyman, *Neuronal adaptation to amphetamine and dopamine: molecular mechanisms of prodynorphin gene regulation in rat striatum*. Neuron, 1995. **14**(4): p. 813-23.

- 54 Brami-Cherrier, K., E. Valjent, M. Garcia, C. Pages, R.A. Hipskind, and J. Caboche, *Dopamine induces a PI3-kinase-independent activation of Akt in striatal neurons: a new route to cAMP response element-binding protein phosphorylation*. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 2002. **22**(20): p. 8911-21.
- 55 Berke, J.D. and S.E. Hyman, *Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory*. Neuron, 2000. **25**(3): p. 515-32.
- 56 Andersson, M., A. Hilbertson, and M.A. Cenci, *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*. Neurobiology of disease, 1999. **6**(6): p. 461-74.
- 57 Greengard, P., P.B. Allen, and A.C. Nairn, *Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade*. Neuron, 1999. **23**(3): p. 435-47.
- 58 Bibb, J.A., G.L. Snyder, A. Nishi, Z. Yan, L. Meijer, A.A. Fienberg, L.H. Tsai, Y.T. Kwon, J.A. Girault, A.J. Czernik, R.L. Huganir, H.C. Hemmings, Jr., A.C. Nairn, and P. Greengard, *Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons*. Nature, 1999. **402**(6762): p. 669-71.
- 59 Svenningsson, P., A. Nishi, G. Fisone, J.A. Girault, A.C. Nairn, and P. Greengard, *DARPP-32: an integrator of neurotransmission*. Annual review of pharmacology and toxicology, 2004. **44**: p. 269-96.
- 60 Nishi, A., G.L. Snyder, and P. Greengard, *Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 1997. **17**(21): p. 8147-55.
- 61 Fiorentini, C., F. Gardoni, P. Spano, M. Di Luca, and C. Missale, *Regulation of dopamine D1 receptor trafficking and desensitization by oligomerization with glutamate N-methyl-D-aspartate receptors*. The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(22): p. 20196-202.
- 62 Ferre, S., R. Baler, M. Bouvier, M.G. Caron, L.A. Devi, T. Durrux, K. Fuxe, S.R. George, J.A. Javitch, M.J. Lohse, K. Mackie, G. Milligan, K.D. Pfleger, J.P. Pin, N.D. Volkow, M. Waldhoer, A.S. Woods, and R. Franco, *Building a new conceptual framework for receptor heteromers*. Nature chemical biology, 2009. **5**(3): p. 131-4.
- 63 Angers, S., A. Salahpour, and M. Bouvier, *Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function*. Annual review of pharmacology and toxicology, 2002. **42**: p. 409-35.

- 64 Milligan, G., *G protein-coupled receptor hetero-dimerization: contribution to pharmacology and function*. British journal of pharmacology, 2009. **158**(1): p. 5-14.
- 65 Fuxe, K., D. Marcellino, D. Guidolin, A.S. Woods, and L.F. Agnati, *Heterodimers and receptor mosaics of different types of G-protein-coupled receptors*. Physiology, 2008. **23**: p. 322-32.
- 66 Carriba, P., G. Navarro, F. Ciruela, S. Ferre, V. Casado, L. Agnati, A. Cortes, J. Mallol, K. Fuxe, E.I. Canela, C. Lluís, and R. Franco, *Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET*. Nature methods, 2008. **5**(8): p. 727-33.
- 67 Terrillon, S. and M. Bouvier, *Roles of G-protein-coupled receptor dimerization*. EMBO reports, 2004. **5**(1): p. 30-4.
- 68 Bordet, R., S. Ridray, J.C. Schwartz, and P. Sokoloff, *Involvement of the direct striatonigral pathway in levodopa-induced sensitization in 6-hydroxydopamine-lesioned rats*. The European journal of neuroscience, 2000. **12**(6): p. 2117-23.
- 69 Hara, Y. and V.M. Pickel, *Overlapping intracellular and differential synaptic distributions of dopamine D1 and glutamate N-methyl-D-aspartate receptors in rat nucleus accumbens*. The Journal of comparative neurology, 2005. **492**(4): p. 442-55.
- 70 Eric R. Kandel, J.H.S., Thomas M. Jessell, *Principles of neural science*, ed. H.P.D. New York: McGraw-Hill 2000.
- 71 Hirokawa, N., Y. Shiomura, and S. Okabe, *Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules*. The Journal of cell biology, 1988. **107**(4): p. 1449-59.
- 72 Gendron, T.F. and L. Petrucelli, *The role of tau in neurodegeneration*. Molecular neurodegeneration, 2009. **4**: p. 13.
- 73 Santa-Maria, I., C. Diaz-Ruiz, H. Ksiezak-Reding, A. Chen, L. Ho, J. Wang, and G.M. Pasinetti, *GSPE interferes with tau aggregation in vivo: implication for treating tauopathy*. Neurobiol Aging, 2012. **33**(9): p. 2072-81.
- 74 Engel, T., J.J. Lucas, F. Hernandez, and J. Avila, *A mouse model to study tau pathology related with tau phosphorylation and assembly*. J Neurol Sci, 2007. **257**(1-2): p. 250-4.

- 75 Anderson, J.M., R. Patani, R. Reynolds, R. Nicholas, A. Compston, M.G. Spillantini, and S. Chandran, *Evidence for abnormal tau phosphorylation in early aggressive multiple sclerosis*. *Acta Neuropathol*, 2009. **117**(5): p. 583-9.
- 76 Julien, C., A. Bretteville, and E. Planel, *Biochemical isolation of insoluble tau in transgenic mouse models of tauopathies*. *Methods Mol Biol*, 2012. **849**: p. 473-91.
- 77 Greenberg, S.G. and P. Davies, *A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(15): p. 5827-31.
- 78 Ishihara, T., M. Hong, B. Zhang, Y. Nakagawa, M.K. Lee, J.Q. Trojanowski, and V.M. Lee, *Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform*. *Neuron*, 1999. **24**(3): p. 751-62.
- 79 Sun, L., X. Wang, S. Liu, Q. Wang, J. Wang, M. Bennechib, C.X. Gong, A. Sengupta, I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal, *Bilateral injection of isoproterenol into hippocampus induces Alzheimer-like hyperphosphorylation of tau and spatial memory deficit in rat*. *FEBS letters*, 2005. **579**(1): p. 251-8.
- 80 Baumann, K., E.M. Mandelkow, J. Biernat, H. Piwnica-Worms, and E. Mandelkow, *Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5*. *FEBS letters*, 1993. **336**(3): p. 417-24.
- 81 Delacourte, A. *Association pour le Développement des Neurosciences Appliquées*. Kinases 03-01-2013 16-03-2013]; Available from: <http://www.alzheimer-adna.com/Mol/Kinases.html>
- 82 Lebel, M. and M. Cyr, *Molecular and cellular events of dopamine D1 receptor-mediated tau phosphorylation in SK-N-MC cells*. *Synapse*, 2011. **65**(1): p. 69-76.
- 83 Lee, K.W., Y. Kim, A.M. Kim, K. Helmin, A.C. Nairn, and P. Greengard, *Cocaine-induced dendritic spine formation in D1 and D2 dopamine receptor-containing medium spiny neurons in nucleus accumbens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006. **103**(9): p. 3399-404.
- 84 Lebel, M., C. Patenaude, J. Allyson, G. Massicotte, and M. Cyr, *Dopamine D1 receptor activation induces tau phosphorylation via cdk5 and GSK3 signaling pathways*. *Neuropharmacology*, 2009. **57**(4): p. 392-402.

- 85 Hirata-Fukae, C., H.F. Li, L. Ma, H.S. Hoe, G.W. Rebeck, P.S. Aisen, and Y. Matsuoka, *Levels of soluble and insoluble tau reflect overall status of tau phosphorylation in vivo*. Neuroscience letters, 2009. **450**(1): p. 51-5.
- 86 Kimura, T., T. Fukuda, N. Sahara, S. Yamashita, M. Murayama, T. Mizoroki, Y. Yoshiike, B. Lee, I. Sotiropoulos, S. Maeda, and A. Takashima, *Aggregation of detergent-insoluble tau is involved in neuronal loss but not in synaptic loss*. J Biol Chem, 2010. **285**(49): p. 38692-9.
- 87 Surmeier, D.J., J. Ding, M. Day, Z. Wang, and W. Shen, *D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons*. Trends Neurosci, 2007. **30**(5): p. 228-35.
- 88 Kisilevsky, A.E., S.J. Mulligan, C. Altier, M.C. Iftinca, D. Varela, C. Tai, L. Chen, S. Hameed, J. Hamid, B.A. Macvicar, and G.W. Zamponi, *D1 receptors physically interact with N-type calcium channels to regulate channel distribution and dendritic calcium entry*. Neuron, 2008. **58**(4): p. 557-70.
- 89 Zigmond, M.J. and E.M. Stricker, *Animal models of parkinsonism using selective neurotoxins: clinical and basic implications*. International review of neurobiology, 1989. **31**: p. 1-79.
- 90 Gerlach, M., P. Riederer, H. Przuntek, and M.B. Youdim, *MPTP mechanisms of neurotoxicity and their implications for Parkinson's disease*. European journal of pharmacology, 1991. **208**(4): p. 273-86.
- 91 Tipton, K.F. and T.P. Singer, *Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds*. Journal of neurochemistry, 1993. **61**(4): p. 1191-206.
- 92 Jakowec, M.W. and G.M. Petzinger, *1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned model of parkinson's disease, with emphasis on mice and nonhuman primates*. Comparative medicine, 2004. **54**(5): p. 497-513.
- 93 Jackson-Lewis, V. and S. Przedborski, *Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease*. Nature protocols, 2007. **2**(1): p. 141-51.
- 94 Robinson, P., M. Lebel, and M. Cyr, *Dopamine D1 receptor-mediated aggregation of N-terminal fragments of mutant huntingtin and cell death in a neuroblastoma cell line*. Neuroscience, 2008. **153**(3): p. 762-72.

- 95 Chen, J., C. Wersinger, and A. Sidhu, *Chronic stimulation of D1 dopamine receptors in human SK-N-MC neuroblastoma cells induces nitric-oxide synthase activation and cytotoxicity*. The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(30): p. 28089-100.
- 96 Kimura, T., T. Fukuda, N. Sahara, S. Yamashita, M. Murayama, T. Mizoroki, Y. Yoshiike, B. Lee, I. Sotiropoulos, S. Maeda, and A. Takashima, *Aggregation of detergent-insoluble tau is involved in neuronal loss but not in synaptic loss*. The Journal of biological chemistry, 2010. **285**(49): p. 38692-9.
- 97 Martel, M.A., D.J. Wyllie, and G.E. Hardingham, *In developing hippocampal neurons, NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) can mediate signaling to neuronal survival and synaptic potentiation, as well as neuronal death*. Neuroscience, 2009. **158**(1): p. 334-43.
- 98 Fischer, G., V. Mutel, G. Trube, P. Malherbe, J.N. Kew, E. Mohacsi, M.P. Heitz, and J.A. Kemp, *Ro 25-6981, a highly potent and selective blocker of N-methyl-D-aspartate receptors containing the NR2B subunit. Characterization in vitro*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 1997. **283**(3): p. 1285-92.
- 99 Stephenson, D.T., M.A. Childs, Q. Li, S. Carvajal-Gonzalez, A. Opsahl, M. Tengowski, M.D. Meglasson, K. Merchant, and M.E. Emborg, *Differential loss of presynaptic dopaminergic markers in Parkinsonian monkeys*. Cell transplantation, 2007. **16**(3): p. 229-44.
- 100 Langston, J.W., *The Impact of MPTP on Parkinson's Disease Research: Past, Present, and Future*, in *Parkinson's Disease: Diagnosis and Clinical Management.*, W.W. Factor SA, Editor 2002, Demos Medical Publishing: New York.
- 101 Przedborski, S., V. Jackson-Lewis, R. Djaldetti, G. Liberatore, M. Vila, S. Vukosavic, and G. Almer, *The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism*. Restorative neurology and neuroscience, 2000. **16**(2): p. 135-142.
- 102 Duka, T., M. Rusnak, R.E. Drolet, V. Duka, C. Wersinger, J.L. Goudreau, and A. Sidhu, *Alpha-synuclein induces hyperphosphorylation of Tau in the MPTP model of parkinsonism*. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2006. **20**(13): p. 2302-12.
- 103 Qureshi, H.Y. and H.K. Paudel, *Parkinsonian neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and alpha-synuclein mutations promote Tau protein phosphorylation at Ser262 and destabilize microtubule cytoskeleton in vitro*. The Journal of biological chemistry, 2011. **286**(7): p. 5055-68.

- 104 Wersinger, C. and A. Sidhu, *Disruption of the interaction of alpha-synuclein with microtubules enhances cell surface recruitment of the dopamine transporter*. Biochemistry, 2005. **44**(41): p. 13612-24.
- 105 Planel, E., K.E. Richter, C.E. Nolan, J.E. Finley, L. Liu, Y. Wen, P. Krishnamurthy, M. Herman, L. Wang, J.B. Schachter, R.B. Nelson, L.F. Lau, and K.E. Duff, *Anesthesia leads to tau hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia*. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 2007. **27**(12): p. 3090-7.
- 106 Lebel, M., P. Robinson, and M. Cyr, *Canadian Association of Neurosciences Review: the role of dopamine receptor function in neurodegenerative diseases*. Can J Neurol Sci, 2007. **34**(1): p. 18-29.
- 107 Hallett, P.J., R. Spoelgen, B.T. Hyman, D.G. Standaert, and A.W. Dunah, *Dopamine D1 activation potentiates striatal NMDA receptors by tyrosine phosphorylation-dependent subunit trafficking*. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 2006. **26**(17): p. 4690-700.
- 108 Santini, E., E. Valjent, A. Usiello, M. Carta, A. Borgkvist, J.A. Girault, D. Herve, P. Greengard, and G. Fisone, *Critical involvement of cAMP/DARPP-32 and extracellular signal-regulated protein kinase signaling in L-DOPA-induced dyskinesia*. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 2007. **27**(26): p. 6995-7005.
- 109 Lee, F.J., S. Xue, L. Pei, B. Vukusic, N. Chery, Y. Wang, Y.T. Wang, H.B. Niznik, X.M. Yu, and F. Liu, *Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor*. Cell, 2002. **111**(2): p. 219-30.
- 110 Zhang, J., J.O. Price, D.G. Graham, and T.J. Montine, *Secondary excitotoxicity contributes to dopamine-induced apoptosis of dopaminergic neuronal cultures*. Biochemical and biophysical research communications, 1998. **248**(3): p. 812-6.
- 111 Cepeda, C., C.S. Colwell, J.N. Itri, S.H. Chandler, and M.S. Levine, *Dopaminergic modulation of NMDA-induced whole cell currents in neostriatal neurons in slices: contribution of calcium conductances*. Journal of neurophysiology, 1998. **79**(1): p. 82-94.
- 112 Stoothoff, W.H. and G.V. Johnson, *Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences*. Biochimica et biophysica acta, 2005. **1739**(2-3): p. 280-97.

- 113 Sahara, N., J. Lewis, M. DeTure, E. McGowan, D.W. Dickson, M. Hutton, and S.H. Yen, *Assembly of tau in transgenic animals expressing P301L tau: alteration of phosphorylation and solubility*. Journal of neurochemistry, 2002. **83**(6): p. 1498-508.
- 114 Hoover, B.R., M.N. Reed, J. Su, R.D. Penrod, L.A. Kotilinek, M.K. Grant, R. Pitstick, G.A. Carlson, L.M. Lanier, L.L. Yuan, K.H. Ashe, and D. Liao, *Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration*. Neuron, 2010. **68**(6): p. 1067-81.
- 115 Corvol, J.C., J.A. Girault, and D. Herve, *[Role and regulation of dopamine D1 receptors in the striatum: implications for the genesis of dyskinesia in Parkinson's disease]*. Rev Neurol (Paris), 2006. **162**(6-7): p. 691-702.
- 116 Corvol, J.C., M.P. Muriel, E. Valjent, J. Feger, N. Hanoun, J.A. Girault, E.C. Hirsch, and D. Herve, *Persistent increase in olfactory type G-protein alpha subunit levels may underlie D1 receptor functional hypersensitivity in Parkinson disease*. J Neurosci, 2004. **24**(31): p. 7007-14.
- 117 Aubert, I., C. Guigoni, K. Hakansson, Q. Li, S. Dovero, N. Barthe, B.H. Bioulac, C.E. Gross, G. Fisone, B. Bloch, and E. Bezard, *Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia*. Ann Neurol, 2005. **57**(1): p. 17-26.
- 118 Laforet, G.A., E. Sapp, K. Chase, C. McIntyre, F.M. Boyce, M. Campbell, B.A. Cadigan, L. Warzecki, D.A. Tagle, P.H. Reddy, C. Cepeda, C.R. Calvert, E.S. Jokel, G.J. Klapstein, M.A. Ariano, M.S. Levine, M. DiFiglia, and N. Aronin, *Changes in cortical and striatal neurons predict behavioral and electrophysiological abnormalities in a transgenic murine model of Huntington's disease*. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 2001. **21**(23): p. 9112-23.
- 119 Venton, B.J., A.T. Seipel, P.E. Phillips, W.C. Wetsel, D. Gitler, P. Greengard, G.J. Augustine, and R.M. Wightman, *Cocaine increases dopamine release by mobilization of a synapsin-dependent reserve pool*. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 2006. **26**(12): p. 3206-9.