

CATHERINE LAROCHELLE

**UTILISATION DE LA STRATÉGIE ANTISENS POUR CARACTÉRISER LE  
RÔLE DU RÉCEPTEUR DOPAMINERGIQUE D2 AU NIVEAU DU STRIATUM  
CHEZ LE PRIMATE NON HUMAIN**

*Mémoire présenté*  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de maîtrise en neurobiologie  
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

DÉPARTEMENT DE NEUROBIOLOGIE  
FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2007

## RÉSUMÉ

La maladie de Parkinson est une affection neurodégénérative impliquant le système dopaminergique dans le circuit des ganglions de la base. Le traitement actuel entraîne des effets secondaires moteurs majeurs. Une caractérisation exacte du rôle de chaque récepteur dopaminergique tant au niveau physiologique que pathologique pourrait permettre de mieux comprendre la maladie et les effets secondaires du remplacement de la dopamine, ainsi que bien d'autres maladies neurologiques impliquant ce neurotransmetteur.

Chez les rongeurs, la stratégie antisens constitue un outil précieux pour l'étude du rôle des récepteurs du système nerveux, étant plus spécifique que l'approche pharmacologique et n'allouant pas la possibilité d'adaptation comme l'approche transgénique. Les primates étant des modèles animaux plus près de l'humain, l'application de la stratégie antisens aux singes, encore non réalisée au meilleur de notre connaissance, est donc d'un intérêt majeur.

L'objectif du présent mémoire a été de caractériser et valider l'utilisation de la stratégie antisens en intracérébral chez le primate non humain, dans le cadre de la caractérisation du rôle du récepteur dopaminergique D2. Pour ce faire, le récepteur D2 du macaque a été cloné et une séquence antisens cible identifiée lors d'un précédent travail par Isabelle Weppe. Par la suite, la diffusion de l'antisens au niveau du striatum du singe a été étudiée. Celle-ci étant satisfaisante, des études comportementales ont été réalisées chez des singes normaux et chez des singes hémiparkinsoniens, sous contrôle de sondes d'oligonucléotides aléatoires.

Bien que de futures expériences impliquant un plus grand nombre de sujets avec des caractéristiques de base uniformes soient nécessaires, nous proposons ici un premier essai avec un antisens D2 en infusion continue dans le putamen de macaques à longue queue. Des effets comportementaux reproductibles ont pu être observés et la toxicité des sondes a paru mineure. Les résultats biochimiques ont été comparables à ceux obtenus chez le rat au niveau des récepteurs D2 et D1, et sont moins facilement interprétables dans le cas des neuropeptides, ceux-ci n'ayant pas été mesurés chez les rats sous antisens D2 à notre connaissance.

## AVANT-PROPOS

Je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué à ce mémoire de près ou de loin. Plus particulièrement, je remercie mes directeurs, le Dr Paul J. Bédard et le Dr Daniel Lévesque, pour m'avoir donné la chance de réaliser ce projet et pour leur contribution tant scientifique qu'humaine. Je remercie aussi chaudement Geneviève Beaudry et Laurent Grégoire, les deux assistants de recherche qui m'ont tant donné et appris. Merci également à tous les étudiants, patrons, secrétaires et assistants du laboratoire de neurosciences du CHUL, dont le Dr Claude Rouillard, la Dre Thérèse Di Paolo, le Dr Frédéric Calon, Monique Baron, Pershia Samadi, Abdallah Hadj Tahar, Aurélie Darré, Nancy Bélanger, François et Isabelle.

Je remercie le FRSQ pour le soutien financier obtenu.

Je tiens particulièrement à remercier mes parents pour m'avoir transmis leur passion de la recherche ainsi que pour leur soutien et leurs précieux conseils. Je remercie aussi ma sœur, ma grand-mère et mes amis pour leurs encouragements. Finalement, je remercie tout spécialement Mathieu Paradis pour son intérêt et son support dans mes études.

# TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>ii</b>
<b>AVANT-PROPOS</b> .....	<b>iii</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>iv</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>vi</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>xi</b>
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
1.1 ANATOMIE DU MOUVEMENT VOLONTAIRE.....	1
1.2 RÉCEPTEURS DOPAMINERGIQUES ET NEUROPEPTIDES .....	4
1.3 MALADIE DE PARKINSON.....	8
1.4 DYSKINÉSIES INDUITES PAR LA L-DOPA .....	12
1.5 RÔLE DE D2 DANS LE CIRCUIT DES GANGLIONS DE LA BASE.....	14
1.6 LA STRATÉGIE ANTISENS.....	16
1.7 L'UTILISATION D'ODN ANTISENS D2 CHEZ LES RONGEURS.....	20
1.8 MISE EN CONTEXTE ET OBJECTIFS DE TRAVAIL.....	22
<b>CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODE</b> .....	<b>24</b>
2.1 ANIMAUX .....	24
2.1.1 Modèle hémiparkinsonien .....	25
2.2 OLIGODÉOXYRIBONUCLÉOTIDES (ODN) POUR D2.....	25
2.2.1 Préparation des oligodésoxyribonucléotides .....	25
2.3 ADMINISTRATION DES ODN ET CHIRURGIE .....	26
2.3.1 Préparation et anesthésie du singe .....	26
2.3.2 Stéréotaxie et installation de la minipompe .....	27
2.3.3 Postchirurgie.....	28
2.3.4 Retrait de la minipompe et sacrifice .....	28
2.4 PROTOCOLES D'INFUSION DES ODN ANTISENS ET CONTRÔLE.....	29
2.5 TESTS COMPORTEMENTAUX.....	30
2.5.1 Test d'utilisation préférentielle de la main.....	30
2.5.2 monkey Movement Assessment Panel (mMAP).....	32
2.5.3 Télémétrie.....	33
2.5.4 Vidéo .....	34
2.5.5 Administration des agents dopaminergiques.....	35
2.6 ANALYSES BIOCHIMIQUES.....	37
2.6.1 Préparation des cerveaux.....	37
2.6.2 Révélation à la biotine et Nissl.....	37
2.6.3 Études de liaison des sites récepteurs .....	38
2.6.4 Hybridations <i>in situ</i> .....	39
2.6.5 Quantifications.....	41

<b>CHAPITRE 3 : RÉSULTATS .....</b>	<b>43</b>
3.1 MACAQUE HA84.....	43
3.1.1 Évaluation comportementale.....	43
3.1.2 Évaluation biochimique.....	44
3.2 MACAQUE MA55 .....	52
3.2.1 Évaluation comportementale.....	52
3.2.2 Évaluation biochimique.....	56
3.3 MACAQUE MA35 .....	68
3.3.1 Évaluation comportementale.....	68
3.3.2 Évaluation biochimique.....	70
3.4 MACAQUE MA26 .....	80
3.4.1 Évaluation comportementale.....	80
3.5 MACAQUE HP1 (singe hémiparkinsonien).....	82
3.5.1 Évaluation comportementale.....	82
3.6 MACAQUE HP2 (singe hémiparkinsonien).....	83
3.6.1 Évaluation comportementale.....	83
3.7 MACAQUES PA, PM, GA, GM .....	84
3.7.1 Évaluation comportementale.....	84
3.7.2 Évaluation biochimique.....	88
<b>CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....</b>	<b>94</b>
4.1 DISCUSSION GÉNÉRALE.....	94
4.2 CHOIX DU SUJET.....	95
4.3 L'ANIMAL .....	95
4.4 RÉCEPTEUR D2.....	96
4.5 PROPRIÉTÉS DE LA SONDE ANTISENS .....	96
4.5.1 Général .....	96
4.5.2 Mode d'administration.....	98
4.5.3 Diffusion et toxicité .....	99
4.6 ÉTUDES COMPORTEMENTALES .....	100
4.7 ÉTUDES BIOCHIMIQUES.....	106
4.8 CONCLUSION.....	108
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>110</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique de l'organisation fonctionnelle du circuit des ganglions de la base (adapté de Steiner et Gerfen, 1998 et de Blandini <i>et al.</i> , 2000). DYN : dynorphine; ENK : enképhaline; SP : substance P; SN (PC) : substance noire pars compacta; (PR) : pars reticulata; VTA : aire ventrale tegmentale. ....	4
Figure 2 : Schéma représentant la structure des deux isoformes du récepteur D2 (tiré de Vallone <i>et al.</i> , 2000). ....	7
Figure 3 : Les sites de neurodégénérescence et les voies neurochimiques impliquées dans la maladie de Parkinson (tiré de Lang et Lozano, 1998a) .....	9
Figure 4 : Représentation schématique des changements survenant dans l'organisation fonctionnelle du circuit des ganglions de la base dans la maladie de Parkinson (adapté de Steiner et Gerfen, 1998 et de Blandini <i>et al.</i> , 2000). ....	10
Figure 5 : Séquence possible des événements moléculaires survenant dans le striatum et menant à l'apparition de dyskinésies induites par la L-DOPA chez le patient parkinsonien (adapté de Bédard <i>et al.</i> , 1999). ....	15
Figure 6 : Mécanismes par lesquels les oligonucléotides antisens peuvent interférer avec la synthèse des protéines: (1) blocage stérique de l'attachement des sous-unités ribosomales à l'ARNm au site 5'; (2) interférence avec l'épissage de l'ARNm par la liaison de l'antisens au site d'épissage donneur ou accepteur; (3) dégradation par la RNase H de l'ARNm hybridé. Cela peut survenir à n'importe quel endroit de l'ARNm où une molécule d'antisens se lie avec assez d'affinité, incluant le codon d'initiation de la traduction, les exons ou les introns, etc. (adapté de Myers et Dean, 2000). ....	18
Figure 7 : Cycle de vie proposé pour le récepteur D2 : Les récepteurs nouvellement synthétisés à partir de l'ARNm sont couplés à des protéines G et deviennent actifs lors de l'interaction avec un agoniste; la forme active du récepteur produit alors sa réponse caractéristique. Les récepteurs rentrent alors à l'intérieur de la cellule, deviennent non-fonctionnels et sont éventuellement détruits. Toutes les formes du récepteur (activable, active, non-fonctionnelle) seraient détectées par les essais de liaison habituels. Il est proposé ici qu'un oligodésoxynucléotide antisens, en bloquant la synthèse du bassin de récepteurs activables, réduit de façon importante la fonction des récepteurs sans produire de changement proportionnel dans les niveaux totaux de récepteurs, tels que mesurés par essais de liaison. Les flèches épaisses ou minces suggèrent respectivement des taux de réaction rapides ou lents. La taille relative des différents bassins de récepteurs est suggérée par la taille des représentations dans le diagramme (tiré de Weiss <i>et al.</i> , 1997a). ....	21
Figure 8 : Position de la canule au niveau du putamen (adapté de Szabo et Cowan, 1984). ....	28
Figure 9 : Singe utilisant le mMAP, appareil servant à mesurer la vitesse d'exécution de mouvement des membres antérieurs (adapté de Gash <i>et al.</i> , 1999) .....	33

Figure 10 : Utilisation préférentielle de la main au test de la règle sans pot pour le macaque HA84 au test d'administration de quinpirole 0,1 mg/kg, le singe n'a pas présenté de différences facilement observables dans son comportement. Bien que l'effet du quinpirole ait été notable (sommolence au début suivie d'un niveau assez élevé d'activité locomotrice), il n'a pas été très fort et la dose a par conséquent été ajustée à la hausse pour les autres expériences (voir Matériel et méthode). .....	43
Figure 11 : Aire de diffusion de l'antisens marqué à la biotine.....	44
Figure 12 : Vue au microscope de noyaux marqués à la biotine.....	44
Figure 13 : Décompte des noyaux neuronaux au niveau de la zone de diffusion de l'antisens.....	45
Figure 14 : Densité mesurée des récepteurs D2 dans le putamen médian de HA84 par rapport à la densité mesurée pour un macaque mâle normal.....	46
Figure 15 : Densité mesurée des récepteurs D2 dans le putamen latéral de HA84 par rapport à la densité mesurée pour un macaque mâle normal.....	46
Figure 16 : Densité mesurée des récepteurs D2 dans le noyau caudé de HA84 par rapport à la densité mesurée pour un macaque mâle normal.....	47
Figure 17 : Exemple représentatif d'auto-radiogramme illustrant l'hybridation in situ de l'ARNm de la PPE sur une coupe frontale du cerveau du singe HA84 au niveau de la canule d'infusion de l'AS. Image en pseudocouleur générée avec le logiciel NIH image. ....	48
Figure 18 : Densité mesurée de préproenképhaline dans le putamen médian de HA84.....	48
Figure 19 : Densité mesurée de préproenképhaline dans le putamen latéral de HA84 .....	49
Figure 20 : Densité mesurée de préproenképhaline dans le noyau caudé de HA84.....	49
Figure 21 : Hybridation de l'ARNm de la substance P sur une coupe frontale du cerveau de HA84 au niveau de la canule d'infusion de l'antisens.....	50
Figure 22 : Densité mesurée d'ARNm de substance P dans le putamen médian de HA84. ....	51
Figure 23 : Densité mesurée d'ARNm de substance P dans le putamen latéral de HA84. ....	51
Figure 24 : Densité mesurée d'ARNm de substance P dans le noyau caudé de HA84. ....	52
Figure 25 : Utilisation préférentielle de la main au test de la règle sans pot pour le macaque MA55. ....	53
Figure 26 : Vitesse d'exécution des membres antérieurs de MA55 mesurée avec le mMAP, avec tige en forme de point d'interrogation et carottes trouées.....	54
Figure 27 : Nombre de climbings en 15 min chez le macaque MA55, sous quinpirole et à l'état normal, avant et après infusion d'ODN.....	55
Figure 28 : Hybridation de l'ARNm de la substance P sur une coupe frontale vue de face du cerveau de MA55 au niveau de la canule d'infusion de l'antisens (hémisphère droit) et de la canule d'infusion du missens (hémisphère gauche). ....	56

Figure 29 : Densité mesurée des récepteurs D2 dans le putamen médian de MA55 dans l'hémisphère traité à l'ODN antisens et dans l'hémisphère traité à l'ODN contrôle. ....	57
Figure 30 : Densité mesurée des récepteurs D2 dans le putamen latéral de MA55 dans l'hémisphère traité à l'ODN antisens et dans l'hémisphère traité à l'ODN contrôle .....	58
Figure 31 : Densité mesurée des récepteurs D2 dans le noyau caudé de MA55 dans l'hémisphère traité à l'ODN antisens et dans l'hémisphère traité à l'ODN contrôle. ....	59
Figure 32 : Densité mesurée des récepteurs D1 dans le putamen médian de MA55 dans l'hémisphère traité à l'ODN antisens et dans l'hémisphère traité à l'ODN contrôle. ....	60
Figure 33 : Densité mesurée des récepteurs D1 dans le putamen médian de MA55 dans l'hémisphère traité à l'ODN antisens et dans l'hémisphère traité à l'ODN contrôle. ....	60
Figure 34 : Densité mesurée des récepteurs D1 dans le noyau caudé de MA55 dans l'hémisphère traité à l'ODN antisens et dans l'hémisphère traité à l'ODN contrôle .....	61
Figure 35 : Densité mesurée des récepteurs D3 dans le putamen médian de MA55 dans l'hémisphère traité à l'ODN antisens et dans l'hémisphère traité à l'ODN contrôle. ....	62
Figure 36 : Densité mesurée des récepteurs D3 dans le putamen latéral de MA55 dans l'hémisphère traité à l'ODN antisens et dans l'hémisphère traité à l'ODN contrôle. ....	63
Figure 37 : Densité mesurée des récepteurs D3 dans le noyau caudé de MA55 dans l'hémisphère traité à l'ODN antisens et dans l'hémisphère traité à l'ODN contrôle. ....	63
Figure 38 : Densité mesurée de préproenképhaline dans le putamen médian de MA55. ....	64
Figure 39 : Densité mesurée de préproenképhaline dans le putamen latéral de MA55. ....	65
Figure 40 : Densité mesurée de préproenképhaline dans le noyau caudé de MA55. ....	65
Figure 41 : Densité mesurée d'ARNm de substance P dans le putamen médian de MA55. ....	66
Figure 42 : Densité mesurée d'ARNm de substance P dans le putamen latéral de MA55. ....	67
Figure 43 : Densité mesurée d'ARNm de substance P dans le noyau caudé de MA55. ....	67
Figure 44 : Utilisation préférentielle de la main au test de la règle sans pot pour MA35. ....	68
Figure 45 : Utilisation préférentielle de la main au test de la règle avec pots pour MA35. ....	69
Figure 46 : Vitesse d'exécution des membres antérieurs de MA55 mesurée avec le mMAP, avec tige en forme de point d'interrogation et carottes trouées. ....	70

Figure 47 : Hybridation de l'ARNm de la substance P sur une coupe frontale vue de face du cerveau de MA55 au niveau de la canule d'infusion de l'antisens (hémisphère droit) et de la canule d'infusion du missens (hémisphère gauche). .....	71
Figure 48 : Densité mesurée des récepteurs D2 dans le putamen médian de MA35 dans l'hémisphère traité à l'ODN antisens et dans l'hémisphère traité à l'ODN contrôle. ....	72
Figure 49 : Densité mesurée des récepteurs D2 dans le putamen latéral de MA35 dans l'hémisphère traité à l'ODN antisens et dans l'hémisphère traité à l'ODN contrôle. ....	72
Figure 50 : Densité mesurée des récepteurs D2 dans le noyau caudé de MA35 dans l'hémisphère traité à l'ODN antisens et dans l'hémisphère traité à l'ODN contrôle. ....	73
Figure 51 : Densité mesurée des récepteurs D1 dans le putamen médian de MA35 dans l'hémisphère traité à l'ODN antisens et dans l'hémisphère traité à l'ODN contrôle. ....	74
Figure 52 : Densité mesurée des récepteurs D1 dans le putamen latéral de MA35 dans l'hémisphère traité à l'ODN antisens et dans l'hémisphère traité à l'ODN contrôle. ....	74
Figure 53 : Densité mesurée des récepteurs D1 dans le noyau caudé de MA55 dans l'hémisphère traité à l'ODN antisens et dans l'hémisphère traité à l'ODN contrôle. ....	75
Figure 54 : Densité mesurée de préproenképhaline dans le putamen médian de MA35. ....	76
Figure 55 : Densité mesurée de préproenképhaline dans le putamen latéral de MA35. ....	76
Figure 56 : Densité mesurée de préproenképhaline dans le noyau caudé de MA35. ....	77
Figure 57 : Densité mesurée d'ARNm de substance P dans le putamen médian de MA35. ....	78
Figure 58 : Densité mesurée d'ARNm de substance P dans le putamen latéral de MA35. ....	79
Figure 59 : Densité mesurée d'ARNm de substance P dans le noyau caudé de MA35. ....	79
Figure 60 : Utilisation préférentielle de la main au test de la règle avec pots pour MA26. ....	80
Figure 61 : Vitesse d'exécution des membres antérieurs de MA26 mesurée avec le mMAP, avec tige en forme de point d'interrogation et carottes trouées. ....	81
Figure 62 : Utilisation préférentielle de la main au test de la règle avec pots pour HPI. ....	82
Figure 63 : Nombre de rotations contralatérales sous agonistes dopaminergiques pour HP2. ....	84
Figure 64 : Nombre total de mouvements sous apomorphine avant et après traitement avec l'ODN antisens (GA et PA) ou l'ODN contrôle (PM), GM étant exclue (dépression, automutilation). ....	85
Figure 65 : Nombre total de mouvements sous apomorphine avant et après traitement avec l'ODN antisens (GA et PA) ou l'ODN contrôle (PM), GM étant exclue (dépression, automutilation). ....	86

Figure 66 : Nombre total de mouvements sous quinpirole avant et après traitement avec l'ODN antisens (GA et PA) ou l'ODN contrôle (PM), GM étant exclue (dépression, automutilation). .....	87
Figure 67 : Densité mesurée des récepteurs D2 dans le putamen total bilatéral de PA et GA, traitées à l'ODN antisens, par rapport à la densité mesurée pour PM et GM, traitées à l'ODN contrôle.....	88
Figure 68 : Densité mesurée des récepteurs D2 dans le noyau caudé total bilatéral de PA et GA, traitées à l'ODN antisens, par rapport à la densité mesurée pour PM et GM, traitées à l'ODN contrôle.....	89
Figure 69 : Densité mesurée des DIR dans le putamen total bilatéral de PA et GA, traitées à l'ODN antisens, par rapport à la densité mesurée pour PM et GM, traitées à l'ODN contrôle.....	90
Figure 70 : Densité mesurée des DIR dans le noyau caudé total bilatéral de PA et GA, traitées à l'ODN antisens, par rapport à la densité mesurée pour PM et GM (ODN contrôle). .....	90
Figure 71 : Densité mesurée d'ARNm préproenképhaline dans le putamen total bilatéral de PA et GA, traitées à l'ODN antisens, par rapport à la densité mesurée pour PM et GM (ODN contrôle). .....	91
Figure 72 : Densité mesurée d'ARNm préproenképhaline dans le noyau caudé total bilatéral de PA et GA, traitées à l'ODN antisens, par rapport à la densité mesurée pour PM et GM (ODN contrôle). .....	92
Figure 73 : Densité mesurée d'ARNm substance P dans le putamen total bilatéral de PA et GA, traitées à l'ODN antisens, par rapport à la densité pour PM et GM (ODN contrôle). .....	93
Figure 74 : Densité mesurée d'ARNm substance P dans le noyau caudé total bilatéral de PA et GA, traitées à l'ODN antisens, par rapport à la densité pour PM et GM (ODN contrôle). .....	93

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Caractéristiques individuelles des macaques utilisés.....	25
Tableau 2 : Protocoles individuels d'infusion d'ODN antisens et contrôle chez les macaques.....	29
Tableau 3 : Résumé des observations comportementales pour chaque macaque.....	36

# CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

## 1.1 ANATOMIE DU MOUVEMENT VOLONTAIRE

La production du mouvement volontaire est régulée par l'interaction, via différents neurotransmetteurs, de plusieurs structures cérébrales corticales et sous-corticales. Parmi ces structures, citons le cortex, le thalamus moteur et les noyaux des ganglions de la base. Ces derniers noyaux forment un circuit qui traite l'information en provenance du cortex et la lui retransmettent via le thalamus moteur (Blandini *et al.*, 2000). Les principales composantes des ganglions de la base sont la substance noire pars compacta et pars reticulata, le striatum (une seule structure chez les rongeurs) formé du putamen et du noyau caudé ainsi que du nucleus accumbens (séparés ainsi chez les primates), le globus pallidus externe et interne (séparés ainsi chez le singe) et le noyau sous-thalamique.

La substance noire pars compacta forme, avec l'aire ventrale tegmentale, un centre dopaminergique mésencéphalique qui projette de façon massive au striatum et de façon plus discrète au globus pallidus (interne surtout mais externe aussi) ainsi qu'au noyau sous-thalamique, principalement par des fibres collatérales (Parent *et al.*, 1990; Prensa *et al.*, 2000; Prensa et Parent, 2001). La substance noire reçoit elle-même des projections GABAergiques du striatum et du globus pallidus, des projections glutamatergiques du cortex préfrontal et du noyau sous-thalamique, ainsi que des projections sérotoninergiques des noyaux dorsal et médian du raphé (Gerfen et Wilson, 1996; Hauber, 1998).

Le striatum, situé à la base du télencéphale, est la principale structure d'entrée du circuit des ganglions de la base, recevant en particulier des afférences glutamatergiques majeures en provenance du cortex (McGeorge et Faull, 1989; Wise *et al.*, 1996) et des afférences dopaminergiques importantes des neurones mésencéphaliques. Il reçoit aussi des afférences excitatrices de structures limbiques et des projections sérotoninergiques du noyau dorsal du raphé. Le striatum moteur est formé de deux structures homogènes au point de vue anatomique: le putamen et le noyau caudé. Ces deux structures sont formées à 95% de neurones épineux moyens (« medium spiny neurons ») GABAergiques et à 5% d'interneurones non-épineux contenant alternativement de l'acétylcholine, de la

somatostatine, de la NADPH diaphorase ou du GABA avec de la parvalbumine ou de la calrétinine (Kawaguchi *et al.*, 1995; Blandini *et al.*, 2000; Cicchetti *et al.*, 2000).

Bien que leur degré de ségrégation soit discuté (Parent *et al.*, 2000), les neurones de projection GABAergiques du striatum semblent pouvoir se diviser en deux populations distinctes: une population de neurones exprimant le récepteur D1 ainsi que les neuropeptides substance P et dynorphine, et une population de neurones exprimant le récepteur D2 et le neuropeptide enképhaline. La population exprimant les récepteurs D1 projetterait principalement à la substance noire pars reticulata et au globus pallidus interne et serait stimulée par la liaison de la dopamine, alors que la population exprimant les récepteurs D2 projetterait de façon préférentielle au globus pallidus externe et serait inhibée par la liaison de la dopamine (voir récepteurs dopaminergiques et neuropeptides, p. 15), ces projections faisant respectivement partie de la voie directe (D1) et de la voie indirecte (D2) de sortie du striatum (Flaherty et Graybiel, 1993; Blandini *et al.*, 2000; Le Moine et Bloch, 1995; Gerfen *et al.*, 1995). Ceci demeure toutefois une simplification de la réalité puisqu'un certain nombre de collatérales existent, par exemple des neurones de la voie directe envoyant des collatérales vers le globus pallidus externe, des neurones de la voie indirecte envoyant des collatérales vers la substance noire, et même des neurones striataux envoyant des collatérales vers le striatum lui-même (Parent *et al.*, 2000, Wu *et al.*, 2000). Le modèle actuel des voies directe et indirecte reste toutefois fort utile pour prévoir l'effet d'une intervention et décrire les liens principaux entre les structures du circuit des ganglions de la base (voir figure 1).

Le globus pallidus, situé en position médiale par rapport au putamen, se divise en deux parties fonctionnellement distinctes bien que toutes deux GABAergiques, soit le globus pallidus externe (GPe) et le globus pallidus interne (GPi). Le GPe constitue la deuxième structure de la voie indirecte et reçoit donc un apport striatal important. Il reçoit également des fibres dopaminergiques en provenance de la substance noire pars compacta tel que mentionné précédemment. Le GPe innerve principalement le noyau sous-thalamique et le globus pallidus interne, ainsi que la substance noire. Il constitue un centre important d'intégration et de relais entre les structures d'entrée et de sortie du circuit. De son côté, le globus pallidus interne constitue, avec la substance noire pars reticulata qui est également

GABAergique, la principale structure de sortie du circuit des ganglions de la base. En effet, ces deux structures envoient des projections inhibitrices au thalamus moteur qui, à son tour, projette de façon diffuse au cortex moteur. De façon grossière, plus l'inhibition par le GPi et la SNr sur le thalamus est faible, plus le mouvement est facilité. La balance entre les afférences GABAergiques, en provenance de la voie directe (striatum) et de la voie indirecte (GPe), et les afférences glutamatergiques, en provenance du noyau sous-thalamique et du cortex frontal (dans une moindre mesure), détermine donc l'activité des structures de sortie du circuit des ganglions de la base et la facilitation ou non du mouvement (Parent et Hazrati, 1995a et b; Blandini *et al.*, 2000).

Le noyau sous-thalamique, troisième structure de la voie indirecte, n'est pas limité à un rôle de relais; tout comme le GPe, il constitue un centre intégrateur critique entre l'entrée et la sortie du circuit des ganglions de la base. Ce noyau reçoit une innervation majeure du GPe (GABA) et des projections de nombreuses autres structures, dont le cortex sensorimoteur (glutamate) et la substance noire pars compacta. Par ailleurs, cette structure glutamatergique envoie de nombreuses projections excitatrices au GPi et à la SNr ainsi qu'au GPe, en plus de projeter dans une moindre mesure à quelques autres structures, dont la substance noire pars compacta (Parent et Hazrati, 1995a et b; Gerfen et Wilson, 1996; Blandini *et al.*, 2000).

Des modèles de l'organisation fonctionnelle des ganglions de la base ont été proposés et raffinés durant les dernières années afin de mieux prédire et comprendre les effets d'un agent pharmacologique, d'une lésion ou de toute autre intervention au niveau du circuit des ganglions de la base. Le modèle ici proposé, bien que fort simplifié, est encore très utile aux chercheurs. Entre autres, il permet de visualiser l'effet de la dopamine sur le mouvement. En se liant aux récepteurs D1 du striatum, la dopamine cause une excitation des neurones GABAergiques de la voie directe, qui inhibent alors davantage les structures de sortie. En se liant aux récepteurs D2 du striatum, la dopamine cause une inhibition des neurones GABAergiques de la voie indirecte; le GPe se trouve alors désinhibé et augmente sa libération de GABA au noyau sous-thalamique, qui stimule alors moins les structures de sortie. Les voies directe et indirecte, stimulées par la dopamine, agissent donc de concert pour réduire l'influence inhibitrice des structures de sortie sur le thalamus. Le thalamus

excite alors davantage le cortex, ce qui facilite le mouvement (figure 1; Steiner et Gerfen, 1998; Blandini *et al.*, 2000).

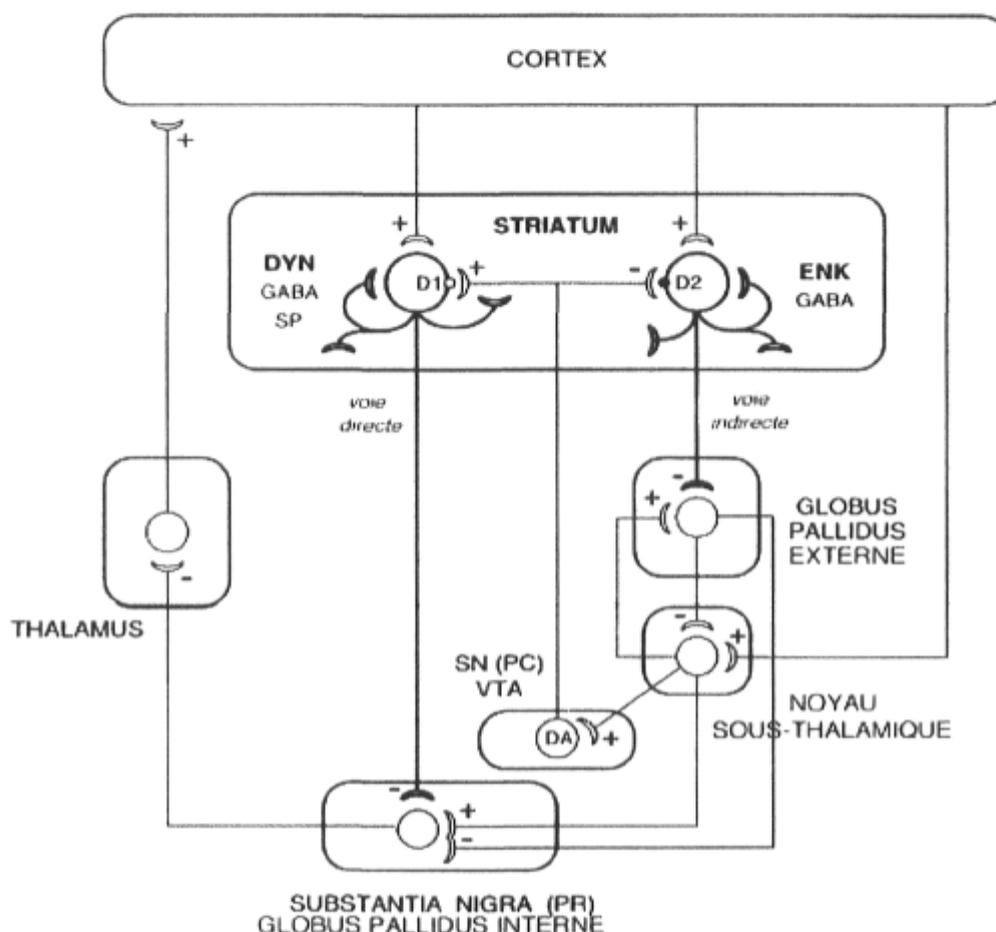


Figure 1 : Représentation schématique de l'organisation fonctionnelle du circuit des ganglions de la base (adapté de Steiner et Gerfen, 1998 et de Blandini *et al.*, 2000). DYN : dynorphine; ENK : enképhaline; SP : substance P; SN (PC) : substance noire pars compacta; (PR) : pars reticulata; VTA : aire ventrale tegmentale.

## 1.2 RÉCEPTEURS DOPAMINERGIQUES ET NEUROPEPTIDES

Vu les projections de la substance noire compacte vers le striatum et les autres structures extrastriatales des ganglions de la base, la dopamine est un neurotransmetteur impliqué dans l'activité locomotrice via son interaction avec les récepteurs dopaminergiques. Il existe deux familles de récepteurs dopaminergiques : la famille des

récepteurs D1 et la famille des récepteurs D2. La famille D1 comprend les récepteurs à dopamine D1 et D5, dont le gène ne contient pas d'introns, et la famille D2 comprend les récepteurs à dopamine D2, D3 et D4, dont le gène contient des introns (Schwartz *et al.*, 1993; Missale *et al.*, 1998; Sealfon et Olanow, 2000; Vallone *et al.*, 2000). Dépendamment du type de récepteur exprimé par le neurone cible des ganglions de la base, la dopamine peut provoquer l'excitation ou l'inhibition de la cellule touchée. En effet, les récepteurs de la famille D1 sont couplés positivement à l'adénylate cyclase via des protéines G( $\alpha$ )olf et Gs et leur stimulation a un potentiel excitateur. Les récepteurs de la famille D2 sont couplés négativement à l'adénylate cyclase via des protéines G inhibitrices et causent une hyperpolarisation de la cellule par l'inhibition de canaux calciques voltage-dépendants et l'activation de canaux à potassium. Leur stimulation a un potentiel inhibiteur (Missale *et al.*, 1998; Sealfon et Olanow, 2000; Vallone *et al.*, 2000; Hervé *et al.*, 2001). Plus précisément pour les représentants les plus répandus de chaque famille, la stimulation du récepteur D1 déclenche l'activation de la PKA et éventuellement la transcription de plusieurs gènes à expression immédiate et précoce (IEG, famille des Fos). La stimulation du récepteur D2 agit de façon synergique avec la stimulation D1 pour augmenter la transcription d'IEGs dans les neurones D1, fournissant ainsi une explication possible à la communication entre les deux voies. La liaison d'antagonistes D2 cause par contre une augmentation des IEGs dans les neurones D2. Les conséquences de la stimulation des autres sous-types de récepteurs dopaminergiques sont moins bien connues (Gerfen *et al.*, 1995; Steiner et Gerfen, 1999)

Au niveau du striatum, les récepteurs à dopamine D1 et les récepteurs à dopamine D2 sont exprimés en quantité beaucoup plus importante que les autres types, et ils semblent être fonctionnellement plus importants. La structure comportant le plus grand nombre de récepteurs dopaminergiques dans le circuit des ganglions de la base est le striatum. Les récepteurs D1 et D2 y sont exprimés par deux populations distinctes de neurones, bien qu'une colocalisation de l'un avec une quantité plus faible d'un sous-type de récepteur de l'autre sous-famille soit possible, comme dans le cas des récepteurs D1 colocalisés avec des récepteurs D3 ou D4. Cette possible colocalisation avec des sous-types de l'autre classe de récepteurs pourrait fournir une base cellulaire et moléculaire pour les interactions connues entre la voie directe et la voie indirecte (Surmeier *et al.*, 1996). Les neurones striataux

exprimant le récepteur D2 présentent également le peptide enképhaline, lequel est sous la régulation inhibitrice des D2. En effet, un blocage D2, une dénervation dopaminergique ou un knock-out D2 cause une augmentation de ce neuropeptide (Le Moine et Bloch, 1995; Baik *et al.*, 1995; Missale *et al.*, 1998; Steiner et Gerfen, 1998 et 1999; Jung *et al.*, 1999; Morissette *et al.*, 1999; Murer *et al.*, 2000). Par ailleurs, les neurones striataux exprimant les récepteurs D1 expriment également les neuropeptides substance P et dynorphine, la dynorphine en particulier étant augmentée par la stimulation D1 (Le Moine et Bloch, 1995; Missale *et al.*, 1998; Steiner et Gerfen, 1998). Des récepteurs pour ces neuropeptides étant présents sur les neurones striataux eux-mêmes et transmettant un signal inhibiteur, leur augmentation pourrait servir d'adaptation: dans le cas des D2, pour récupérer les fonctions motrices suite à une dénervation dopaminergique, et dans le cas des D1, comme mécanisme de rétroaction pour moduler l'augmentation de la transcription des gènes à expression immédiate précoce suite à une stimulation dopaminergique (Steiner et Gerfen, 1998).

Le récepteur D2 se distingue des autres récepteurs par certaines caractéristiques et une distribution qui lui est propre. Le récepteur D2 est le seul récepteur dopaminergique possédant deux isoformes fonctionnelles: le D2 court (D2S) et le D2 long (D2L). Ces deux isoformes sont obtenues par épissage alternatif de l'ARNm et diffèrent entre elles par la présence de 29 acides aminés supplémentaires au niveau de la troisième boucle intracytoplasmique de la forme longue, laquelle prédomine par ailleurs dans le cerveau (voir figure 2; Dal Toso *et al.*, 1989; Giros *et al.*, 1989; Missale *et al.*, 1998; Sealfon et Olanow, 2000; Vallone *et al.*, 2000). Pour ce qui est de sa distribution, le récepteur D2 est le seul récepteur dopaminergique à être retrouvé à la fois en position pré et en postsynaptique au cerveau, l'ARNm de la forme présynaptique étant surtout exprimé dans la substance noire pars compacta et l'aire ventrale tegmentale. L'ARNm de la forme postsynaptique est quant à lui exprimé principalement dans le striatum moteur tel que mentionné plus haut, dans le nucleus accumbens et dans le tubercule olfactif, tout comme celui des récepteurs D1 (Meador-Woodruff *et al.*, 1991; Missale *et al.*, 1998; Sealfon et Olanow, 2000; Vallone *et al.*, 2000).

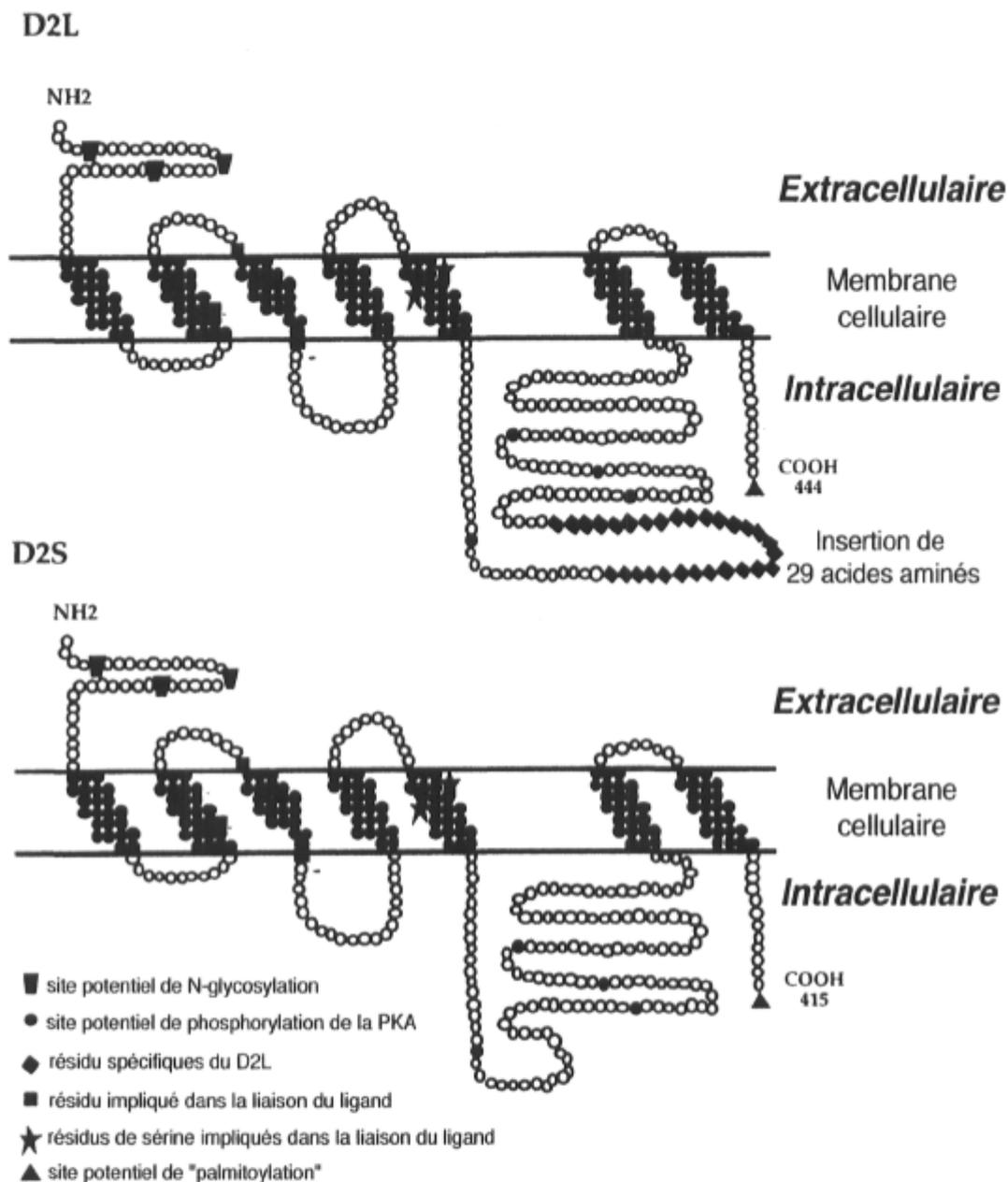


Figure 2 : Schéma représentant la structure des deux isoformes du récepteur D2 (tiré de Vallone *et al.*, 2000).

Dans le noyau caudé et le putamen des primates, là où l'expression de D2 est la plus forte, les récepteurs D1 sont exprimés à des niveaux similaires, avec une asymétrie possible entre l'hémisphère gauche et l'hémisphère droit chez les animaux qui ne sont pas âgés (Beckstead *et al.*, 1988; Meador-Woodruff *et al.*, 1991; Hall *et al.*, 1994; Giardino, 1996).

Dans le circuit des ganglions de la base, on retrouve également une expression importante du D2 mais non pas du D1 par les neurones du globus pallidus externe, chez qui l'on a retrouvé de l'ARNm D2, prouvant ainsi la présence de D2 postsynaptiques au niveau du GPe en plus des récepteurs situés sur les projections striatales (Palacios *et al.*, 1988; Marshall *et al.*, 2001; Galban *et al.*, 2001).

Le noyau sous-thalamique exprime aussi à des niveaux moindres le récepteur D2, ainsi que le récepteur D1 et son ARNm. Le GPi et la substance noire réticulée semblent exprimer plutôt les D1, mais ces récepteurs seraient en fait situés sur les neurones striaux de projection. En dehors du circuit toutefois, des niveaux élevés de D1 sont observés au cortex et aux structures limbiques, le D2 étant en moins forte concentration et principalement exprimé dans l'hippocampe, le thalamus et le cortex. La distribution des récepteurs dopaminergiques en général est par ailleurs très similaire entre les différentes espèces de mammifères (Richfield *et al.*, 1987; Beckstead *et al.*, 1988; Palacios *et al.*, 1988; Camps, 1990; Missale *et al.*, 1998; Okubo *et al.*, 1999; Sealfon et Olanow, 2000; Marshall *et al.*, 2001; Galvan *et al.*, 2001).

### **1.3 MALADIE DE PARKINSON**

L'importance de la dopamine et de ses récepteurs dans l'activité locomotrice est illustrée par les déficits moteurs sévères observés chez les patients souffrant de la maladie de Parkinson. En effet, la dégénérescence pathognomonique avec inclusions cytoplasmiques (corps de Lewy) des neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta (ainsi que, de façon moindre, des neurones d'autres centres nerveux, voir figure 3) résulte en des altérations caractéristiques de la capacité d'exécution des mouvements. Le tableau clinique comprend, à des degrés divers, l'akinésie (difficulté à initier des mouvements), la bradykinésie (lenteur dans l'exécution des mouvements), la rigidité (en roue dentée), le tremblement (de repos, 6-8 Hz) et les anomalies posturales.

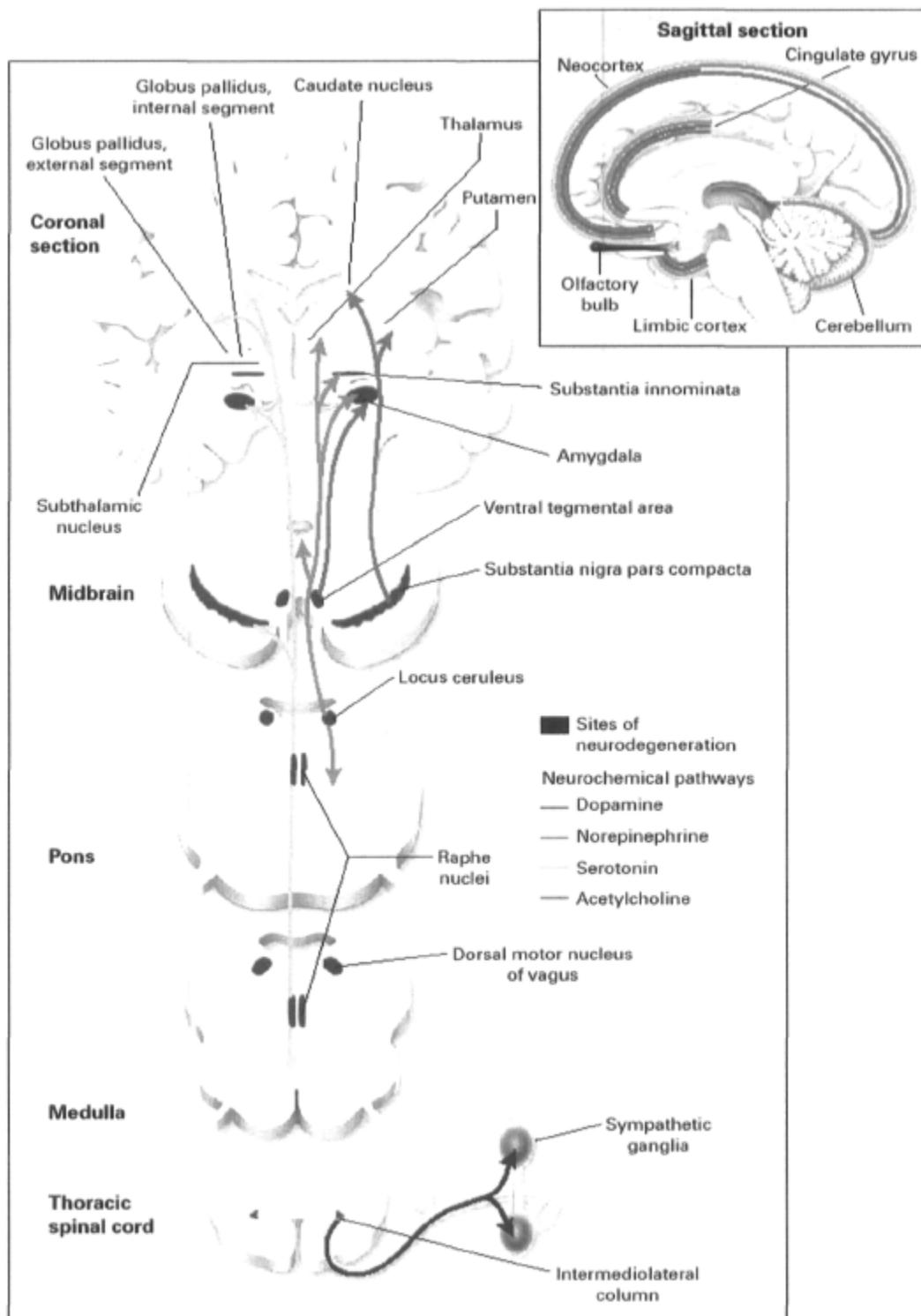


Figure 3 : Les sites de neurodégénérescence et les voies neurochimiques impliquées dans la maladie de Parkinson (tiré de Lang et Lozano, 1998a).

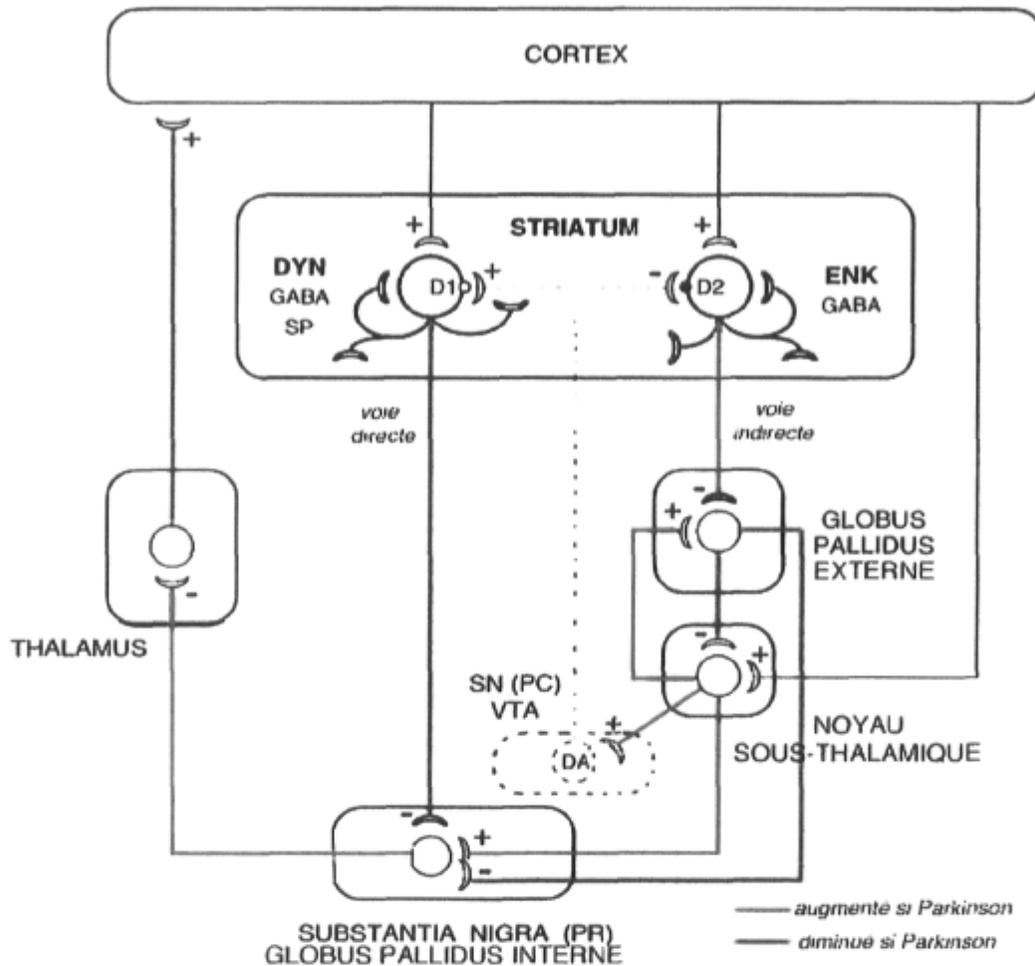


Figure 4 : Représentation schématique des changements survenant dans l'organisation fonctionnelle du circuit des ganglions de la base dans la maladie de Parkinson (adapté de Steiner et Gerfen, 1998 et de Blandini *et al.*, 2000).

Les modèles animaux de la maladie de Parkinson, créés chez le singe par l'administration de la neurotoxine 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) qui détruit sélectivement les cellules de la substance noire pars compacta, présentent les mêmes signes cliniques que les patients atteints de Parkinson idiopathique sauf pour le tremblement. Ils constituent donc un bon modèle expérimental et confirment l'implication des neurones dopaminergiques innervant les ganglions de la base dans la production du mouvement. Il semblerait que les anomalies motrices observées résultent principalement du déséquilibre entre les voies directes et indirectes suite à la dénervation dopaminergique, la voie directe inhibant alors moins les structures de sortie et la voie indirecte les stimulant

plus étant donné l'inhibition moindre du noyau sous-thalamique par le GPe suite à l'hyperactivité des neurones GABAergiques striato-pallidiaux. Ceci résulterait en une plus grande inhibition du thalamus moteur par les structures de sortie du circuit des ganglions de la base (GPi et SNr), ce qui freinerait l'activité de l'aire motrice supplémentaire au cortex (figure 4; DeLong, 1990; Lang et Lozano, 1998a; Bezard *et al.*, 2001).

La maladie de Parkinson, dont l'origine reste encore nébuleuse, est une maladie neurodégénérative répandue à travers le monde, bien qu'on rapporte une incidence plus faible chez les Africains et les Asiatiques que chez les Caucasiens. La maladie affecte tant les hommes que les femmes, et sa prévalence augmente exponentiellement avec l'âge, étant de 0,3 % pour la population générale et de 3 % chez les plus de 65 ans. L'âge moyen au début de la maladie clinique se situe entre 54 et 63 ans, avec une forme dite à début précoce où les patients développent les premiers symptômes avant l'âge de 40 ans. Lors de l'apparition des premiers symptômes, on estime que la perte neuronale dans la substance noire pars compacta atteint déjà près de 60-70 % (Lang et Lozano, 1998a). L'étiologie de la maladie de Parkinson est inconnue dans la majorité des cas, bien que 5-10 % des patients présentent une forme familiale à transmission autosomale dominante. Par ailleurs, une certaine composante génétique pourrait également jouer un rôle important dans les maladies à début précoce mais pas dans le Parkinson sporadique. L'exposition à un certain nombre de toxines environnementales jouerait aussi un rôle chez certains malades, et l'implication dans la pathogenèse du stress oxydatif et de d'autres perturbations biochimiques neuronales (dysfonctionnement mitochondrial, baisse de facteurs neurotrophiques, etc.) est à l'étude (Lang et Lozano, 1998a; Olanow et Tatton, 1999; Blandini *et al.*, 2000).

Malgré son potentiel d'induction d'effets secondaires moteurs, le traitement actuel de la maladie de Parkinson repose encore principalement sur la thérapie à la lévodopa (L-DOPA) per os combinée à un inhibiteur périphérique de la dopa décarboxylase. Il s'agit d'un traitement par le dernier précurseur de la dopamine à passer la barrière hémato-encéphalique. La lévodopa exogène est capturée dans les neurones dopaminergiques et les autres neurones et capillaires environnants et transformée en dopamine, avant d'être relâchée dans la synapse. Ce traitement produit habituellement un très bon effet

antiparkinsonien initial (« honeymoon period »); après quelques années (environ 4-6) de traitement toutefois, des fluctuations motrices empirant avec le temps comme le « wearing-off » (raccourcissement de la durée de l'effet anti-parkinsonien) et les fluctuations « on-off » (passage soudain d'un état de mobilité dû à la L-DOPA à un état d'immobilité dû à une perte de l'effet bénéfique de la L-DOPA) apparaissent chez plusieurs patients. Les dyskinésies, mouvements involontaires constituant les complications motrices les plus débilantes et les plus fréquentes du traitement à la L-DOPA, apparaissent chez plus de 40% des patients traités en moins de 5 ans. Les dyskinésies peuvent également apparaître suite au traitement avec des agonistes dopaminergiques, particulièrement ceux à demi-vie courte, bien que certains à demi-vie plus longue soient actuellement prônés comme traitement de première ligne pour retarder l'apparition des complications motrices (Morissette *et al.*, 1997; Bédard *et al.*, 1999). Les principaux facteurs de risque cliniques pour le développement de dyskinésies sont la sévérité de la maladie de Parkinson et le dosage de lévodopa (Blanchet *et al.*, 1996; Lang et Lozano, 1998b; Bédard *et al.*, 1999; Durif, 1999; Baas, 2000; Calon *et al.*, 2000; Rascol *et al.*, 2000; Ahlskog et Muentzer, 2001; Bezard *et al.*, 2001).

#### **1.4 DYSKINÉSIES INDUITES PAR LA L-DOPA**

Les manifestations dyskinétiques peuvent être de type choréique (les plus typiques) ou de type dystonique, et elles surviennent habituellement au pic de concentration de la L-DOPA au cerveau (et parfois lors des changements de concentration de DOPA ou lorsque la concentration de dopamine est basse). Contrairement aux tics, ces mouvements involontaires sont accentués lorsque l'attention est fixée sur une tâche mentale ou motrice. On attribue ces mouvements involontaires à un phénomène d'apprentissage pathologique dû à la dénervation dopaminergique et à la stimulation pulsatile des récepteurs dopaminergiques des ganglions de la base (Lang et Lozano, 1998b; Bédard *et al.*, 1999; Durif *et al.*, 1999; Calon *et al.*, 2000; Bezard *et al.*, 2001). Au niveau électrophysiologique, l'effet antiparkinsonien est associé à une baisse de la fréquence de décharge du GPi, alors que les dyskinésies sont associées à un changement dans le patron de décharge, soulignant l'apprentissage pathologique dans le circuit des ganglions de la base (Boraud *et al.*, 2001).

Bien que la cause des fluctuations motrices induites par la DOPA ne soit pas connue, plusieurs hypothèses basées sur la démonstration de diverses anomalies biochimiques ont été avancées pour expliquer la pathogenèse des dyskinésies. Tout d'abord, bien qu'on observe des changements dans la densité des récepteurs dopaminergiques après la dénervation, et suite au traitement à la L-DOPA, aucun n'est corrélé de façon évidente avec l'apparition des dyskinésies. Mentionnons tout de même l'augmentation importante du nombre de récepteurs D3 au niveau du striatum chez le rat suite à la dénervation et au traitement, dénotant une implication possible dans le mécanisme des dyskinésies (Langston *et al.*, 2000; Bezard *et al.*, 2001). Chez le primate non-humain toutefois, une telle induction ne semble pas aussi évidente (Bédard *et al.*, 1999). Également, on peut observer une internalisation accentuée des récepteurs D1 sous stimulation aiguë par des agonistes dopaminergiques. De plus, on observe une hypersensibilité de la cascade de signalisation du récepteur D1 suite au traitement chronique avec la L-DOPA, probablement due à une augmentation du couplage avec les protéines G stimulantes, ainsi qu'une augmentation des niveaux de prodynorphine par rapport aux niveaux chez l'animal lésé, laissant supposer une implication importante de la voie directe dans la genèse des dyskinésies (Marcotte *et al.*, 1994; Bédard *et al.*, 1999; Calon *et al.*, 2000; Bezard *et al.*, 2001).

Il a été par ailleurs démontré que les niveaux striataux de préproenképhaline demeurent élevés suite au traitement chronique à la L-DOPA, et ce seulement chez les singes et les humains présentant des dyskinésies (Morissette *et al.*, 1997; Bédard *et al.*, 1999; Calon *et al.*, 2002). Cette observation, ajoutée à celle de l'augmentation de la transmission opioïdérique dans le circuit des ganglions de la base chez les patients dyskinétiques et pas chez les patients traités à la DOPA mais non dyskinétiques (Piccini *et al.*, 1997), permet de penser qu'il existe un lien causal entre l'augmentation de l'enképhaline et les dyskinésies. Par exemple, l'enképhaline en excès pourrait se lier aux récepteurs delta et mu exprimés par les neurones striato-pallidaux, causant ainsi une inhibition excessive du neurone et facilitant le mouvement de façon anormale (Calon *et al.*, 2000). Enfin, une régulation à la hausse des récepteurs GABA<sub>A</sub> du GPi ayant été démontrée, et ce seulement chez les singes présentant des dyskinésies, il est possible qu'un tel changement contribue à la modification de la sensibilité du GPi au GABA. Puisque l'enképhaline peut modifier la libération du GABA, son augmentation pourrait être

responsable du changement dans l'expression du récepteur GABAergique (Calon *et al.*, 1995; Bédard *et al.*, 1999). Cette augmentation de la transcription de l'enképhaline pourrait découler d'une stimulation glutamatergique anormale étant donné la perte de la modulation dopaminergique normale. Le glutamate pouvant induire des changements à long terme dans la cellule, particulièrement au niveau de la transcription de plusieurs gènes via l'induction d'antigènes Fos et la formation de complexes AP-1, la régulation anormale de son action au striatum en l'absence de dopamine pourrait fournir une base moléculaire à l'apprentissage moteur pathologique dans la dyskinésie, d'autant plus que les antagonistes glutamatergiques permettent une réduction importante des dyskinésies. Il semblerait donc que les deux voies, directes et indirectes, soient impliquées dans l'apparition des dyskinésies secondaires à la L-DOPA (voir figure 5; Hadj Tahar *et al.*, 2004; Calon *et al.*, 2000; Langston *et al.*, 2000; Bezard *et al.*, 2001).

Les données incertaines concernant le rôle des récepteurs dopaminergiques dans la pathogenèse et le maintien des dyskinésies ainsi que les changements importants survenant dans les neurones qui les expriment chez les sujets dyskinétiques laissent croire qu'une meilleure compréhension du rôle exact de chaque récepteur dopaminergique, et en particulier celui du récepteur D2 vu l'excellente corrélation entre l'augmentation de la préproenképhaline au striatum moteur et la présence de dyskinésies, permettrait de mieux comprendre la physiologie et la pathologie des ganglions de la base et d'améliorer le traitement de l'état parkinsonien et de l'état dyskinétique induit par le traitement chronique à la L-DOPA.

### **1.5 RÔLE DE D2 DANS LE CIRCUIT DES GANGLIONS DE LA BASE**

Des études impliquant des rongeurs et des singes ont rapporté une activité locomotrice atténuée à de faibles doses d'agonistes D2 (activation présynaptique) et une augmentation de l'activité locomotrice et des stéréotypies (potentialisées par l'ajout d'agoniste D1) à des doses plus fortes d'agonistes D2 (activation postsynaptique). Chez les animaux hémiparkinsoniens, les agonistes D2 comme le quinpirole causent un comportement rotatoire contralatéral à la lésion. Au contraire, l'infusion d'antagonistes D2 cause une baisse de l'activité locomotrice spontanée et inhibe les stéréotypies ou le

« circling » (comportement rotatoire) induits par le quinpirole et le « grooming » (toilettage) induit par l'apomorphine. De plus, les antagonistes D2 génèrent de la catalepsie, qui se caractérise par le maintien d'une position anormale durant un certain temps (Gershanik *et al.*, 1983; Loschmann *et al.*, 1991; Josselyn *et al.*, 1997; Missale *et al.*, 1998; Vallone *et al.*, 2000).

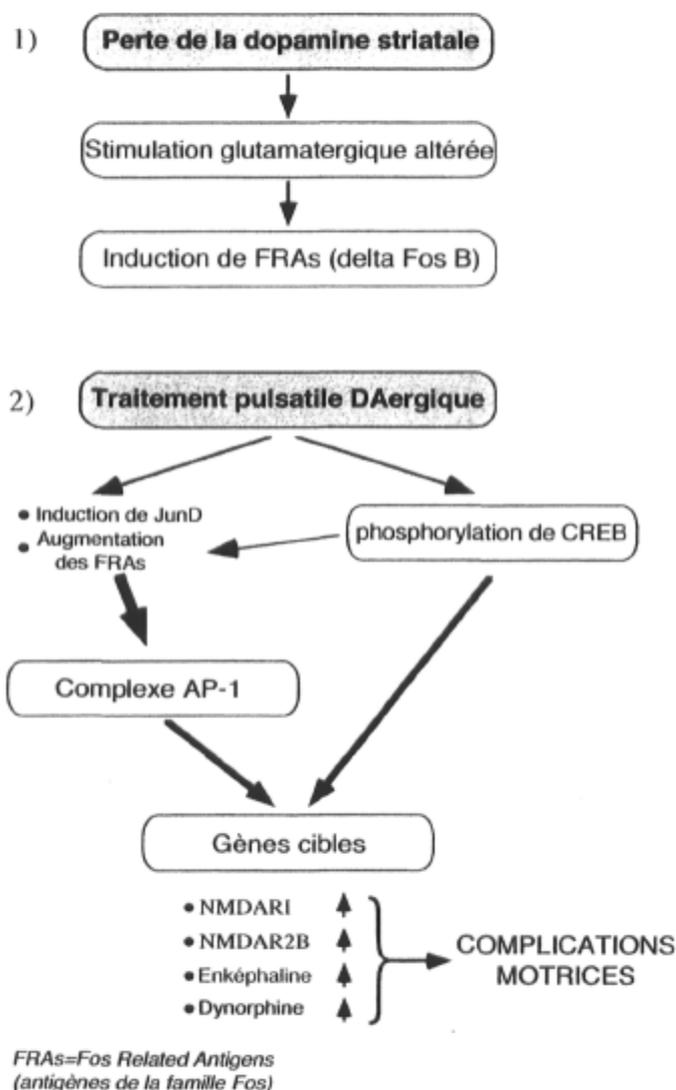


Figure 5 : Séquence possible des événements moléculaires survenant dans le striatum et menant à l'apparition de dyskinésies induites par la L-DOPA chez le patient parkinsonien (adapté de Bédard *et al.*, 1999).

L'approche génétique pour déterminer le rôle exact du récepteur D2 a donné lieu à des modèles de rongeurs D2 déficients (« knock-out »). Ceux-ci présentent, selon toutes les études, une baisse de l'initiation du mouvement et de l'activité locomotrice ainsi qu'une suppression du comportement de « rearing » (se dresser sur les pattes arrière); toutefois, ces déficiences semblent moins prononcées dans des conditions moins stressantes. De plus, ces animaux ne présentent plus une activité locomotrice augmentée sous quinpirole (agoniste D2/D3). Par ailleurs, dépendamment des études, on observe une posture écrasée ou normale et une vitesse d'exécution ralentie ou normale, ces différences pouvant être attribuables à l'influence du bagage génétique plutôt qu'au knock-out lui-même. Il est intéressant de noter que dans tous les modèles, les animaux hétérozygotes exhibent un comportement locomoteur à mi-chemin entre celui des rongeurs knockout et celui des rongeurs de type sauvage, semblant suggérer que pratiquement tous les D2 sont essentiels à une motricité normale (Baik *et al.*, 1995; Kelly *et al.*, 1998; Jung *et al.*, 1999; Sibley, 1999; Clifford *et al.*, 2000; Glickstein et Schmauss, 2001). Bien que les résultats mentionnés ci-haut soient extrêmement utiles pour une meilleure compréhension du rôle du récepteur D2 dans le mouvement, ils doivent être interprétés prudemment. En effet, l'approche pharmacologique manque de sélectivité pour les sous-types de récepteurs dopaminergiques alors que l'approche du knockout génétique peut induire des changements compensatoires liés à l'absence du gène ciblé durant l'embryogenèse et subir l'influence de la variabilité du support génétique entre souches de rongeurs d'une même espèce.

## 1.6 LA STRATÉGIE ANTISENS

La stratégie antisens consiste en une séquence d'acides nucléiques dirigée contre une séquence cible dans la cellule et dont la liaison avec la séquence cible freine la synthèse de la protéine visée. Elle constitue une approche beaucoup plus sélective pour la caractérisation d'un récepteur spécifique que l'approche pharmacologique, et ce sans induire de régulation à la hausse ou de changements moléculaires compensatoires importants comme dans l'approche knockout. L'antisens est le plus souvent composé d'une séquence d'oligodésoxynucléotides (ODN) complémentaire à une séquence-clé de l'ARNm de la protéine cible; l'hybridation de l'antisens (ADN) avec la séquence ciblée (ARN) stoppe la traduction de l'ARNm en protéines. Les mécanismes exacts par lesquels

l'antisens bloque la traduction ne sont pas clairement identifiés, mais ils pourraient impliquer une dégradation augmentée ou encore une entrave physique au passage dans le ribosome. Entre autres, il semblerait que les RNAses H dégradent spécifiquement et avec grande avidité l'ARN des duplex ADN-ARN formés par l'hybridation de l'ODN antisens avec l'ARNm. La plupart des ODN antisens efficaces visant l'ARNm de la protéine ciblée dans la région du codon d'initiation, cela laisse supposer une interférence avec la traduction de l'ARN. D'autres approches avec les antisens sont possibles, par exemple un antisens créé pour former un triplex avec l'ADN double brin, bloquant ainsi la transcription, ou encore un antisens interférant avec l'épissage (voir figure 6; Weiss *et al.*, 1997a; Crooke, 2000; Myers et Dean, 2000).

La longueur idéale de la séquence de nucléotides composant l'antisens est déterminée à la fois par la capacité à pénétrer dans la cellule, la sélectivité et la capacité à inhiber l'ARNm. Les oligonucléotides formés d'environ 18-20 nucléotides ont été reconnus comme ceux répondant le mieux à l'ensemble de ces critères. En effet, cette longueur est suffisante pour assurer la spécificité et l'affinité nécessaires. Par ailleurs, elle n'est pas assez grande pour interférer avec la pénétration cellulaire, pour avoir de fortes probabilités d'inclure d'autres sites d'hybridation d'ARNm et déclencher un clivage non désiré par la RNase H ou encore pour augmenter les risques d'interaction non spécifique des ODN avec certaines protéines notamment. Il faut de plus s'assurer de la spécificité de la séquence choisie en vérifiant qu'elle n'existe pas dans l'ARNm codant pour une autre protéine (Weiss *et al.*, 1997a; Stein, 1998; Myers et Dean, 2000).

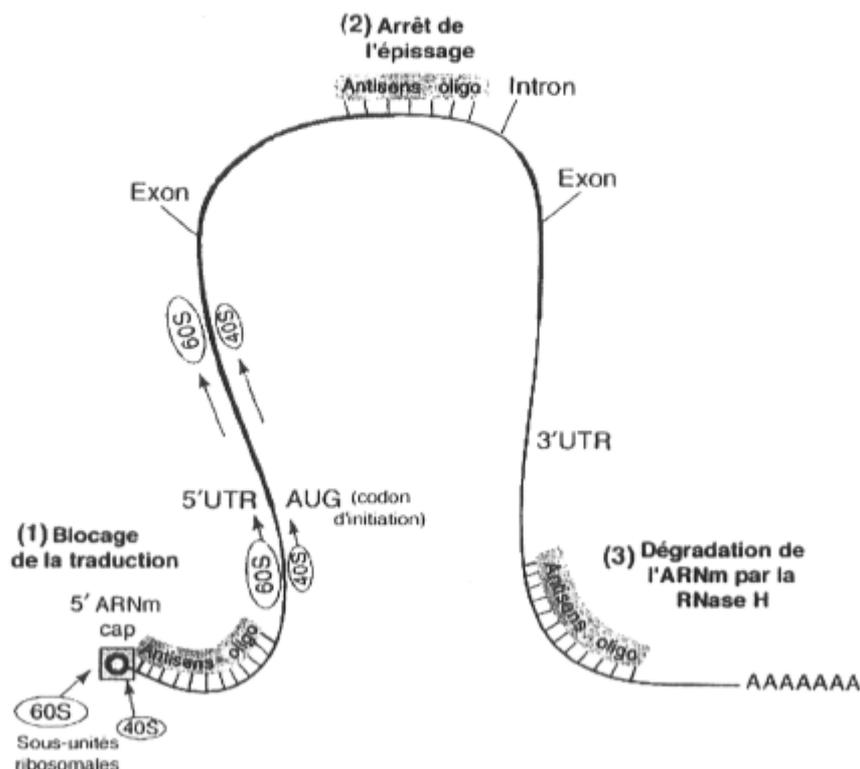


Figure 6 : Mécanismes par lesquels les oligonucléotides antisens peuvent interférer avec la synthèse des protéines: (1) blocage stérique de l'attachement des sous-unités ribosomales à l'ARNm au site 5'; (2) interférence avec l'épissage de l'ARNm par la liaison de l'antisens au site d'épissage donneur ou accepteur; (3) dégradation par la RNase H de l'ARNm hybridé. Cela peut survenir à n'importe quel endroit de l'ARNm où une molécule d'antisens se lie avec assez d'affinité, incluant le codon d'initiation de la traduction, les exons ou les introns, etc. (adapté de Myers et Dean, 2000).

Les ODN non-modifiés étant facilement dégradés par les endo- et exonucléases (demi-vie de quelques minutes tout au plus) et étant donc peu efficaces, plusieurs types de modifications ont été proposées pour ralentir et atténuer leur dégradation (Agrawal, 1999). Des modifications du squelette phosphodiester de l'ODN ont été tentées, les plus communes consistant à l'incorporation d'atomes de soufre à la place d'un des atomes d'oxygène de la liaison phosphodiester (ODN phosphorothioates). Les ODN antisens complètement modifiés en phosphorothioates offrent une meilleure stabilité et une meilleure efficacité que les phosphodiesters non-modifiés, mais ils présentent une toxicité cellulaire plus importante. Différentes expérimentations semblent démontrer que les meilleurs ODN antisens modifiés sont les phosphorothioates « end-capped » (coiffés), pour

lesquels seules la première et la dernière base sont modifiées en phosphorothioates. Cette modification permet d'obtenir un antisens efficace tout en évitant une toxicité trop élevée, et constitue donc présentement la procédure de choix. Il est toutefois important de toujours se servir également d'un ODN contrôle « missens » (faux-sens) ou « scrambled » (brouillé) avec répartition aléatoire des bases afin de vérifier la spécificité de l'effet de l'antisens (Hebb et Robertson, 1997; Weiss *et al.*, 1997a; Broberger *et al.*, 2000).

Les ODN antisens administrés de façon systémique ne passent qu'en faible quantité la barrière hémato-encéphalique. Par conséquent, lorsque utilisés pour cibler une protéine exprimée dans l'encéphale, ils doivent être administrés en infusion dans le liquide céphalorachidien ou encore directement dans la structure visée par le biais d'une canule, cette dernière méthode ayant le désavantage de créer une lésion mais ayant l'avantage de permettre la détermination du rôle d'une protéine particulière à l'intérieur d'une structure spécifique. Les deux méthodes permettent une bonne pénétration cellulaire et nucléaire de l'antisens (probablement par endocytose), qui diffuse largement dans les tissus cérébraux dans le cas de l'injection intracérébroventriculaire (ICV) et dans la structure visée et les structures environnantes dans le cas de l'injection intracérébrale. Par ailleurs, chaque type d'administration peut se faire de façon ponctuelle à l'aide de canules guides ou encore de façon continue à l'aide de minipompes osmotiques.

Les ODN injectés de façon ponctuelle sont stables pour au moins 24 h s'ils sont complètement modifiés en phosphorothioates, et la proportion de cellules contenant de l'antisens augmente avec la répétition des injections. Le marquage nucléaire, dans le striatum par exemple, semble être particulièrement fort dans le cas de l'infusion continue intracérébrale, et la diffusion des ODN couvre le striatum en entier chez les rongeurs (Zhang *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 1997a; Sibley, 1999; Broberger *et al.*, 2000; Myers et Dean, 2000). Une autre stratégie utilisée récemment et ayant l'avantage de permettre une expression de l'antisens à plus long terme sans laisser d'aiguille en place est l'injection intracérébrale d'un vecteur d'expression générant l'antisens contre la protéine désirée. Ceci a permis, entre autres, l'inhibition partielle des récepteurs D2 pendant plus d'un mois (Weiss *et al.*, 1997b ; Davidkova *et al.*, 1998). Cette stratégie est toutefois beaucoup plus

complexe à réaliser et peut entraîner des réactions immunes importantes qui pourraient diminuer la spécificité des effets comportementaux et biochimiques observés.

### 1.7 L'UTILISATION D'ODN ANTISENS D2 CHEZ LES RONGEURS

Plusieurs études utilisant des ODN antisens différents et diverses procédures d'administration ont été réalisées jusqu'ici avec succès chez les rongeurs. Entre autres, quelques équipes ont testé des ODN antisens D2 administrés ICV ou intrastriatal. Les ODN antisens ont inhibé le comportement rotatoire médié par les récepteurs D2 chez des rongeurs hémiparkinsoniens traités au quinpirole (agoniste D2-D3) et ont engendré des rotations ipsilatérales au site d'injection en réponse au quinpirole chez des souris normales recevant unilatéralement des injections d'ODN antisens (Weiss *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1996), en plus de supprimer le reniflage induit lors d'une stimulation par forte dose d'apomorphine (Rajakumar *et al.*, 1997). L'injection ponctuelle intrastriatale d'un vecteur d'expression ARN de l'antisens D2 a permis d'observer une inhibition des stéréotypies induites par une stimulation aiguë au quinpirole et une diminution du « climbing » (action de grimper) induit par l'apomorphine chez les souris normales, ainsi qu'une diminution du comportement rotatoire sous quinpirole de souris lésées unilatéralement à la 6-OHDA. Le vecteur antisens D2 a de plus induit une réponse cataleptique significative chez les souris, similaire à celle obtenue avec des injections répétées d'halopéridol à faible dose, sans toutefois causer une régulation à la hausse des récepteurs D2 comme avec l'halopéridol (Weiss *et al.*, 1997b; Davidkova *et al.*, 1998).

Lorsque administrée dans le striatum, l'injection d'ODN antisens D2 cause généralement une réduction de 15-20% de la liaison D2 (Weiss *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1996), bien qu'une baisse de 50% des récepteurs ait déjà été observée avec une infusion continue ICV (Zhang et Creese, 1993). Habituellement, on observe un effet biochimique faible (sur les niveaux de D2) qui est corrélé avec un effet comportemental important. Cette discordance s'explique par le fait que la stratégie antisens semble inhiber un pool fonctionnel de récepteurs D2. En effet, il a été proposé que la majorité des récepteurs marqués lors des essais de liaison soient non fonctionnels et que seule la synthèse des récepteurs fonctionnels soit touchée par l'antisens D2; par conséquent, une baisse

importante des récepteurs D2 fonctionnels pourrait résulter en une faible baisse de la liaison totale des récepteurs. Un modèle pour expliquer cette découverte est proposé par Weiss *et al.* (figure 7; Qin *et al.*, 1995; Weiss *et al.*, 1997a et b; Davidkova *et al.*, 1998). Aucune des études utilisant l'antisens D2 n'a rapporté d'effet sur les récepteurs D1, et aucune n'a rapporté d'effet significatif de l'ODN contrôle ou du vecteur contrôle sur la liaison des récepteurs D1 ou D2 ou sur le comportement, démontrant la sélectivité, la spécificité et la faible toxicité de la stratégie antisens chez les rongeurs (Weiss *et al.*, 1997a; Sibley, 1999).

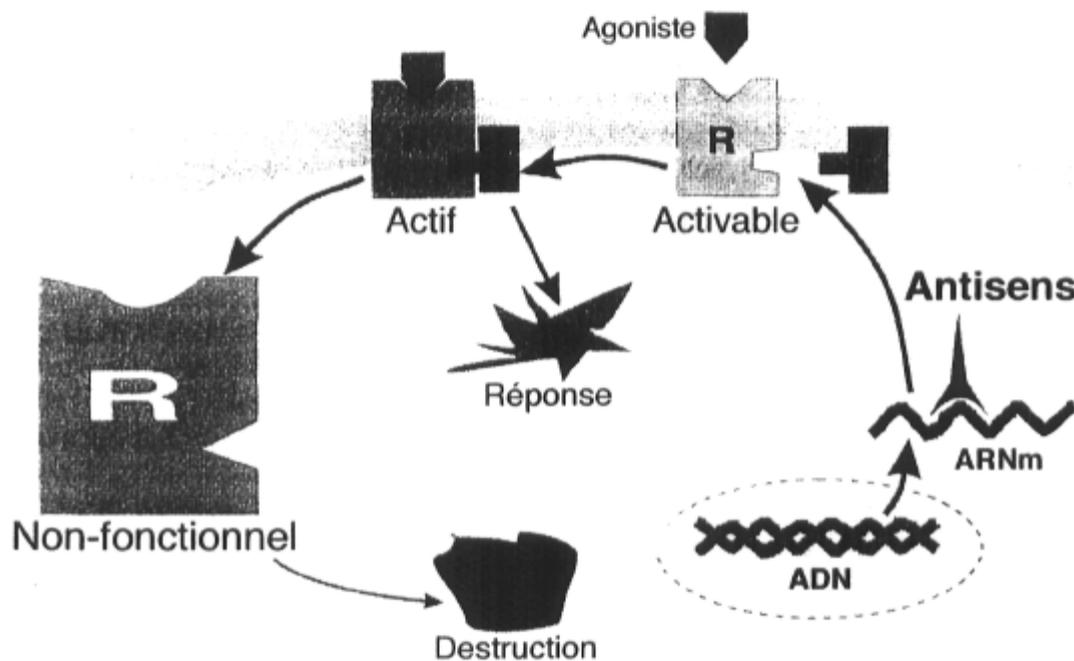


Figure 7 : Cycle de vie proposé pour le récepteur D2 : Les récepteurs nouvellement synthétisés à partir de l'ARNm sont couplés à des protéines G et deviennent actifs lors de l'interaction avec un agoniste; la forme active du récepteur produit alors sa réponse caractéristique. Les récepteurs rentrent alors à l'intérieur de la cellule, deviennent non-fonctionnels et sont éventuellement détruits. Toutes les formes du récepteur (activable, active, non-fonctionnelle) seraient détectées par les essais de liaison habituels. Il est proposé ici qu'un oligodésoxynucléotide antisens, en bloquant la synthèse du bassin de récepteurs activables, réduit de façon importante la fonction des récepteurs sans produire de changement proportionnel dans les niveaux totaux de récepteurs, tels que mesurés par essais de liaison. Les flèches épaisses ou minces suggèrent respectivement des taux de réaction rapides ou lents. La taille relative des différents bassins de récepteurs est suggérée par la taille des représentations dans le diagramme (tiré de Weiss *et al.*, 1997a).

## **1.8 MISE EN CONTEXTE ET OBJECTIFS DE TRAVAIL**

Le singe constituant un modèle expérimental beaucoup plus près de l'humain que les rongeurs tant pour l'état normal que pour l'état parkinsonien (dyskinétique ou non), une meilleure compréhension du rôle du récepteur striatal D2 dans le comportement moteur et la régulation peptidique nécessite l'application de la stratégie antisens aux primates non-humains vu l'absence de modèles knockout et le manque de sélectivité des agents dopaminergiques. Bien que des antisens systémiques aient déjà été utilisés chez l'humain et le singe, aucune expérience avec un antisens dirigé contre une protéine du cerveau d'un primate n'a été réalisée jusqu'ici, au meilleur de nos connaissances. L'objectif général de ce travail a été de caractériser et de valider l'approche antisens chez le primate dans le cadre de l'étude de récepteurs du système nerveux central, ici le récepteur D2.

Mettre au point la stratégie antisens pour l'étude d'une protéine du cerveau (le récepteur D2 en l'occurrence) chez le primate non humain a donc constitué le premier objectif du présent mémoire. Nous avons utilisé le macaque à longue queue comme sujet d'expérience car il constitue l'un des animaux les plus populaires pour étudier la physiologie et la pathologie des ganglions de la base. Étant donné les quantités astronomiques d'ODN antisens nécessaires lors d'une injection ICV et vu la volonté de cibler des structures en particulier, l'approche par injection intracérébrale a été choisie. L'infusion continue a également été privilégiée car supposée permettre une plus grande réduction des récepteurs et causer moins de dommages cérébraux. Afin de répondre au premier objectif, nous avons déterminé la diffusion des ODN antisens dans le cerveau et dans les cellules, évalué la toxicité par plusieurs paramètres et testé diverses concentrations d'ODN antisens, en plus de comparer les résultats à ceux obtenus à l'aide d'un ODN contrôle. De plus, nous avons évalué l'impact comportemental et biochimique de l'antisens afin d'en déterminer l'efficacité.

Notre deuxième objectif a été de déterminer le rôle spécifique du récepteur dopaminergique D2 dans la motricité chez le primate non humain. Puisque le putamen contient une quantité importante de D2 et est considéré comme impliqué dans l'exécution du mouvement et l'activité locomotrice en général, cette structure a été choisie comme

cible de notre antisens. Afin de répondre au deuxième objectif, nous avons élaboré divers tests comportementaux pour des singes, lésés ou non, subissant différents protocoles d'infusion d'ODN. Nous avons voulu caractériser l'impact d'une baisse des récepteurs D2 du putamen contralatéral sur l'utilisation préférentielle de la main puisque celle-ci serait reliée à des asymétries dans le système nigrostrié. En effet, chez l'humain, le degré de préférence pour la main droite semble être corrélé avec le degré de dominance du putamen gauche observé à la tomographie par émission de positron avec la [<sup>18</sup>F]-fluorodopa (de la Fuente-Fernández *et al.*, 2000). De plus, nous avons cherché à déterminer l'impact sur la vitesse d'exécution, entre autres pour résoudre l'opposition entre les différents modèles de souris déficientes en D2 (voir plus haut). Nous avons également testé l'effet de l'antisens sur l'augmentation de l'activité locomotrice sous agonistes dopaminergiques chez les animaux lésés.

Finalement, notre objectif au niveau biochimique a été de mesurer l'impact d'une baisse de D2 sur la régulation de l'expression des gènes des neuropeptides striataux dynorphine et enképhaline et d'évaluer quelles étaient les corrélations entre les effets comportementaux et les effets biochimiques d'une baisse des niveaux de récepteurs D2 par la stratégie antisens.

## CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODE

### 2.1 ANIMAUX

Toutes les expériences ont été réalisées sur des primates femelles de type *Macaca fascicularis*. Les singes étaient logés individuellement dans une cage vitrée sur roulettes pour toute la durée des observations et un temps d'au moins trois jours leur a été donné pour s'habituer à leur nouvelle cage avant le commencement des expérimentations. Les animaux étaient nourris une fois par jour, à la fin des tests quotidiens, et avaient accès à l'eau ad libitum. Le cycle d'éclairage invariable comprenait 12 h de clarté (07h00-19h00) et 12 h de noirceur et la salle était maintenue à une température constante de 23°C. Les allées et venues dans la salle ont été maintenues au minimum durant les observations, même si d'autres macaques occupaient simultanément d'autres cages dans la même salle et nécessitaient certains soins. Lorsqu'en conflit, la tranquillité de la salle a été préférée au respect strict de l'horaire.

De façon plus précise et pour faciliter la lecture, les caractéristiques générales des primates utilisés seront données pour chaque individu séparément dans le tableau ci-dessous (tableau 1).

Tous les singes ont subi une ventriculographie radio-opaque au minimum une semaine avant le début des expérimentations afin de nous donner des coordonnées précises pour les injections intracérébrales stéréotaxiques.

Singe	Âge (années)	Masse (kg)	Ovariectomie	Autres caractéristiques
HA84	4 *	2,5	non	Gauchère
MA55	8 *	4,0	non	Gauchère
MA35	17	4,4	oui	Gauchère
MA26	4	3,2	oui	Ambidextre
PM	8	5,9	non	
PA	6	3,7	non	
GM	12	4,4	non	Dépressive
GA	14	6,1	non	
HP1	10*	5,6	oui	Hémi-parkinsonienne (lésion hémisphère gauche)
HP2	7 *	5,7	oui	

\* Age estimé par le technicien en santé animale.

Tableau 1 : Caractéristiques individuelles des macaques utilisés.

### 2.1.1 Modèle hémiparkinsonien

Il est à noter que chez les singes HP1 et HP2, l'état d'hémiparkinsonisme a été induit plusieurs mois avant les observations par l'administration unilatérale de la neurotoxine MPTP à l'aide d'une minipompe osmotique reliée à une canule placée stéréotaxiquement dans la substance noire d'un striatum (voir plus bas « stéréotaxie »). La minipompe libère le MPTP au rythme de 1 µl/h pour un total de 150 µg à 3 mg de MPTP, la pompe étant retirée lorsque l'état hémiparkinsonien est considéré suffisant (la main contralatérale n'est plus utilisée et un comportement rotatoire du côté de la lésion est observable). On a ensuite alloué une période de récupération au primate, jusqu'à la stabilisation de l'état général et hémiparkinsonien.

## 2.2 OLIGODÉOXYRIBONUCLÉOTIDES (ODN) POUR D2

### 2.2.1 Préparation des oligodésoxyribonucléotides

Des expériences précédentes de clonage et de séquençage du récepteur D2 du singe *Macaca fascicularis* ont permis d'identifier une séquence spécifique du récepteur D2 pour développer un ODN antisens de 18-mers (Weppe 1999, données non-publiées), tel que recommandé (Weiss *et al.*, 1997a; Stein, 1998; Myers et Dean, 2000). Cet ODN est dirigé

contre l'ARNm du récepteur D2 au niveau de l'ATG de départ et sa formule est la suivante: (5'-ATG-GAT-CCA-CTG-AAT-CTG-3'). Une séquence contrôle « scrambled sequence » (séquence brouillée faite avec les mêmes bases, mais dans un ordre refait aléatoirement) de 18-mers a également été retenue: (5'-TAT-ACT-AGC-GTC-TAC-GAG-3'). Cette séquence devrait présenter les mêmes effets toxiques non-spécifiques que la séquence antisens mais aucun des effets spécifiques, constituant par conséquent un excellent contrôle. Aucune des séquences n'avait d'homologies significatives avec d'autres connues selon les bases de données GenBank.

Pour toutes les synthèses sauf la première (animal HA84), les ODN ont été synthétisés par le service *Analyse d'image et synthèse d'ADN du Centre Hospitalier de l'Université Laval* avec une modification en phosphorothioates aux positions 1, 16 et 17 pour éviter une trop grande dégradation enzymatique par les nucléases. Pour la première expérience (animal HA84), la synthèse de l'antisens a été effectuée par le service « Custom Primers » de la compagnie GIBCO BRL avec une modification en phosphorothioates aux positions 16 et 17 et l'attachement d'un groupement biotine à l'extrémité 5'.

Les ODN ont tous été purifiés à l'aide de cartouches OPC selon la procédure recommandée (Perkin Elmer (ABI), Foster City, USA), puis resuspendus dans une solution stérile de liquide céphalorachidien artificiel (Flanagan *et al.*, 1994) additionné de 0,1 mg/ml de gentamycine pour réduire les risques de contamination. La concentration a été calculée par spectrophotométrie et ajustée avant chaque administration.

## **2.3 ADMINISTRATION DES ODN ET CHIRURGIE**

### **2.3.1 Préparation et anesthésie du singe**

Pour tous les singes, une injection intramusculaire de kétamine : atropine (10 mg/kg : 0,05 mg/kg) a servi à induire l'anesthésie. Pour HA84, l'anesthésie a été maintenue par propophol-kétamine-fentanyl IV dans la saphène gauche (1 mg/ml; 0,8 mg/ml; 0,1 µg/ml) puisque l'appareil pour anesthésie au gaz n'était pas disponible. Pour tous les autres animaux, l'anesthésie a été maintenue à l'isoflurane 1,5-2 %, suite à une intubation endotrachéale. Tous les sujets ont également reçu de la lidocaïne en infiltration locale sur la

peau du crâne, suite au rasage et à la désinfection, ainsi qu'une dose IV prophylactique de l'antibiotique céfazoline (1,5 g dans 0,8 ml).

### 2.3.2 Stéréotaxie et installation de la minipompe

Une fois endormi et préparé, l'animal est placé dans le support stéréotaxique et sa position adéquate est confirmée par radiographie. Une fois la peau et le fascia couvrant le crâne dégagés, un trou est percé dans le crâne et une canule en L 23G (David Kopf Instruments) est placée stéréotaxiquement aux coordonnées désirées (corrigées pour l'individu à partir des données de la ventriculographie) et est stabilisée dans cette position à l'aide de vis et de ciment dentaire. Cette canule est reliée à une minipompe osmotique Alzet Model 2001 (ALZA Corp., Palo Alto, CA), qui permet l'infusion continue à un rythme de 1  $\mu$ l/h de la solution de désoxyribonucléotides. La solution est injectée dans la minipompe au moment de l'installer. La minipompe (non amorcée) se met à fonctionner normalement environ 12 h après son installation en position sous-cutanée. Une fois la canule et la pompe mises en place, une radiographie de contrôle est faite.

Les coordonnées stéréotaxiques visées (avant correction pour l'individu) pour la première expérience avec HA84, déterminées à partir de l'atlas de Szabo (Szabo et Cowan, 1984), ont été les suivantes: 17,2 en antéro-postérieur, 11,0 en latéral et 5,0 en vertical. Suite à un ajustement, les coordonnées stéréotaxiques visées pour tous les autres macaques ont été 15,5 en antéro-postérieur, 12,5 en latéral et 4,5 en vertical. Dans tous les cas, le putamen dorsal était la structure ciblée.

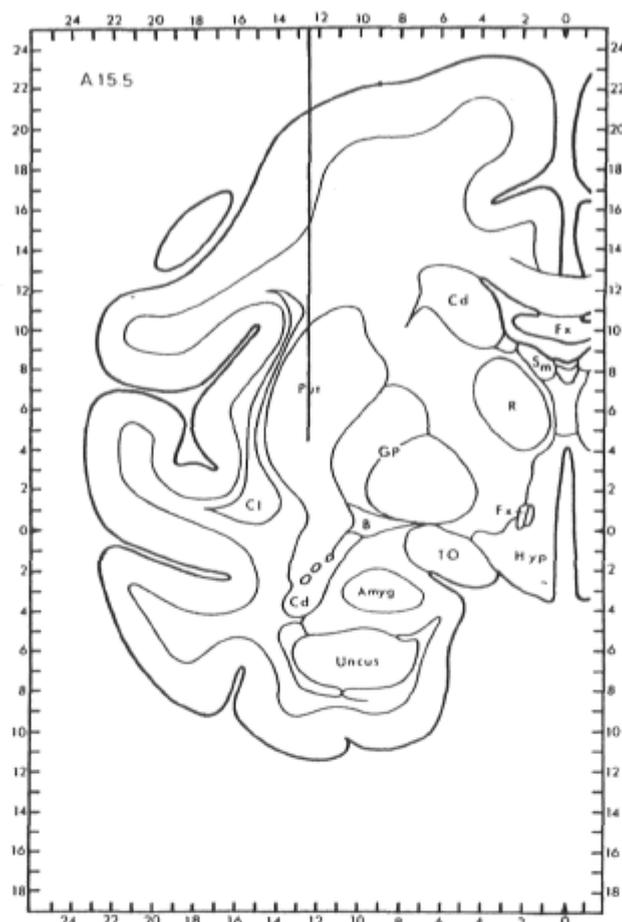


Figure 8 : Position de la canule au niveau du putamen (adapté de Szabo et Cowan, 1984).

### 2.3.3 Postchirurgie

Une fois l'installation de la canule et de la pompe complétée, la peau est refermée par points de suture ou agrafes ainsi que colle à tissu (Vetbond). Un analgésique, le kétoprofène, est donné à raison de 2,0 mg/kg immédiatement après l'intervention, et à la dose de 1,0 mg/kg le premier et le deuxième jour postchirurgie. Si jugé nécessaire, de l'amoxil (25 mg/kg b.i.d. durant 7 jours) est administré per os pour prévenir l'infection de la plaie.

### 2.3.4 Retrait de la minipompe et sacrifice

Lorsque l'infusion d'ODN est complétée pour un individu (environ 7 jours), l'animal subit une nouvelle chirurgie selon la même procédure afin de changer la pompe (contrôles

comportementaux) ou de retirer stéréotaxiquement canules et pompes (fin de protocole). Lors des contrôles comportementaux, la dernière pompe a été laissée plus de 7 jours pour prolonger le temps de contrôle avant la fin du protocole. Dans le cas des contrôles biochimiques, la pompe a été retirée après 7 ou 8 jours (au maximum) d'infusion et après 24 h (au minimum) sans médicament. Le sacrifice par injection intracardiaque de potassium a fait immédiatement suite au retrait des canules pour ces animaux. En moins de 20 min postsacrifice, le cerveau a été prélevé et plongé dans l'isopentane sur glace sèche pour environ 30 s, puis emballé et placé à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation.

## 2.4 PROTOCOLES D'INFUSION DES ODN ANTISENS ET CONTRÔLE

Les concentrations d'ODN ont varié selon les individus, mais elles ont toujours été les mêmes pour l'ODN antisens et l'ODN contrôle chez un même animal. Le tableau 2 indique le protocole utilisé pour chaque individu.

Singe	Implantation (j/m/a)	Retrait (j/m/a)	Sacrifice (j/m/a)	ODN ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Putamen gauche (ODN)	Putamen droit (ODN)	Autres
HA84	15/08/00	22/08/00	22/08/00	7,5	Antisens	-	ODN marqués biotine
MA55	19/07/01	26/07/01	26/07/01	5,0	Contrôle	Antisens	-
MA35	16/10/01	23/10/01	23/10/01	5,0	Contrôle	Antisens	-
MA26	27/11/01			5,0	Antisens	Contrôle	canule reste en place, échange de pompe
	05/12/01	18/12/01	non	-	<i>LCR artificiel</i>	<i>LCR artificiel</i>	
PM	23/01/02	31/01/02	31/01/02	2,5	Contrôle	Contrôle	-
PA	23/01/02	31/01/02	31/01/02	2,5	Antisens	Antisens	-
GM	24/01/02	01/02/02	01/02/02	2,5	Contrôle	Contrôle	-
GA	24/01/02	01/02/02	01/02/02	2,5	Antisens	Antisens	-
HP1	09/10/01			5,0	Antisens	-	canule reste en place, échange de pompe
	16/10/01	01/11/01	non	5,0	Contrôle	-	
HP2	05/12/01			5,0	Antisens	-	canule reste en place, échange de pompe
	12/12/01	20/12/01	non	5,0	Contrôle	-	

Tableau 2 : Protocoles individuels d'infusion d'ODN antisens et contrôle chez les macaques.

Pour l'animal HA84, une seule canule a été placée dans l'hémisphère gauche (non-dominant) et la pompe contenait l'antisens D2 marqué à la biotine, à une concentration de 7,5 µg/µl. L'hémisphère droit ayant déjà été utilisé lors d'expériences de micro-injections d'antisens, il n'a pas été utilisé comme contrôle biochimique. Lors du sacrifice, l'hémisphère gauche a été prélevé pour analyses. Les animaux MA55 et MA35 ont toutes deux reçu l'antisens dans l'hémisphère contrôlant la main dominante et le contrôle dans l'autre hémisphère, et leur cerveau a également été récupéré suite au sacrifice pour analyse biochimique. Le macaque MA26 étant ambidextre, il a reçu l'antisens dans un hémisphère désigné au hasard et le contrôle dans l'autre. Après 7 jours d'infusion continue d'ODN, la plaie a été réouverte et les pompes échangées pour deux pompes remplies de LCR artificiel sans ODN, afin de faire un contrôle comportemental. Les singes PM et GM ont reçu l'ODN contrôle à la fois dans le putamen gauche et le putamen droit et les singes PA et GA ont reçu l'ODN antisens, de façon bilatérale également. Les animaux ont été sacrifiés après huit jours d'infusion des ODN et leur cerveau a été prélevé pour les comparer biochimiquement. Les animaux HP1 et HP2, tous deux hémiparkinsoniens (lésion à gauche), se sont vus poser tout d'abord une pompe d'antisens du côté lésé pour 7 jours. Ensuite, à des fins de contrôle comportemental, la pompe a été changée pour une pompe contenant l'ODN contrôle.

## **2.5 TESTS COMPORTEMENTAUX**

Afin d'évaluer l'efficacité de l'antisens D2 et son impact comportemental, et par conséquent le rôle particulier du récepteur D2 dans la locomotion, les animaux ont été soumis à divers tests comportementaux.

### **2.5.1 Test d'utilisation préférentielle de la main**

Les récepteurs D2 du putamen étant potentiellement impliqués dans l'initiation du mouvement (Baik *et al.*, 1995; Kelly *et al.*, 1998), il a été postulé que l'infusion d'antisens D2 dans le putamen du macaque peut diminuer sa capacité à initier des mouvements avec la main contrôlée par ce putamen (main contralatérale), ce qui sera compensé par une augmentation de l'utilisation de la main contrôlée par le putamen non touché par l'antisens.

### Règle sans pot

Afin de voir si l'utilisation préférentielle de la main est touchée par l'infusion d'antisens D2 dans un hémiputamen, les macaques HA84, MA55, MA35 et MA26 ont été soumis à un test consistant en la prise libre de morceaux de fruits (cantaloup ou banane en cubes d'environ 1 cm de côté) posés à plat sur une règle de métal (10 × 100 cm) glissée dans la cage du macaque. Une séance consiste à introduire 5 fois d'affilée la règle dans la cage, avec 5 morceaux de fruits également espacés dessus à chaque fois. La règle n'est retirée que lorsque le singe a récupéré tous les morceaux. Tous ces singes ont été soumis à une séance par jour durant deux semaines avant la pose des pompes (contrôle) ainsi que durant toute l'infusion des ODN.

### Règle avec pots

Afin d'augmenter le niveau de difficulté, un test similaire mais utilisant des morceaux de fruits posés dans des pots ouverts (diamètre de 7 cm, hauteur de 8 cm), vissés à une règle, a été fait selon le même régime aux singes MA55, MA35 et MA26. Pour le singe HP1, hémiparkinsonien lésé à gauche et se servant donc peu de sa main droite au naturel, la même règle a été utilisée avec des raisins (pour faciliter la prise). Dans son cas, la règle était introduite une fois à toutes les 15 min durant les périodes d'injection d'agonistes dopaminergiques afin d'observer l'utilisation préférentielle de la main. Ce singe avait en effet préalablement démontré sa capacité et sa préférence à utiliser sa main droite lorsque stimulé par un agent dopaminergique. Par conséquent, le temps pendant lequel l'utilisation de la main droite a été plus importante que celle de la main gauche ( $3 \times \text{main droite} / 5$  ou plus pour un essai) a été calculé. Le singe HP2 ne changeant pas son utilisation préférentielle de la main sous agent dopaminergique et ne coopérant pas bien au test de la règle avec pots, des raisins lui ont été donnés dans le fond de sa cage à un intervalle de 15 min durant les périodes d'injection d'agonistes dopaminergiques afin d'observer son utilisation préférentielle de la main.

### 2.5.2 monkey Movement Assessment Panel (mMAP)

Afin d'évaluer la rapidité d'exécution de mouvement des singes soumis à l'antisens D2, un mMAP automatisé (voir figure 9; Gash *et al.*, 1999) a été utilisé. Il s'agit d'un appareil relié à un ordinateur, appareil que l'on fixe aux barreaux de la cage et qui se présente au singe comme un panneau de Plexiglas transparent avec un trou bordé de cellules photoélectriques à droite et à gauche. Si le singe passe le bras par l'un des trous, cela lui permet d'atteindre une boîte de Plexiglas fixée plus haut que les trous sur le panneau. Cette boîte présente une séparation au milieu et une ouverture bordée de cellules photoélectriques de chaque côté, donnant ainsi accès à l'intérieur de la boîte seulement si le singe utilise le bras gauche à gauche et le bras droit à droite. On place une friandise, comme un demi-raisin, à l'intérieur de la boîte, et lorsque le singe passe le bras pour l'atteindre, le bris des faisceaux lumineux transmet un signal à l'ordinateur. L'ordinateur calcule alors le temps pour entrer et sortir du trou du panneau (motricité grossière = temps total – temps dans la boîte) et celui pour récupérer la friandise dans la boîte (motricité fine = temps dans la boîte). Il est possible de placer la friandise sur une tige amovible droite ou en forme de point d'interrogation pour augmenter la difficulté de l'exercice. Dans le cas de la tige droite, on a utilisé un Froot Loops (céréale en anneau) passé autour de la tige comme friandise, et dans le cas de la tige en forme de point d'interrogation, une rondelle de carotte trouée, sauf pour PM, PA, GM et GA pour qui l'on a utilisé les carottes trouées avec la tige droite. Le test est pratiqué en alternance à gauche et à droite pour un total de 12 répétitions (6 à gauche, 6 à droite). Après quelques jours d'habituation au mMAP, les singes MA55, MA35 et MA26, ont eu droit à une séance de douze répétitions avec la tige droite et douze répétitions avec la tige en forme de question à tous les jours, et ce durant deux semaines avant la pose des pompes (contrôle) et durant toute la période d'infusion des ODN. Les singes PM, PA, GM et GA n'ont par contre eu que 30 min d'habituation au mMAP puis trois séances (une à tous les deux jours) de douze répétitions sans tige avec des raisins et de douze répétitions avec tige droite et carottes durant l'infusion des ODN, afin d'évaluer la capacité d'apprentissage plutôt que la rapidité d'exécution seulement.

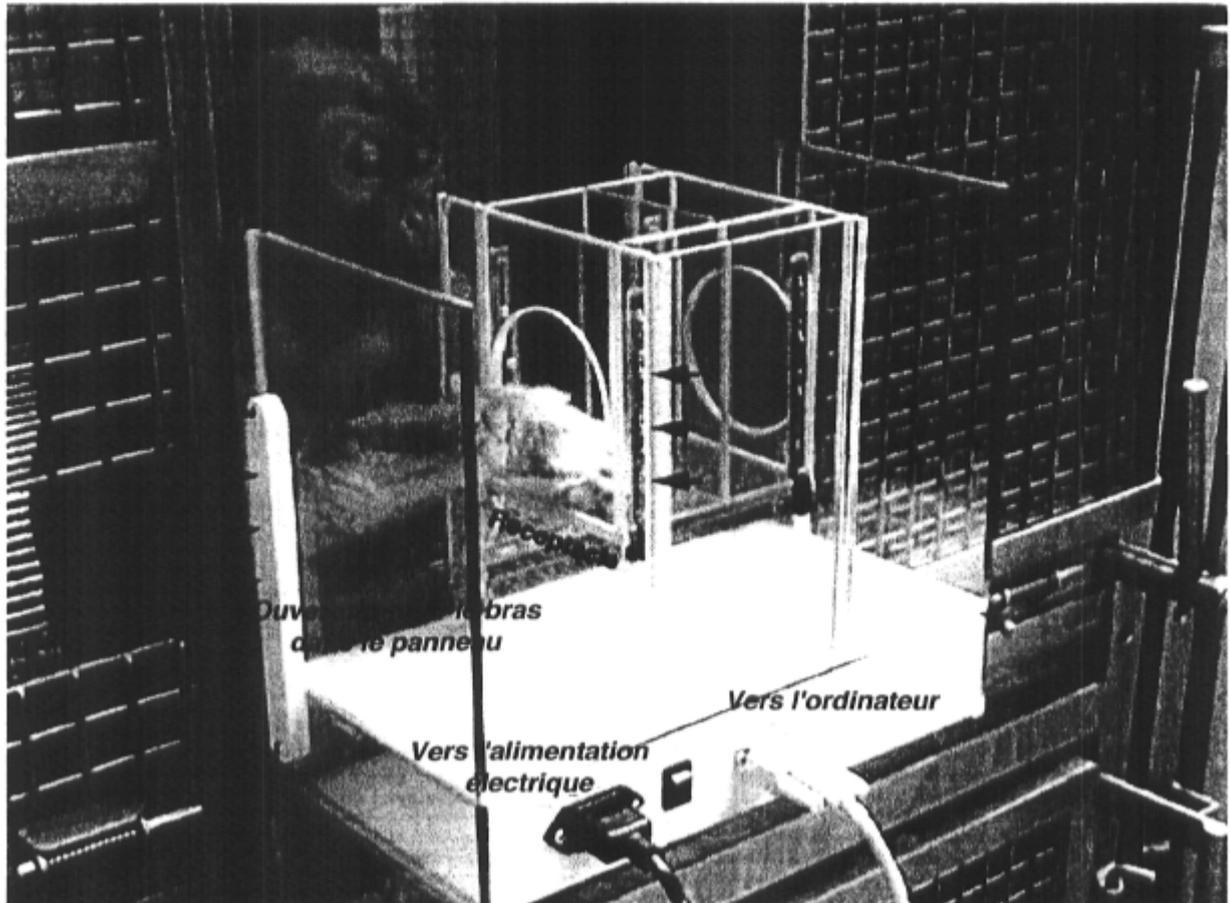


Figure 9 : Singe utilisant le mMAP, appareil servant à mesurer la vitesse d'exécution de mouvement des membres antérieurs (adapté de Gash *et al.*, 1999).

### 2.5.3 Télémétrie

Le récepteur D2 étant impliqué dans l'initiation de mouvements à l'état basal et également sous l'effet de certains agonistes dopaminergiques, la mesure de la quantité de mouvements exécutés par l'animal est une donnée intéressante pour vérifier l'effet de l'antisens D2. Afin de comparer le comportement locomoteur de base et sous agonistes dopaminergiques des animaux avant et pendant l'infusion d'ODN, un système de monitoring télémétrique a été utilisé pour les animaux MA26, HP2, PA, PM, GA et GM. Ce système fonctionne à l'aide d'un collier contenant un émetteur, porté en permanence par l'animal, et une plaque réceptrice fixée à la cage, reliée à un ordinateur. Bien que le système présente certaines limites (certains types de mouvements où le collier ne bouge pas ne déclenchent pas de signal), lorsque l'animal effectue un mouvement devant la plaque

réceptrice, un signal est envoyé à l'ordinateur et enregistré. L'ordinateur cumule ces signaux et le programme informatique fournit un décompte des activités locomotrices, exprimé en terme de nombre de mouvements exécutés, toutes les 5 min, 24 h par jour. Ceci permet donc de suivre les variations du comportement locomoteur dans le temps de façon continue et prolongée.

#### 2.5.4 Vidéo

À l'état de base pour contrôle et lors de toutes les périodes de stimulation par agonistes dopaminergiques, tous les singes ont été filmés pour analyse ultérieure de leur comportement locomoteur. Les analyses ont porté sur la quantification de tout comportement locomoteur facilement identifiable, et de tout comportement différent du comportement à l'état de base lors des injections d'agonistes dopaminergiques. Chaque animal ayant un comportement de base unique, développant un type de mouvement particulier lorsque stimulé et des stéréotypies qui lui sont propres lorsque présentes, une quantification uniforme n'a pas été possible et les animaux ont plutôt été comparés à eux-mêmes.

Définissons tout de même la quantification du climbing, qui consiste pour le singe à grimper aux barreaux de telle façon qu'aucune des quatre pattes ne touche encore le sol. Un climbing est compté lorsque l'animal part du sol et effectue un tel mouvement. Par ailleurs, chez les animaux hémiparkinsoniens, un comportement rotatoire peut être quantifié. À l'état de base, de tels singes tournent sur eux-mêmes du côté de la lésion (le lésé à l'hémisphère gauche tourne à gauche). Lors de la stimulation dopaminergique, ils se mettent à tourner uniquement du côté contralatéral à la lésion pour une durée variable selon l'intensité et la nature de la stimulation dopaminergique. Le comportement rotatoire a donc été quantifié sous agonistes dopaminergiques chez HP2 en terme de nombre de tours contralatéraux effectués et en temps ON avant que l'animal ne réeffectue un tour ipsilatéral à la lésion. Le nombre de tours a été compté à partir du vidéo par tranches de 10 min, avec un intervalle de 5 min entre chacun (moment où des raisins étaient donnés, voir test d'utilisation préférentielle de la main), et ce de 5 min après l'injection jusqu'au premier tour ipsilatéral à la lésion (suite au commencement des tours contralatéraux). Le temps ON est considéré

comme le temps entre l'injection et le premier tour ipsilatéral (suite au commencement des tours contralatéraux).

### **2.5.5 Administration des agents dopaminergiques**

Tous les agents dopaminergiques utilisés ont été administrés par voie sous-cutanée aux animaux. Les macaques ont été attrapés dans leur cage par le technicien en santé animale, immobilisés dans une chaise de contention, injectés sous la peau entre les épaules et remis immédiatement dans leur cage, le tout ne prenant que quelques minutes. Les agents pharmacologiques utilisés ont été le quinpirole (Sigma Chemical Co., St-Louis, USA), un agoniste D2-D3, le chloro-APB SKF 82958 (Sigma Chemical Co., St-Louis, USA), un agoniste D1, l'apomorphine (Research Biochemicals International, Natick, USA), un agoniste mixte D1-D2 et la L-DOPA (Sigma Chemical Co., St-Louis, USA), un précurseur de la dopamine combinée à la benserazide (Hoffman-LaRoche, Montréal, Canada), et enfin un inhibiteur périphérique de la dopa décarboxylase. Les protocoles d'administration des agonistes dopaminergiques seront ici brièvement détaillés. Tout d'abord, il est à noter que le lendemain de l'opération et la veille du sacrifice ont été des journées de congé pour tous les animaux. Pour le HA84, seul le quinpirole a été administré. Les injections ont eu lieu en après-midi, une fois durant la semaine précédant la chirurgie (contrôle avant ODN) ainsi que deux fois durant la semaine postchirurgie (sous ODN antisens).

La dose utilisée pour HA84 (0,1 mg/kg) ne semblant pas produire une augmentation assez importante de l'activité locomotrice, elle fut réajustée à la hausse pour les singes suivants (0,3 mg/kg). Pour les singes MA55 et MA35, seul du quinpirole a été utilisé également, et les injections ont eu lieu en après-midi à raison de trois fois avant et trois fois après la chirurgie pour implanter les pompes à ODN. L'animal MA26 a subi le même régime que MA55 et MA35 mais durant une semaine de plus (donc trois injections de plus) suite à sa deuxième chirurgie. Les animaux PM, PA, GM et GA ont suivi un même protocole avec en alternance une journée avec injection d'apomorphine le matin, une journée avec injection de quinpirole l'après-midi et une journée de repos, et ce à tous les jours la semaine avant et la semaine après l'implantation des canules. Le protocole de HPI a inclus l'induction de dyskinésies à l'aide de L-DOPA donnée à tous les jours pour une semaine, deux semaines avant l'opération. Les quatre jours précédant et la semaine suivant

la première et la deuxième opération, l'animal a suivi un protocole avec une journée de SKF 82958 le matin et de L-DOPA l'après-midi (pour le maintien des dyskinésies) et une journée de quinpirole le matin, et ce en alternance tous les jours. La dose de quinpirole utilisée était plus faible que chez les singes précédents car les singes lésés sont plus sensibles que les singes normaux. Enfin, l'animal HP2 a subi un protocole consistant à lui injecter du quinpirole un jour sur deux, et du SKF 82958 seulement le matin même de l'opération, et ce durant les 4 semaines qu'ont duré le protocole. Les doses de quinpirole ont été grandement réduites pour cet animal puisque l'on cherchait à éviter l'induction de dyskinésies.

Un résumé des observations comportementales est présenté pour chaque animal dans le tableau 3.

Singe	Sans pot	Avec pots	Autres	mMAP	Télémetrie	Vidéo	Quinpirole	SKF 82958	Apomorphine	L-DOPA
HA84	SXS/jr	-	-	-	-	tous les p.m.	0,1 mg/kg	-	-	-
MA55	SXS/jr	SXS/jour	-	1X12 tige droite/jr 1X12 tige question/jr	-	tous les p.m.	0,3 mg/kg	-	-	-
MA35	SXS/jr	SXS/jour	-	1X12 tige droite/jr 1X12 tige question/jr	-	tous les p.m.	0,3 mg/kg	-	-	-
MA26	SXS/jr	SXS/jour	-	1X12 tige droite/jr 1X12 tige question/jr	oui	tous les p.m.	0,3 mg/kg	-	-	-
PM	-	-	-	3X1X12 sans tige/sem 3X1X12 tige droite/sem	oui	tous les jrs	0,3 mg/kg	-	0,85 mg/kg	-
PA	-	-	-	3X1X12 sans tige/sem 3X1X12 tige droite/sem	oui	tous les jrs	0,3 mg/kg	-	0,85 mg/kg	-
GM	-	-	-	3X1X12 sans tige/sem 3X1X12 tige droite/sem	oui	tous les jrs	0,3 mg/kg	-	0,85 mg/kg	-
GA	-	-	-	3X1X12 sans tige/sem 3X1X12 tige droite/sem	oui	tous les jrs	0,3 mg/kg	-	0,85 mg/kg	-
HP1	-	1XS/15 min	-	-	-	tous les a.m.	0,2 mg/kg	0,5 mg/kg	-	20 mg/kg
HP2	-	-	1XS/15 min fond de cage	-	oui	tous les a.m.	0,04 mg/kg	0,25 mg/kg	-	-

Tableau 3 : Résumé des observations comportementales pour chaque macaque.

## **2.6 ANALYSES BIOCHIMIQUES**

Afin d'évaluer l'impact de l'antisens sur la biochimie des neurones striataux, des analyses biochimiques ont été conduites sur les cerveaux prélevés suite aux protocoles d'infusion continue d'ODN antisens ou contrôle.

### **2.6.1 Préparation des cerveaux**

Une fois qu'un cerveau a été récupéré (voir section retrait de la minipompe et sacrifice), il est coupé au cryostat en sections coronales de 20  $\mu\text{m}$  qui sont montées sur des lames Superfrost Plus (Brain Research Laboratories, Newton, USA). Les lames sont mises dans un dessiccateur sous vide à 4°C pour une nuit puis conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

### **2.6.2 Révélation à la biotine et Nissl**

Afin d'observer l'étendue de la diffusion de la solution antisens lorsque infusée de façon continue dans le putamen, une technique de révélation à la biotine a été exécutée sur plusieurs coupes de l'hémisphère gauche de HA84 (infusée avec un ODN antisens modifié marqué avec un groupe biotinylé). De façon brève, les coupes sont d'abord fixées dans la paraformaldéhyde 4% 20 min puis subissent un blocage de la peroxydase endogène en 30 min avec une solution 0,3% d' $\text{H}_2\text{O}_2$  - méthanol. Elles sont ensuite rincées 4 fois dans le 0,1 M PBS pH 7,4 (PBS 2 M = 2,75 M NaCl, 0,05 M KCl, 18 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) pour 10 min et durant ce temps, la solution Avidine Biotine Complexe (ABC kit, Vector) est préparée (4  $\mu\text{l/ml}$  de A et 4  $\mu\text{l/ml}$  de B dans PBS). Les coupes sont alors incubées une heure avec la solution ABC, puis rincées deux fois dans le 0,1 M PBS et une fois dans le TRIS 0,05 M à pH 7,6. Enfin, la révélation au diaminobenzidine (DAB) est exécutée et les coupes sont rincées lorsque le brunissement est suffisant. La moitié des lames ont ensuite subi une coloration de Nissl (thionine) selon la procédure de Carlos. Pour finir, toutes les lames ont été fixées et montées avec du Permount et une lamelle, puis observées au microscope. Un décompte des noyaux comparant les zones du striatum où l'antisens a diffusé par rapport aux zones vierges a été fait à partir des coupes colorées au

Nissl, à l'aide du logiciel NIH Image, afin de voir si la toxicité des ODN pouvait entraîner une perte neuronale.

### 2.6.3 Études de liaison des sites récepteurs

Afin de vérifier s'il était possible d'observer une baisse des récepteurs D2 suite à l'infusion continue d'ODN antisens et si cette baisse était spécifique à l'antisens et au D2, des essais de liaison avec un radioligand ont été réalisés pour les récepteurs D2 et D1 (voir Tremblay *et al.*, 1999 pour le protocole d'essai de liaison). Pour ce faire, les coupes sont d'abord séchées puis pré-incubées dans une solution tampon (50 mM TRIS-HCl pH 7,4, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA dans le cas des récepteurs D2 et 15 mM TRIS-HCl pH 7,4, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA et 0,1 % acide ascorbique dans le cas des récepteurs D1) à température de la pièce ( $T_p$ ) pour 15 min. Par la suite, les coupes sont asséchées et incubées dans une solution de 3 nM de [<sup>3</sup>H]-raclopride (antagoniste sélectif des récepteurs D2, Amersham) ou dans une solution de 1 nM de [<sup>3</sup>H]-SCH-23390 (antagoniste des récepteurs D1, Amersham) et de 50 nM de kétansérine (bloque les récepteurs 5-HT pour augmenter la sélectivité) à  $T_p$  pour 1 h.

La liaison non-spécifique est déterminée sur certaines sections désignées par l'addition d'un ligand froid en grande concentration comme le (+)butaclamol (D2) ou le SCH 23390 (D1) à 1  $\mu$ M. Les sections sont ensuite lavées deux fois pendant 5 min dans la solution tampon à 4°C puis rincées quelques secondes dans l'eau distillée à 4°C. Les coupes sont ensuite séchées à l'air et exposées à des films sensibles au tritium (BioMax MR films, Kodak) et des standards tritiés (Amersham) pour environ 40 jours dans le cas des D2 et 35 jours dans le cas des D1. Les films sont développés dans un développeur automatique (X-omat, Kodak) puis quantifiés à l'aide du logiciel NIH Image. L'essai de liaison D1 n'a pas été réalisé avec HA84 car nous n'avons qu'un hémisphère et donc pas de contrôle et la première technique n'ayant pas fonctionné (radioligand défectueux), nous n'avons pas tenté de la refaire sur ce singe.

Également, un essai de liaison pour les récepteurs D3 a été fait chez MA55, afin de déterminer si l'antisens influençait ce sous-type de récepteur de la famille D2. Pour ce

faire, les coupes sont d'abord séchées puis pré-incubées dans une solution tampon pH 7,4 (50 mM Hepes, 1 mM EDTA, 0,1 % BSA) à  $T_p$  pour 3 fois 5 min. Par la suite, les coupes sont asséchées et incubées dans une solution de 0,2 nM de [ $^{125}$ I]-7-OHPIPAT (agoniste du récepteur D3, Amersham) à  $T_p$  pour 1h30. La liaison non-spécifique est déterminée sur certaines sections désignées par l'addition d'un ligand froid en grande concentration comme la dopamine à 10  $\mu$ M. Les sections sont ensuite lavées trois fois pendant 2 min dans une solution tampon (50 mM Hepes pH 7,4, 100 mM NaCl) à 4°C puis rincées quelques secondes dans l'eau distillée à 4°C. Les coupes sont ensuite séchées à l'air et exposées à des films sensibles à la radioactivité (BioMax MR films, Kodak) et des standards de  $^{125}$ I (Amersham) pour environ 24 h. Les films sont développés dans un développeur automatique (X-omat, Kodak) puis quantifiés à l'aide du logiciel NIH Image.

#### 2.6.4 Hybridations *in situ*

Puisque l'antisens pour le récepteur D2 devrait baisser ces derniers récepteurs de façon efficace et spécifique sans entraîner une toxicité excessive, une hybridation pour l'ARNm de la préproenképhaline, normalement sous la régulation inhibitrice des récepteurs D2, et pour l'ARNm de la substance P, normalement sous la régulation des récepteurs D1, a été exécutée (Langlois *et al.*, 2001; Beaudry *et al.*, 2000). L'hybridation pour la préproenképhaline est faite à partir d'une sonde d'oligodésoxyribonucléotides faite pour l'humain mais fonctionnant aussi chez le macaque, d'après les résultats positifs d'expériences antérieures. L'oligo en question correspond aux bases 443-481 de l'ADN de la préproenképhaline-A (Comb *et al.*, 1982) humaine et a été marquée au  $^{35}$ S-dATP (NEG-034H, NEN) à l'aide de la 3'-terminal désoxynucléotidyl transférase. La préparation a alors été placée à 37°C pour une période de 2 h, puis la réaction a été arrêtée avec du EDTA et le tampon de ribosonde (0,1 M Tris pH 7,4, 0,15 M NaCl, 12,5 mM EDTA et 0,2 % SDS) a été ajouté. La sonde a ensuite été purifiée sur une colonne G25 Quick spin RNA (Roche) et conservée sur la glace jusqu'à son utilisation (le jour même).

La préhybridation se fait en travaillant RNase-free (solutions avec eau DEPC autoclavée) et commence par le séchage rapide des coupes au séchoir à cheveux à l'air froid. Les sections sont ensuite fixées dans la paraformaldéhyde 4% 10 min puis rincées deux fois au PBS 0,1 M. Elles sont ensuite incubées dans une solution fraîche de

triéthanolamine 0,1 M et anhydre acétique 0,25 % pour 10 min. Elles sont enfin rincées dans le 2X SSC (0,3 M NaCl, 0,03 M citrate de Na, pH 7,0), déshydratées dans des concentrations croissantes d'éthanol (30, 60 et 95 %) et séchées à l'air.

Pendant que les coupes sèchent, la sonde d'oligonucléotides est dénaturée 10 min à 65°C puis mélangée au mixte d'hybridation (10 mM DTT, 50 % formamide, 10 % dextran sulfate, 1X Denhardt's, 4X SSC, 0,25 mg/ml de tRNA de levure, 0,5 mg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé 10 min à 100°C) à une concentration de  $1 \times 10^7$  cpm/ml. On dépose 150 µl de solution d'hybridation par coupe et l'on recouvre d'une lamelle. Le tout est incubé dans le four à hybridation pour la nuit à 40°C dans une chambre humide saturée en 50 % formamide/4X SSC. Le lendemain matin (on ne travaille plus RNase-free), les lamelles sont décollées dans le 4X SSC et les coupes sont rincées deux fois dans le 2X SSC. Par la suite, on fait successivement un lavage de 30 min au 2X SSC à  $T_p$ , un lavage de 2 h au 1X SSC à  $T_p$ , un lavage de 30 min au 0,5X SSC à 37°C, un lavage de 30 min au 0,5X SSC à  $T_p$  et enfin un lavage de 30 min au 0,5X SSC à 50°C. Finalement, les sections sont déshydratées dans des concentrations croissantes d'éthanol et d'acétate d'ammonium 300 mM et séchées à l'air avant d'être exposées avec des standards de  $^{14}\text{C}$  (Amersham) à des films sensibles au  $^{35}\text{S}$  (BioMax MR films, Kodak) pendant 14 jours. Les films sont développés dans un développeur automatique (X-omat, Kodak) puis quantifiés à l'aide du logiciel NIH Image.

#### L'hybridation pour la substance P

L'hybridation pour la substance P (ou préprotachykinine), quant à elle, est faite à partir d'une sonde ARN pour le rat mais fonctionnant également chez le macaque d'après des tests antérieurs. La sonde correspond aux 20 premières bases incluant le codon d'initiation de l'ADN codant pour la substance P chez le rat (Carter et Krause, 1990). La ribosonde a été marquée au  $^{35}\text{S}$ -UTP (NEG-039H) à l'aide d'un kit enzymatique Riboprobe System™ (Promega) avec la T7 ARN polymérase. Après la synthèse, la préparation a été à 37°C durant 1h30, puis a été incubée 10 min de plus à 37°C avec de la DNase afin de détruire le plasmide. De l'EDTA 0,5 M à pH 8 (arrêter la réaction) et le tampon de ribosonde ont ensuite été ajoutés. La sonde a été purifiée sur une colonne G50 MiniQuick

spin RNA (Roche) et gardée sur la glace jusqu'à utilisation (le jour même). La pré-hybridation se fait en travaillant RNase-free (solutions avec eau DEPC autoclavée) et commence par le séchage rapide des coupes au séchoir à cheveux à l'air froid. Les sections sont ensuite fixées dans la paraformaldéhyde 4% 20 min puis rincées deux fois au PBS 0,1 M. Les sections sont alors incubées 10 min à 37°C avec la protéinase K (100 mM de TRIS pH 8,0, 50 mM d'EDTA et 1 µg/ml de protéinase K) puis rincées deux fois à l'eau DEPC. Elles sont ensuite incubées pour 10 min dans une solution fraîche de triéthanolamine 0,1 M et anhydre acétique 0,25 %. Elles sont enfin rincées deux fois dans le 2X SSC, déshydratées dans des concentrations croissantes d'éthanol (30, 60 et 95 %) et séchées à l'air.

La sonde d'ARNm complémentaire est dénaturée à 80°C 5 min avant d'être mélangée au mixte d'hybridation (10 mM DTT, 50 % formamide, 10 % dextran sulfate, 1X Denhardt's, 4X SSC, 0,1 mg/ml de tRNA de levure, 0,1 mg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé 10 min à 100°C) à une concentration de  $4 \times 10^7$  cpm/ml. On dépose 150 µl de solution d'hybridation par coupe et l'on recouvre d'une lamelle. Le tout est incubé pour la nuit sur des plaques chauffantes à 55°C. Le lendemain (on ne travaille plus RNase-free), les lamelles sont décollées dans le 4X SSC et les coupes sont rincées une fois dans le 2X SSC. Elles sont ensuite traitées avec de la RNase A (5 M NaCl, 0,1 M TRIS pH 7,4 et 20 µg/ml RNase A) 1 h à 37°C et rincées deux fois dans l'eau distillée. Par la suite, les sections sont lavées 15 min au 2X SSC à  $T_p$ , 30 min au 0,5X SSC à 55°C, 30 min au 0,1X SSC à 55°C et 5 min au 0,1X SSC à  $T_p$ . Finalement, les sections sont déshydratées dans des concentrations croissantes d'éthanol et d'ammonium acétate 300 mM et séchées à l'air avant d'être exposées avec des standards de  $^{14}\text{C}$  (Amersham) à des films sensibles au  $^{35}\text{S}$  (BioMax MR films, Kodak) pendant 6 jours. Les films sont développés dans un développeur automatique (X-omat, Kodak) puis quantifiés à l'aide du logiciel NIH Image.

### 2.6.5 Quantifications

Les zones quantifiées pour chaque coupe ont été la zone du putamen située à l'extérieur de la canule (dite latérale), la zone du putamen située à l'intérieur de la canule (dite médiale) et le noyau caudé dans son entier. Une lame contenant deux coupes séparées

de seulement 20  $\mu\text{m}$ , la moyenne de ces deux coupes a été prise pour faire les graphiques et l'erreur utilisée a été l'étendue, dans un but purement descriptif. Sauf dans le cas de HA84 où les coupes ne vont pas jusqu'au bout en caudal, les coupes couvrent l'entièreté du putamen et les graphiques aussi, le niveau 1 correspondant au niveau le plus rostral. Dans le cas de PA, PM, GA et GM, le putamen est aussi essentiellement couvert d'une extrémité à l'autre mais certaines coupes ont été laissées entre les différentes lames. Par ailleurs on présente une moyenne des deux hémisphères de chacun des singes ayant reçu l'antisens par rapport à la moyenne des singes ayant reçu l'ODN contrôle pour trois zones différentes (antérieure à la diffusion d'ODN donc plus rostrale, à l'intérieur du volume de diffusion des ODN et enfin postérieure à la zone de diffusion des ODN donc plus caudale) et l'erreur utilisée a été l'erreur standard.

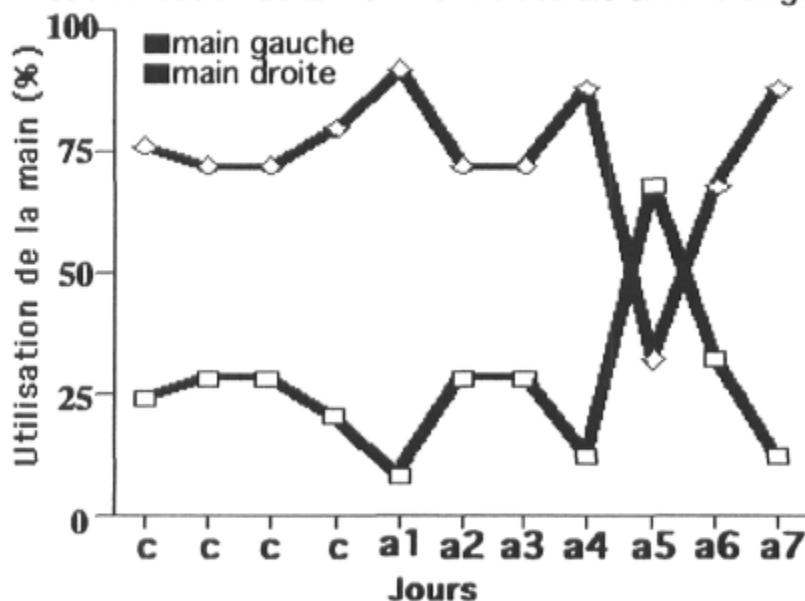
## CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

### 3.1 MACAQUE HA84

#### 3.1.1 Évaluation comportementale

Au test d'utilisation préférentielle de la main, contrairement à ce qui était attendu, le singe HA84 a augmenté son utilisation de la main contralatérale (droite) au putamen traité durant l'infusion continue d'ODN antisens, par rapport aux jours de contrôle (Figure 10).

L'infusion continue d'antisens au putamen gauche cause une augmentation de l'utilisation de la main contralatérale chez le singe HA84



Légende: c = jour de contrôle  
aX = jour sous infusion d'ODNs antisens

Figure 10 : Utilisation préférentielle de la main au test de la règle sans pot pour le macaque HA84 au test d'administration de quinpirole 0,1 mg/kg, le singe n'a pas présenté de différences facilement observables dans son comportement. Bien que l'effet du quinpirole ait été notable (sommolence au début suivie d'un niveau assez élevé d'activité locomotrice), il n'a pas été très fort et la dose a par conséquent été ajustée à la hausse pour les autres expériences (voir Matériel et méthode).

### 3.1.2 Évaluation biochimique

#### Révélation de la biotine

La révélation de la biotine a permis d'observer que l'ODN antisens diffuse sur l'équivalent de plus du tiers de l'aire du putamen en coupe frontale et sur plus de 2,8 mm en rostro-caudal. La canule a toutefois été placée en position trop médiane et chevauche le putamen (Figure 11).

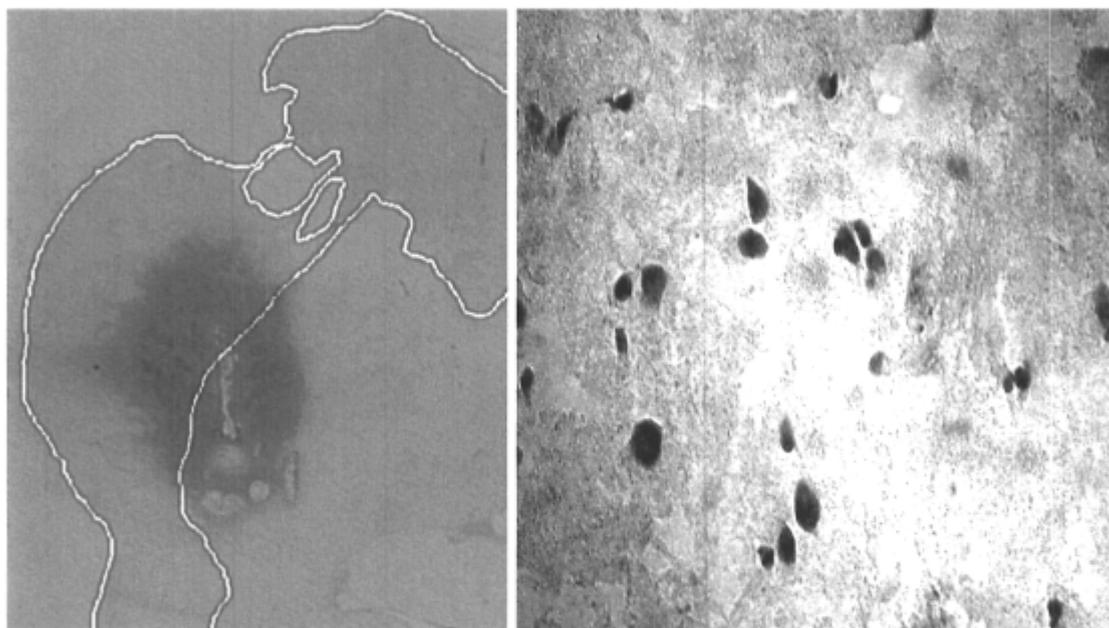


Figure 11 : Aire de diffusion de l'antisens marqué à la biotine.

Figure 12 : Vue au microscope de noyaux marqués à la biotine.

Par ailleurs, l'étude au microscope des coupes marquées à la biotine et colorées au Nissl a permis de démontrer que l'ODN antisens pénètre dans les noyaux des neurones du putamen (Figure 12). Le décompte des noyaux n'a montré aucune perte neuronale importante dans l'aire de diffusion de l'ODN antisens par rapport à l'aire vierge d'ODN, tel que le démontre la figure 13.

L'infusion continue d'antisens au putamen chez le macaque HA84 ne réduit pas le nombre de noyaux dans l'aire de diffusion de l'ODN par rapport à la zone à l'extérieur de l'aire de diffusion

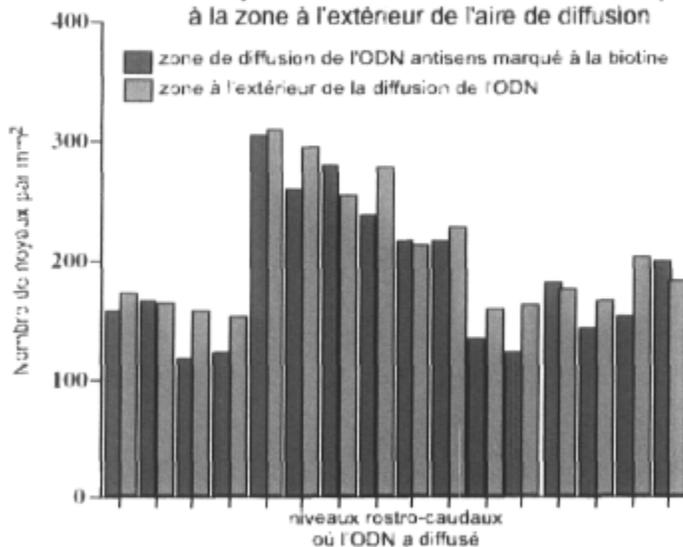


Figure 13 : Décompte des noyaux neuronaux au niveau de la zone de diffusion de l'antisens.

#### Essai de liaison à la raclopride (récepteurs D2)

Suite à un ajustement pour que les niveaux avant antisens soient semblables en valeur absolue, l'essai de liaison à la raclopride n'a pas permis de constater une baisse des récepteurs D2 du putamen au niveau de la zone de diffusion de l'antisens par rapport à la densité de récepteurs D2 mesurée chez un singe mâle normal pour le putamen médian et pour le putamen latéral. Le noyau caudé de HA84, qui n'a pas été touché par l'antisens, aurait toutefois un niveau proportionnellement plus élevé de récepteurs D2 que celui du mâle normal et une courbe rostro-caudale différente de celle de l'animal normal (en cloche pour HA84 et légèrement croissante pour le mâle normal, figures 14, 15 et 16).

**L'administration d'antisens D2 dans le putamen du macaque #84 ne change pas la densité de récepteurs D2 dans l'aire de diffusion de l'antisens par comparaison avec la densité relative mesurée chez un singe normal pour le putamen médian**

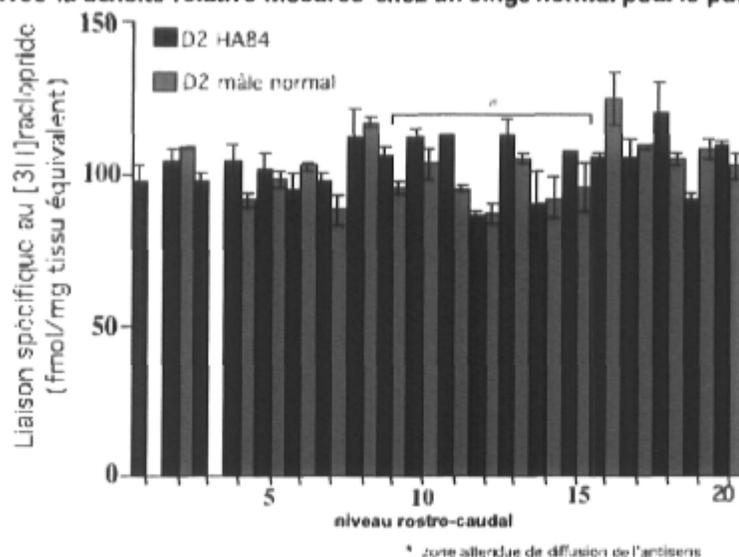


Figure 14 : Densité mesurée des récepteurs D2 dans le putamen médian de HA84 par rapport à la densité mesurée pour un macaque mâle normal.

**L'administration d'antisens D2 dans le putamen du macaque #84 ne baisserait pas la densité de récepteurs D2 dans l'aire de diffusion de l'antisens par comparaison avec la densité relative mesurée chez un singe normal pour le putamen latéral**

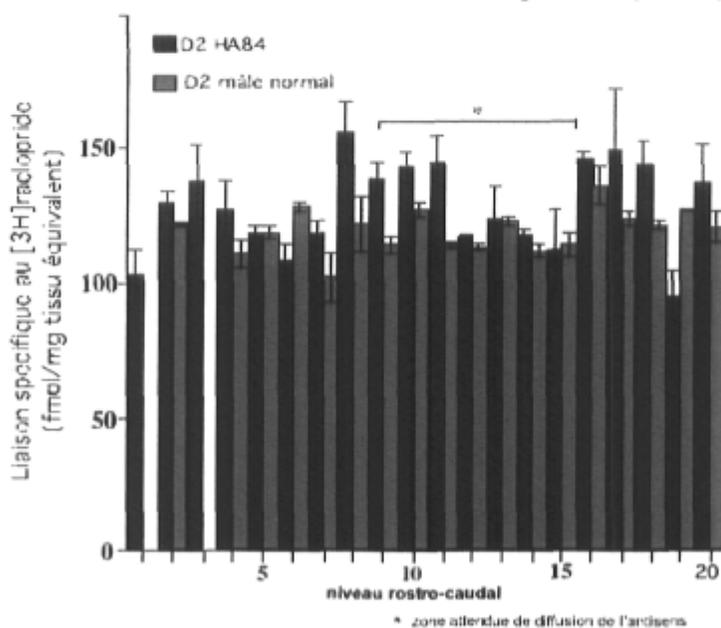


Figure 15 : Densité mesurée des récepteurs D2 dans le putamen latéral de HA84 par rapport à la densité mesurée pour un macaque mâle normal.

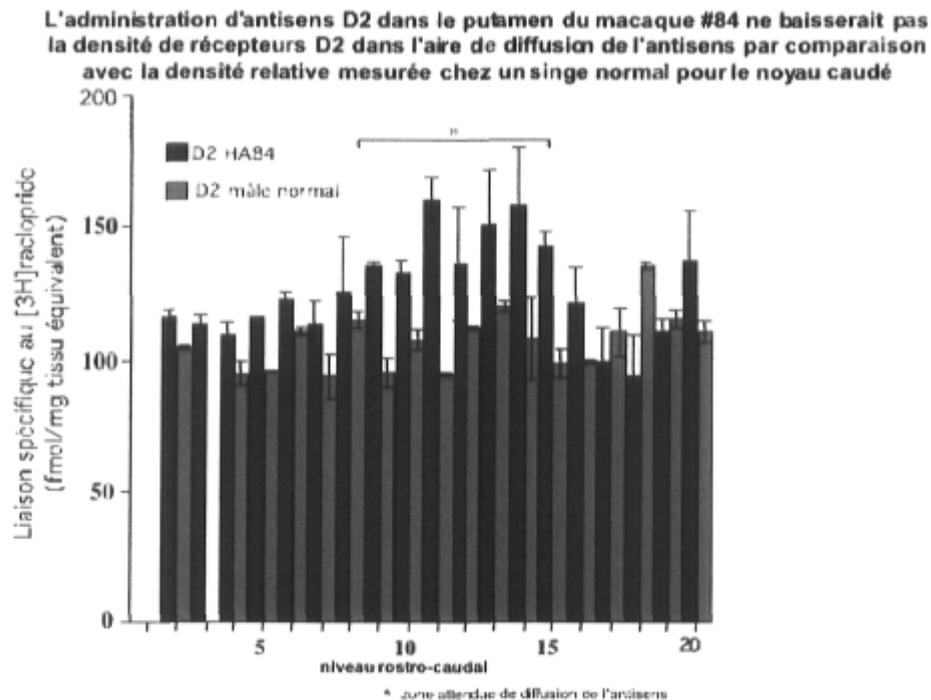


Figure 16 : Densité mesurée des récepteurs D2 dans le noyau caudé de HA84 par rapport à la densité mesurée pour un macaque mâle normal.

### Hybridation de la préproenképhaline

Contrairement aux résultats attendus, l'infusion continue d'antisens dans le putamen du macaque HA84 a causé une baisse de la préproenképhaline dans la région de diffusion de l'antisens pour le putamen médian (qui a reçu la majeure partie de l'antisens) et, dans une moindre mesure, le putamen latéral si l'on se fie à l'inflexion marquée de la courbe rostro-caudale à ce niveau. Le noyau caudé ne semble pas avoir subi une telle baisse (figures 17, 18, 19 et 20).



Figure 17 : Exemple représentatif d'autoradiogramme illustrant l'hybridation in situ de l'ARNm de la PPE sur une coupe frontale du cerveau du singe HA84 au niveau de la canule d'infusion de l'AS. Image en pseudocouleur générée avec le logiciel NIH image.

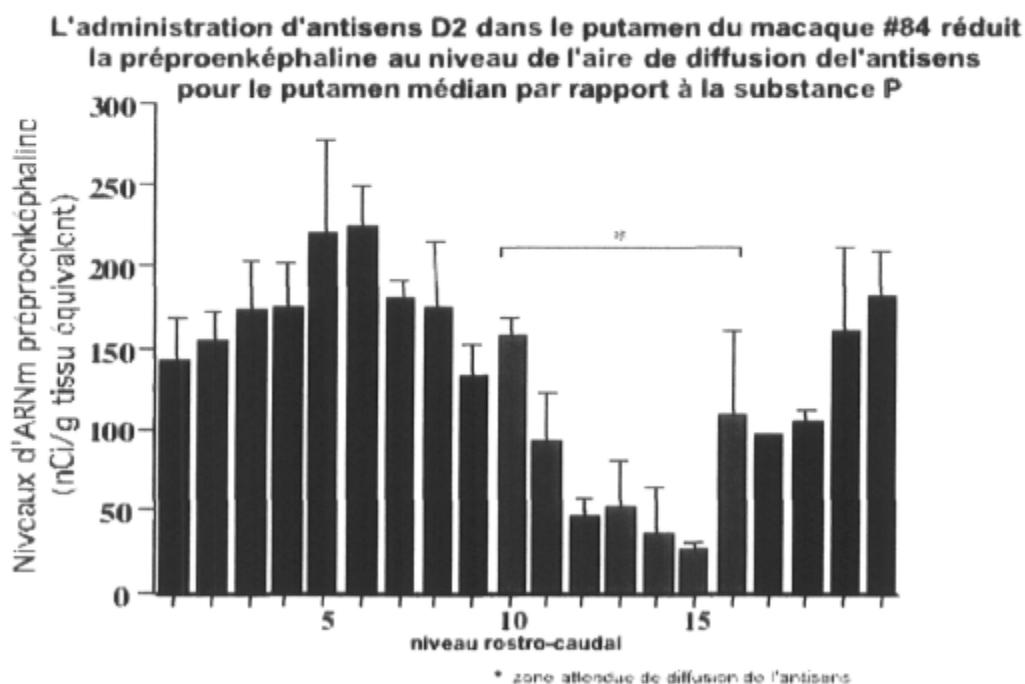


Figure 18 : Densité mesurée de préproenképhaline dans le putamen médian de HA84.

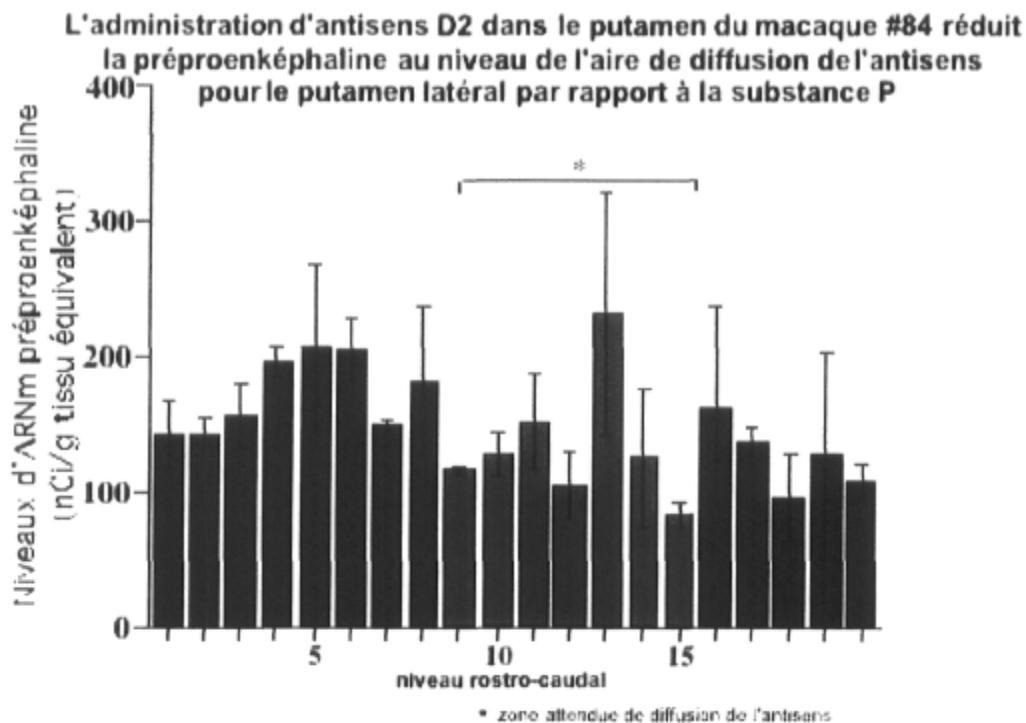


Figure 19 : Densité mesurée de préproenképhaline dans le putamen latéral de HA84

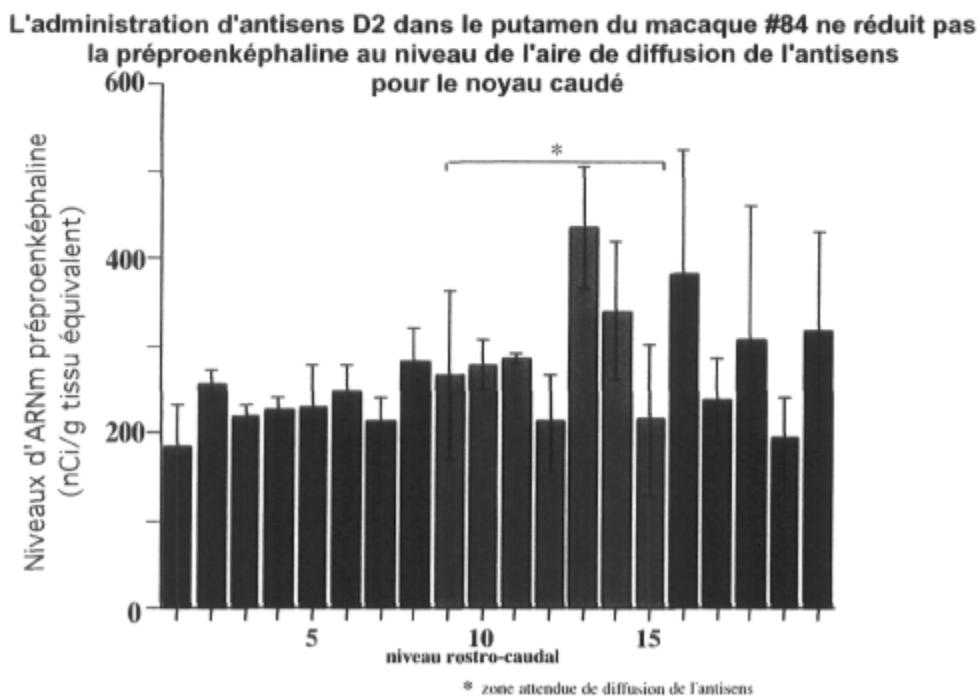


Figure 20 : Densité mesurée de préproenképhaline dans le noyau caudé de HA84.

### Hybridation de la substance P



Figure 21 : Hybridation de l'ARNm de la substance P sur une coupe frontale du cerveau de HA84 au niveau de la canule d'infusion de l'antisens.

L'hybridation de la substance P avec la sonde de rat a très bien fonctionné et n'a démontré aucune baisse notable des niveaux d'ARNm si l'on se fie à l'apparence générale de la courbe rostro-caudale, tant dans le putamen que dans le noyau caudé. Par ailleurs, la région médiane du putamen (qui a reçu la majeure partie de l'antisens) ne présente pas des niveaux plus bas d'ARNm pour la substance P que le putamen latéral, contrairement aux niveaux d'ARNm de la préproenképhaline (figures 21, 22, 23 et 24).

L'administration d'antisens D2 dans le putamen du macaque #84 ne réduit pas la substance P dans l'aire de diffusion de l'antisens par comparaison avec la préproenképhaline dans le putamen médian

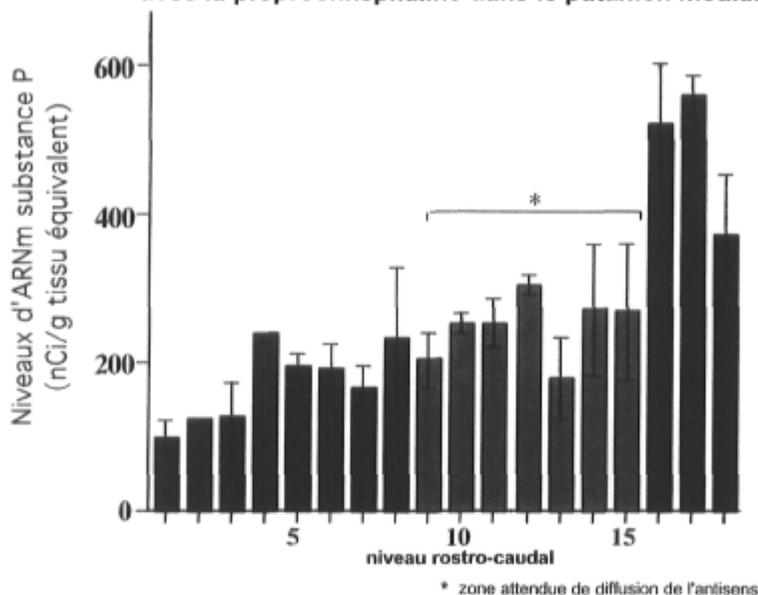


Figure 22 : Densité mesurée d'ARNm de substance P dans le putamen médian de HA84.

L'administration d'antisens D2 dans le putamen du macaque #84 ne réduit pas la substance P dans l'aire de diffusion de l'antisens par comparaison avec la préproenképhaline dans le putamen latéral

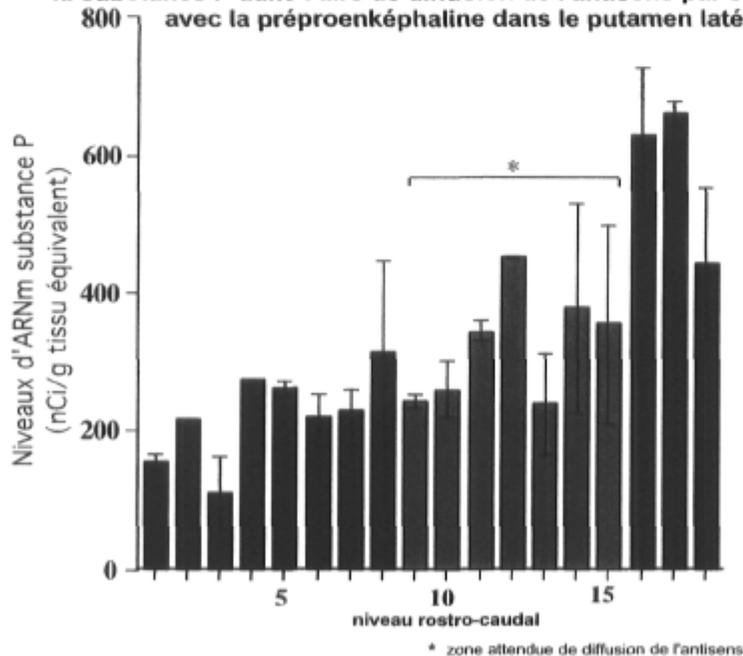


Figure 23 : Densité mesurée d'ARNm de substance P dans le putamen latéral de HA84.

**L'administration d'antisens D2 dans le putamen du macaque #84 ne réduit pas la substance P dans l'aire de diffusion de l'antisens par comparaison avec la préproenképhaline dans le noyau caudé**

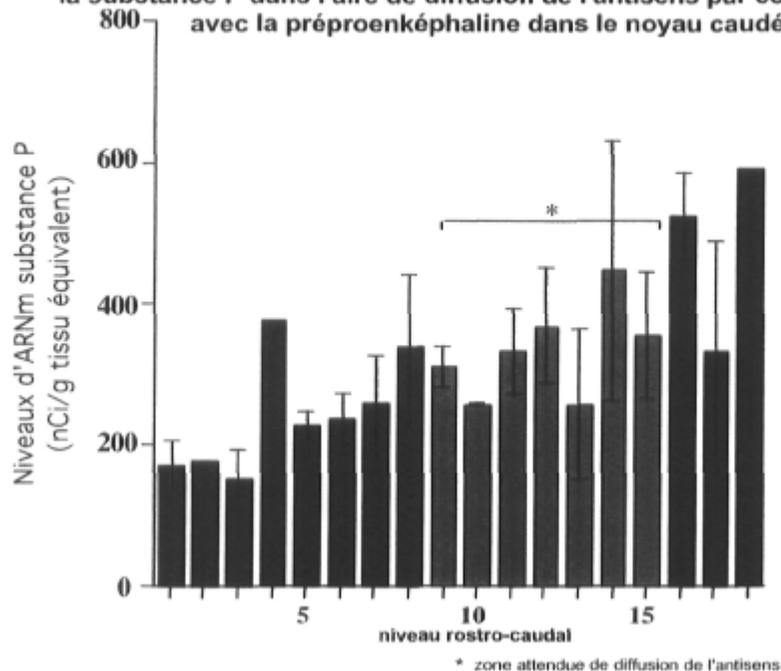


Figure 24 : Densité mesurée d'ARNm de substance P dans le noyau caudé de HA84.

## 3.2 MACAQUE MA55

### 3.2.1 Évaluation comportementale

Au test d'utilisation préférentielle de la main de la règle sans pot, conformément à ce qui était attendu, le singe MA55 a moins utilisé la main contralatérale (gauche) à l'hémisphère traité lors de l'infusion d'ODN antisens que lors des jours de contrôle (figure 25). Conséquemment, elle a augmenté son utilisation de la main contralatérale (droite) à l'hémisphère traité avec ODN contrôle, passant d'une moyenne de 12,3 % de main droite en contrôle à une moyenne de 29 % de main droite sous infusion continue d'ODN.

Au test de la règle avec pots, l'animal n'a pas changé son utilisation préférentielle de la main. L'utilisation de sa main gauche est restée entre 96 et 100 % pour toute la période d'expérimentation.

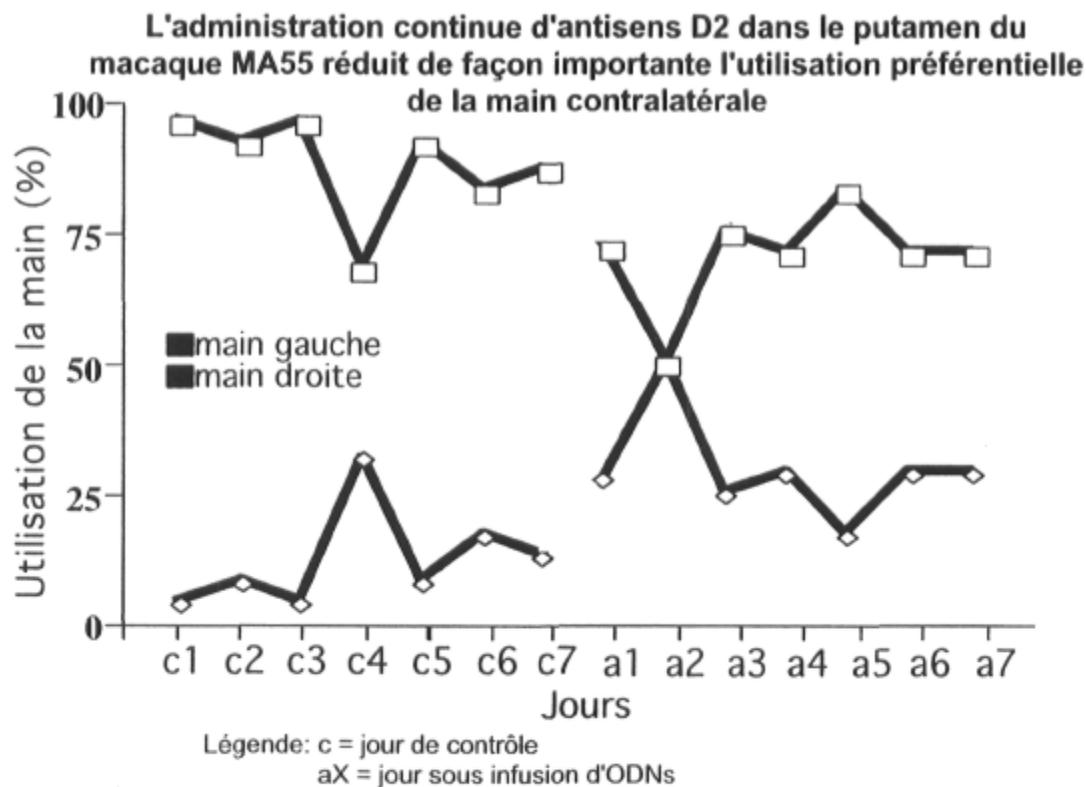


Figure 25 : Utilisation préférentielle de la main au test de la règle sans pot pour le macaque MA55.

Le test du mMAP n'a démontré aucune perte de vitesse lors de l'exécution de mouvements fins ou grossiers avec la main gauche ou la main droite lors de l'infusion des ODN, l'animal continuant même d'améliorer ses temps durant l'infusion des ODN antisens et contrôle (Figure 26).

**L'infusion continue d'antisens dans le putamen du macaque ne réduit pas la vitesse d'exécution de mouvements fins ou grossiers du membre antérieur par rapport à l'infusion continue d'ODN contrôle ou par rapport aux jours sans ODNs**

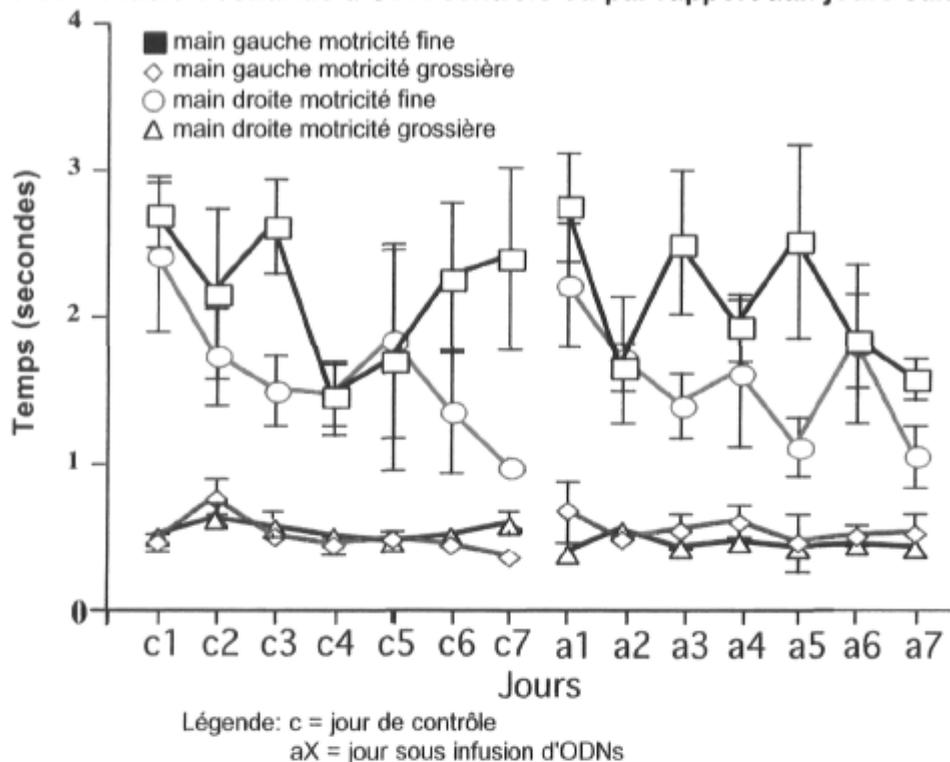


Figure 26 : Vitesse d'exécution des membres antérieurs de MA55 mesurée avec le mMAP, avec tige en forme de point d'interrogation et carottes trouées.

On remarque que MA55 est plus rapide de la main droite que de la main gauche pour exécuter les mouvements fins avant les ODN et que la différence entre les deux mains s'atténue avec le temps, malgré l'infusion d'antisens contralatéralement à la main gauche (figure 26).

Lors des injections de contrôle de l'agoniste dopaminergique D2-D3 quinpirole, le macaque MA55 a développé un comportement de climbing (grimpage) facilement observable et différent de son comportement à l'état normal. Durant la période d'infusion des ODN, ce comportement de climbing induit par le quinpirole a grandement décru et est revenu au niveau de base. Le niveau de climbing de base (sans injection d'agoniste dopaminergique) n'a toutefois pas été modifié durant l'infusion des ODN (figure 27).

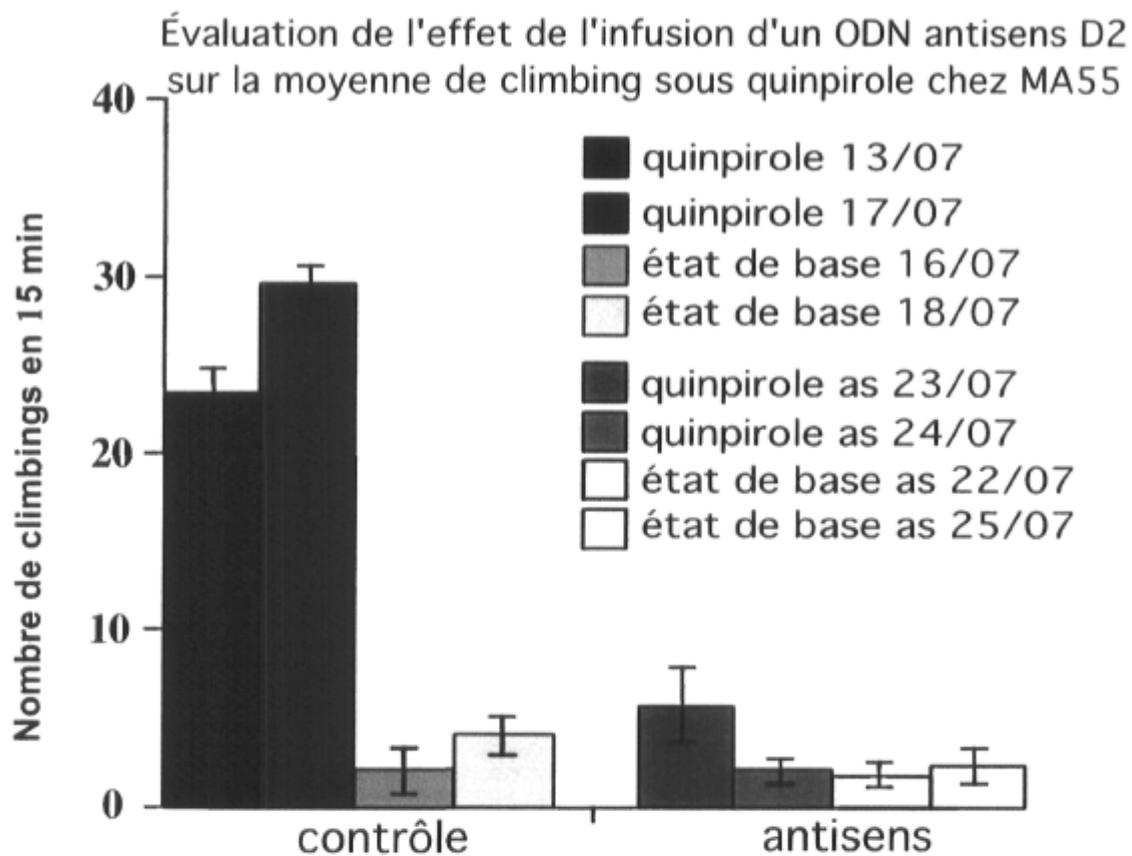


Figure 27 : Nombre de climbings en 15 min chez le macaque MA55, sous quinpirole et à l'état normal, avant et après infusion d'ODN.

### 3.2.2 Évaluation biochimique

Les différentes techniques exécutées sur les coupes de cerveau de MA55 ont permis de visualiser les canules, qui étaient tel que désiré au centre du putamen, la canule antisens étant un peu plus médiale (0,5-1 mm) que la canule contrôle (figure 28).

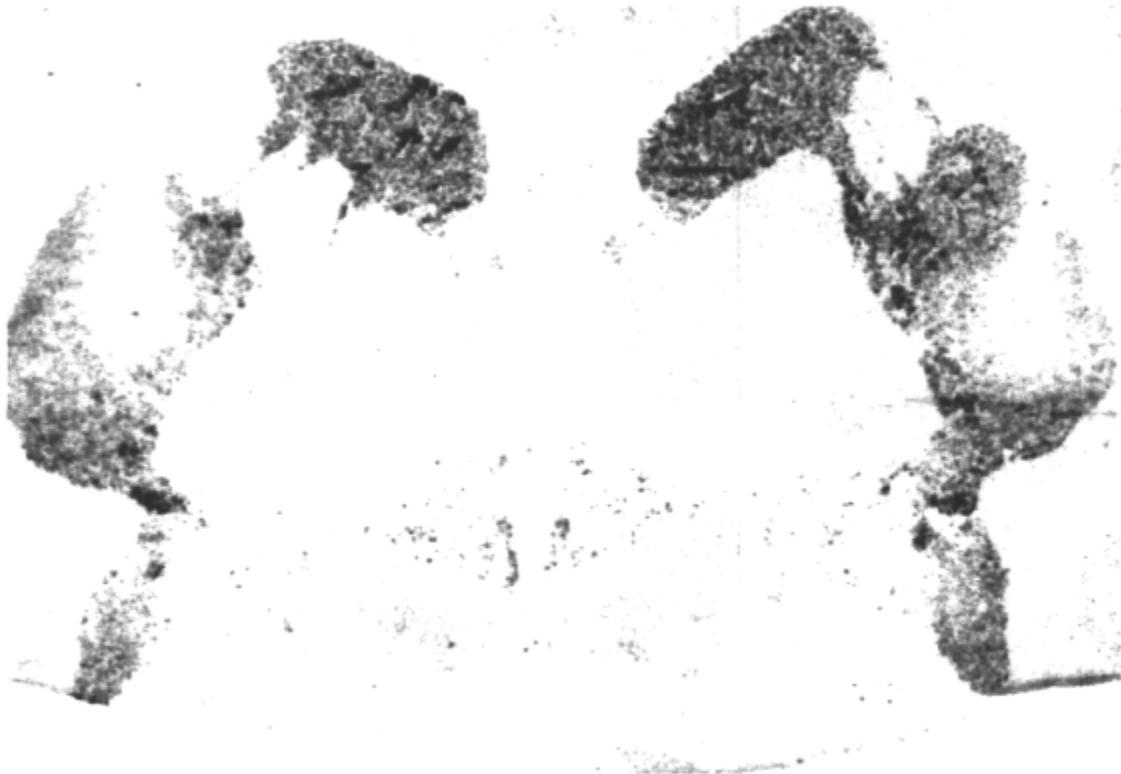


Figure 28 : Hybridation de l'ARNm de la substance P sur une coupe frontale vue de face du cerveau de MA55 au niveau de la canule d'infusion de l'antisens (hémisphère droit) et de la canule d'infusion du missens (hémisphère gauche).

### Essai de liaison à la raclopride

L'essai de liaison à la raclopride a démontré une baisse (plus de 15%) de la densité des récepteurs D2 du côté antisens par rapport au côté contrôle au niveau de la zone de diffusion des ODN dans le putamen médian. Une telle différence entre le côté antisens et le côté contrôle est absente aux niveaux plus rostraux et moindre aux niveaux plus caudaux que la zone de diffusion supposée de l'antisens. Dans le putamen latéral, on note une baisse plus légère des D2 dans l'hémisphère antisens par rapport à l'hémisphère contrôle au niveau de la zone de diffusion des ODN. Cette baisse est aussi absente dans les niveaux plus rostraux que la zone de diffusion, mais elle se maintient dans les niveaux plus caudaux. Dans le noyau caudé, on observe une plus grande variabilité entre le côté antisens et le côté contrôle, le côté antisens ayant une courbe en « U » beaucoup plus accentuée que le côté contrôle et la différence de densité de récepteurs d'un côté par rapport à l'autre étant la plus marquée pour les zones en-dehors de la zone de diffusion de l'antisens (figures 29, 30 et 31).

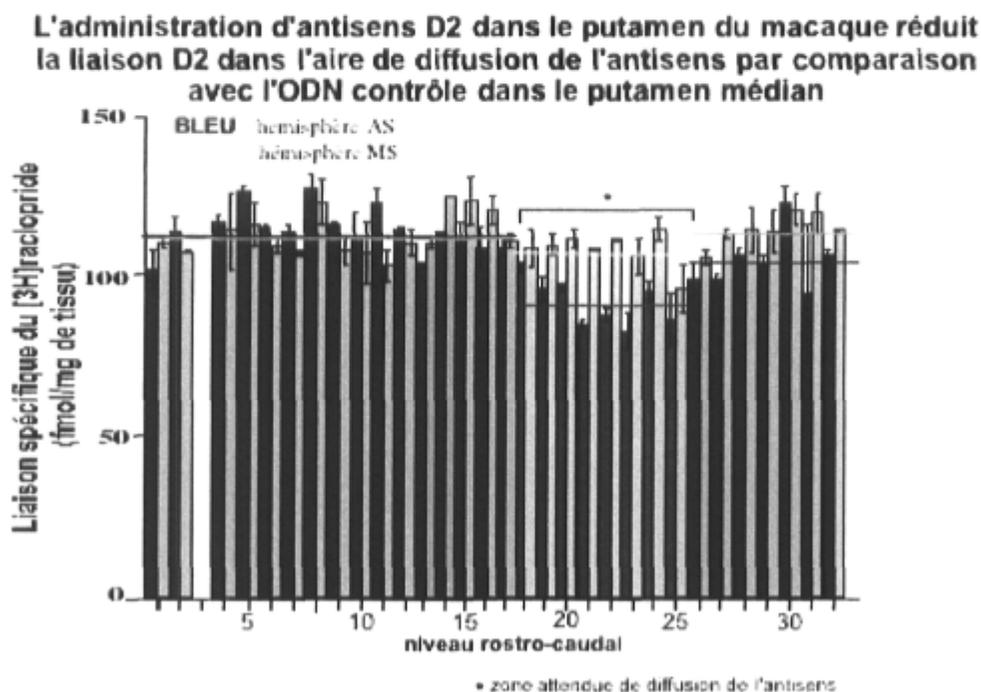


Figure 29 : Densité mesurée des récepteurs D2 dans le putamen médian de MA55 dans l'hémisphère traité à l'ODN antisens et dans l'hémisphère traité à l'ODN contrôle.

**L'administration d'antisens D2 dans le putamen du macaque réduit légèrement la liaison D2 dans l'aire de diffusion de l'antisens par comparaison avec l'ODN contrôle dans le putamen latéral**

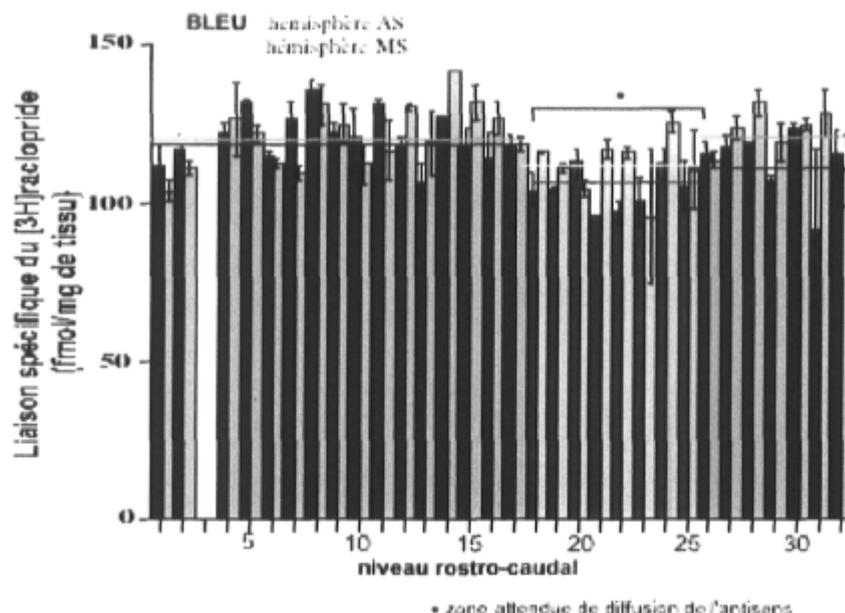


Figure 30 : Densité mesurée des récepteurs D2 dans le putamen latéral de MA55 dans l'hémisphère traité à l'ODN antisens et dans l'hémisphère traité à l'ODN contrôle.

Essai de liaison au SCH-23390

L'essai de liaison au SCH-23390 a lui aussi démontré, contrairement à ce qui était attendu, une baisse (plus de 10%) de la densité des récepteurs (D1 dans ce cas-ci) du côté antisens par rapport au côté contrôle au niveau de la zone de diffusion des ODN dans le putamen médian. Cette différence entre le côté antisens et le côté contrôle est aussi visible mais moindre dans les niveaux plus caudaux, et est absente dans les niveaux plus rostraux que la zone de diffusion supposée de l'antisens, tout comme dans le cas des récepteurs D2.

**L'administration d'antisens D2 dans le putamen du macaque réduit légèrement la liaison D2 dans l'aire de diffusion de l'antisens et plus caudalement par comparaison avec l'ODN contrôle dans le noyau caudé**

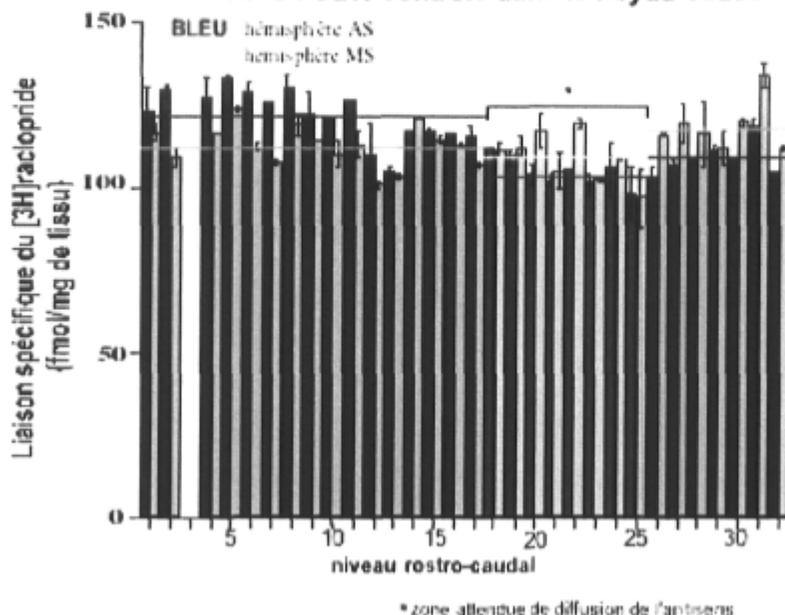


Figure 31 : Densité mesurée des récepteurs D2 dans le noyau caudé de MA55 dans l'hémisphère traité à l'ODN antisens et dans l'hémisphère traité à l'ODN contrôle.

Dans le putamen latéral, on note une baisse plus légère des D1 dans l'hémisphère antisens par rapport à l'hémisphère contrôle au niveau de la zone de diffusion des ODN. Tout comme pour l'essai de liaison à la raclopride, la baisse est aussi absente dans les niveaux plus rostraux que la zone de diffusion et contrairement à la courbe de densité des D2, la baisse ne se maintient pas dans les niveaux plus caudaux. Dans le noyau caudé, on observe une plus grande variabilité entre le côté antisens et le côté contrôle, le côté antisens ayant une courbe en « U » et le côté contrôle une courbe faiblement croissante. La différence de densité de récepteurs D1 d'un côté par rapport à l'autre est la plus accentuée pour la zone située plus en caudal que la région de diffusion de l'antisens (figures 32, 33 et 34).

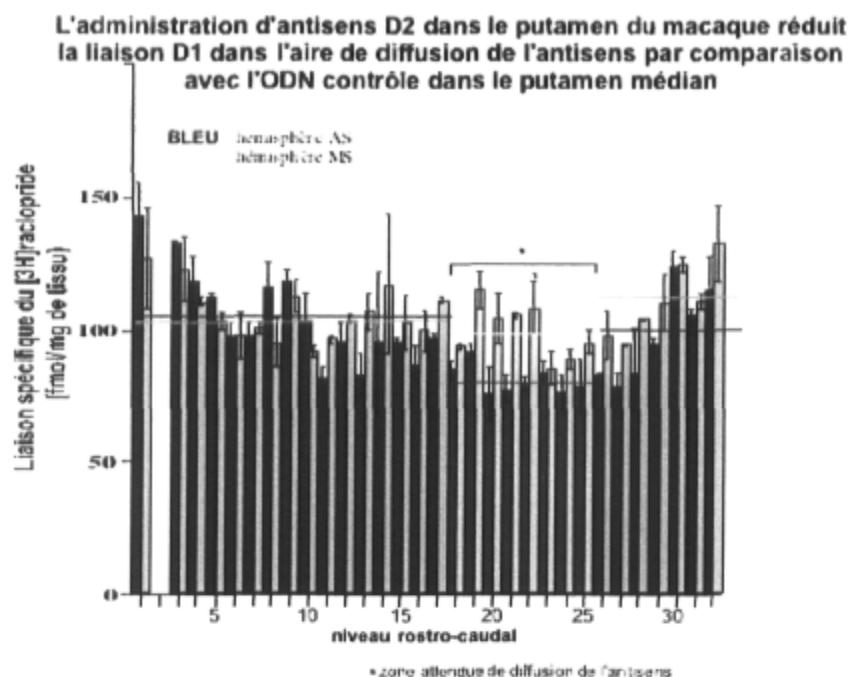


Figure 32 : Densité mesurée des récepteurs D1 dans le putamen médian de MA55 dans l'hémisphère traité à l'ODN antisens et dans l'hémisphère traité à l'ODN contrôle.

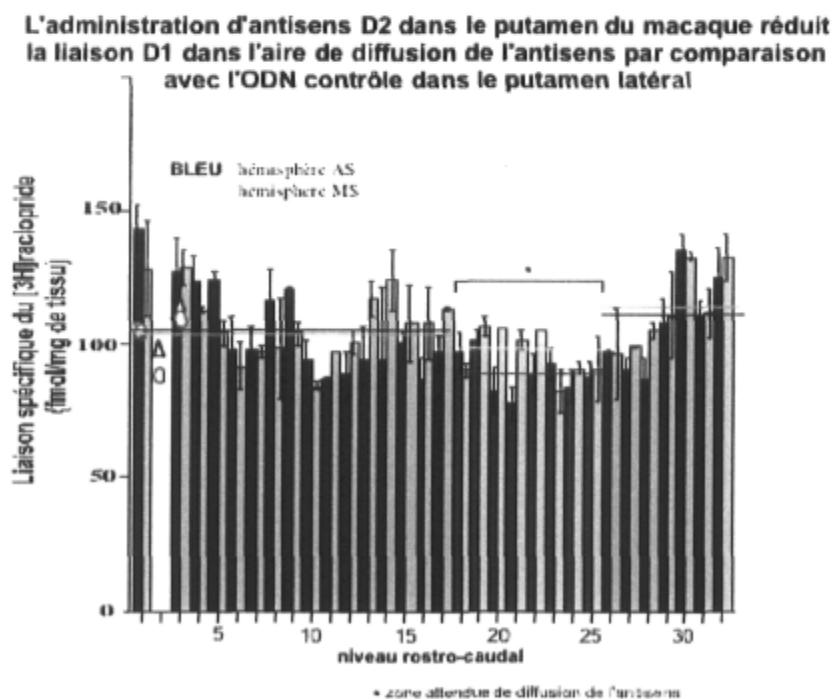


Figure 33 : Densité mesurée des récepteurs D1 dans le putamen médian de MA55 dans l'hémisphère traité à l'ODN antisens et dans l'hémisphère traité à l'ODN contrôle.

Effet de l'administration d'antisens D2 dans le putamen du macaque MA55 sur la liaison D1, par comparaison avec l'ODN contrôle, dans le noyau caudé

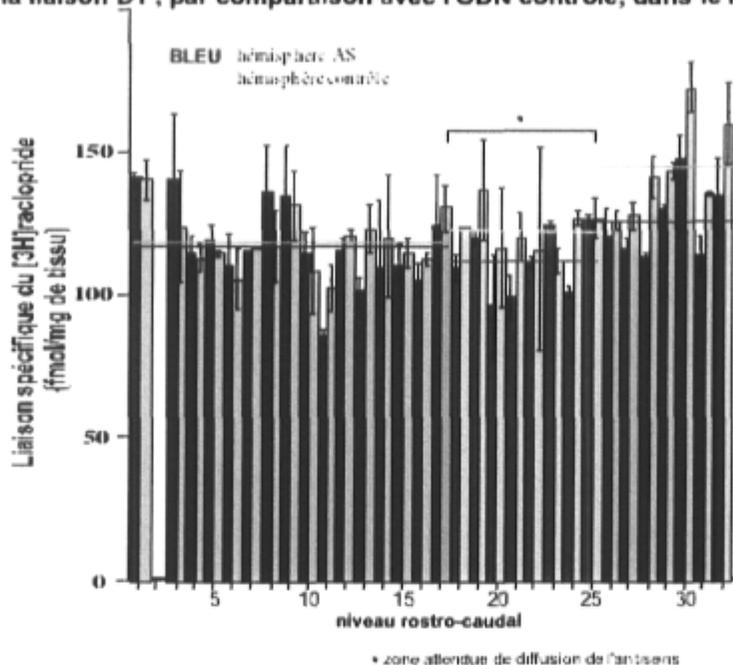


Figure 34 : Densité mesurée des récepteurs D1 dans le noyau caudé de MA55 dans l'hémisphère traité à l'ODN antisens et dans l'hémisphère traité à l'ODN contrôle

#### Essai de liaison au R(+)-7-hydroxy-DPAT

L'essai de liaison au R(+)-7-hydroxy-DPAT démontre une discrète baisse de la densité des récepteurs D3 dans le putamen médian, du côté antisens par rapport au côté contrôle, entre le niveau plus rostral et le niveau de la zone de diffusion des ODN. Cette différence entre le côté antisens et le côté contrôle n'est plus visible dans les niveaux plus caudaux, et est inverse dans les niveaux plus rostraux que la zone de diffusion supposée de l'antisens.

Dans le putamen latéral, on note une densité plus élevée des D3 dans l'hémisphère antisens par rapport à l'hémisphère contrôle de façon uniforme le long de l'axe rostro-caudal. Dans le noyau caudé, on observe une variabilité faible, avec des valeurs un peu plus élevées du côté antisens que du côté contrôle au niveau plus rostral et des valeurs identiques d'un côté comme de l'autre dans la région de diffusion de l'antisens ainsi que dans la région plus caudale. La différence de densité de récepteurs D3 d'un côté par rapport

à l'autre est la plus marquée pour la zone située rostralement à la région de diffusion de l'antisens (figures 35, 36 et 37).

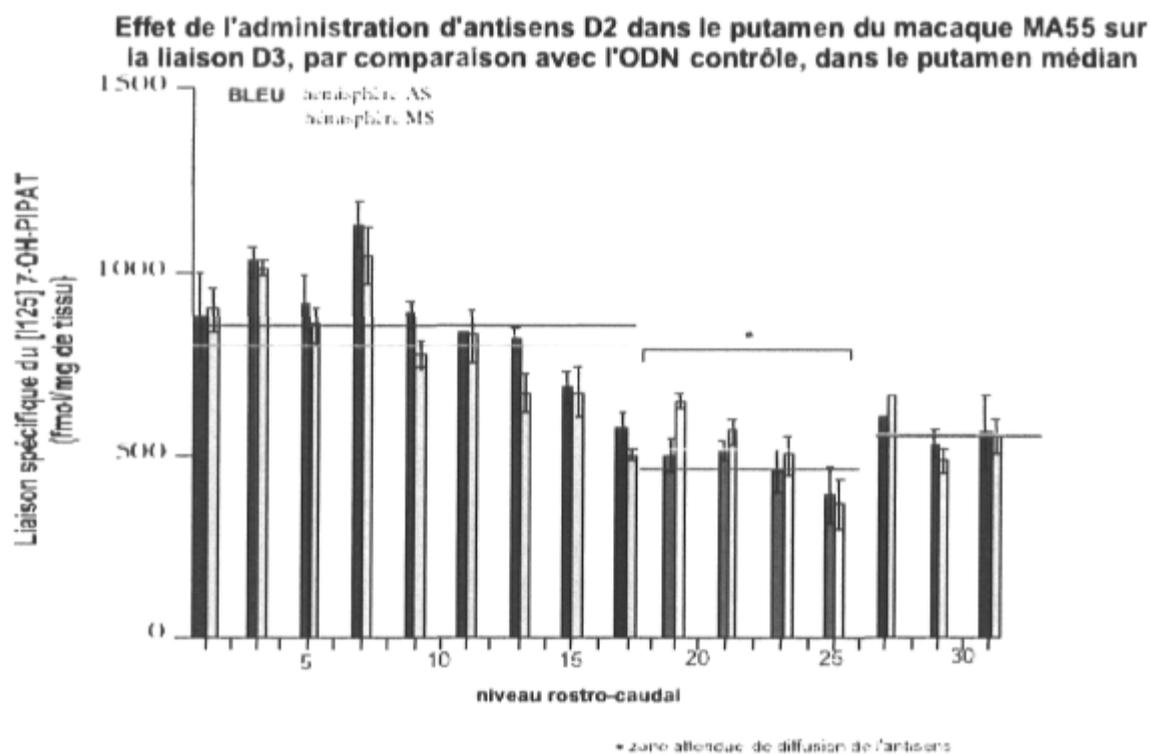


Figure 35 : Densité mesurée des récepteurs D3 dans le putamen médian de MA55 dans l'hémisphère traité à l'ODN antisens et dans l'hémisphère traité à l'ODN contrôle.

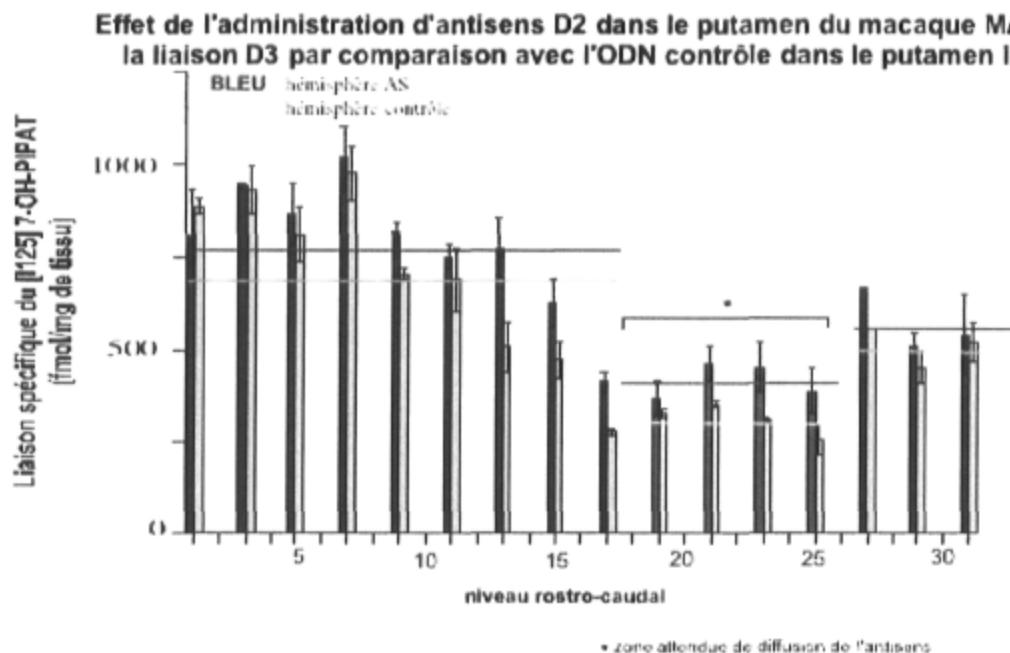


Figure 36 : Densité mesurée des récepteurs D3 dans le putamen latéral de MA55 dans l'hémisphère traité à l'ODN antisens et dans l'hémisphère traité à l'ODN contrôle.

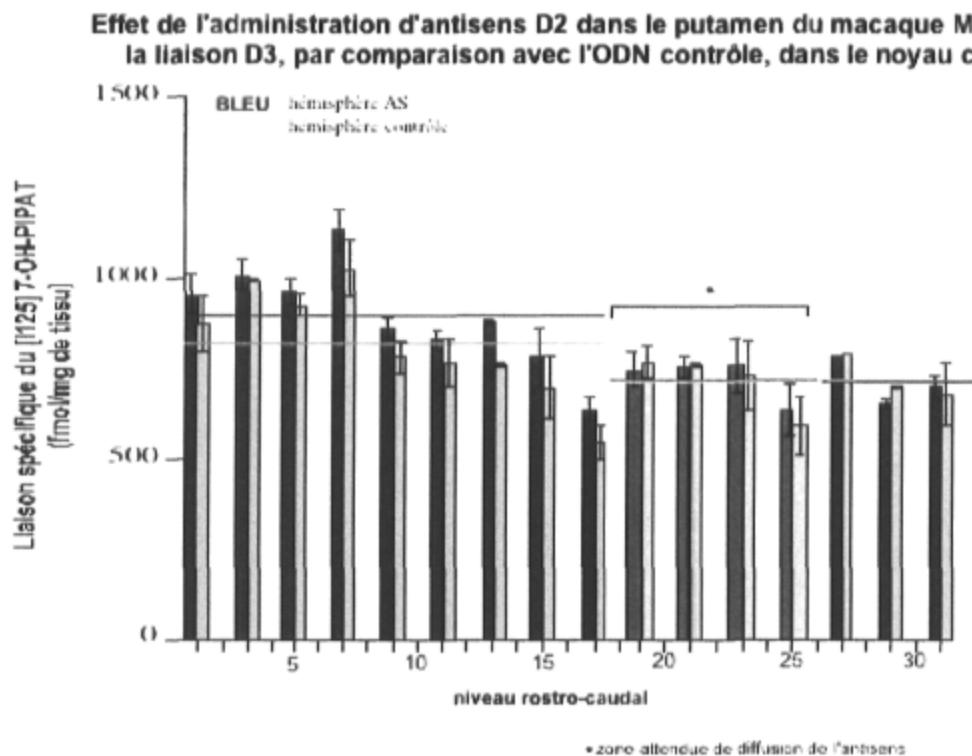


Figure 37 : Densité mesurée des récepteurs D3 dans le noyau caudé de MA55 dans l'hémisphère traité à l'ODN antisens et dans l'hémisphère traité à l'ODN contrôle.

### Hybridation de la préproenképhaline

L'hybridation de la préproenképhaline n'a permis d'observer que des différences mineures entre le côté antisens et le côté contrôle, les niveaux d'ARNm étant plus bas du côté antisens dans la région de diffusion de l'antisens et du côté contrôle dans la région plus caudale. Pour le putamen latéral, on remarque des niveaux d'ARNm pour la préproenképhaline plus élevés tout au long du gradient rostro-caudal pour l'hémisphère traité à l'antisens par rapport à celui traité à l'ODN contrôle. Le noyau caudé montre également une élévation de la densité de préproenképhaline du côté antisens, cette élévation étant toutefois beaucoup plus discrète au niveau plus rostral. Par ailleurs, l'allure générale des courbes montre une inflexion beaucoup moins accentuée au niveau de l'aire de diffusion des ODN que dans le cas de HA84 (figures 38, 39 et 40).

#### Effet de l'administration d'antisens D2 dans le putamen du macaque MA55 sur l'hybridation de la préproenképhaline, par comparaison avec l'ODN contrôle, dans le putamen médian

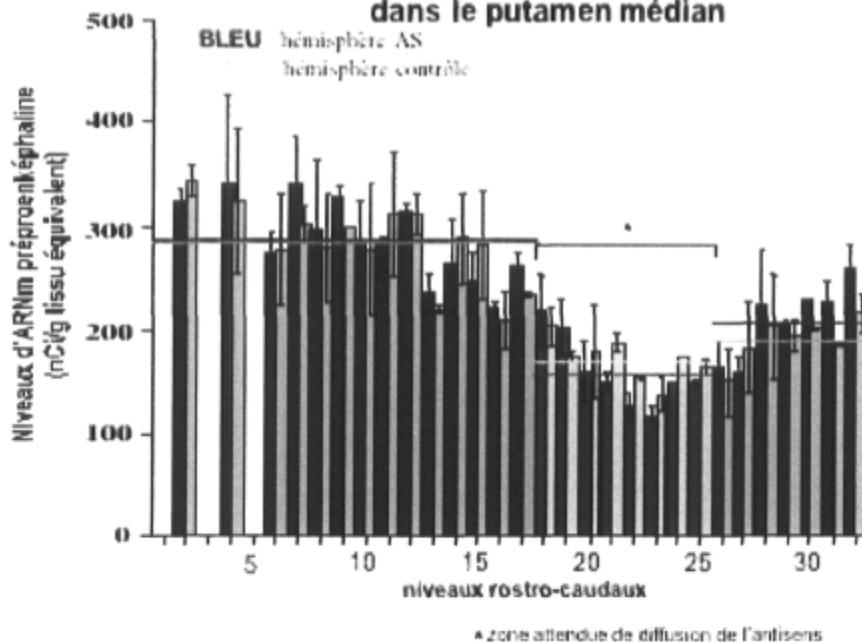


Figure 38 : Densité mesurée de préproenképhaline dans le putamen médian de MA55.

**Effet de l'administration d'antisens D2 dans le putamen du macaque MA55 sur l'hybridation de la préproenképhaline, par comparaison avec l'ODN contrôle, dans le putamen latéral**

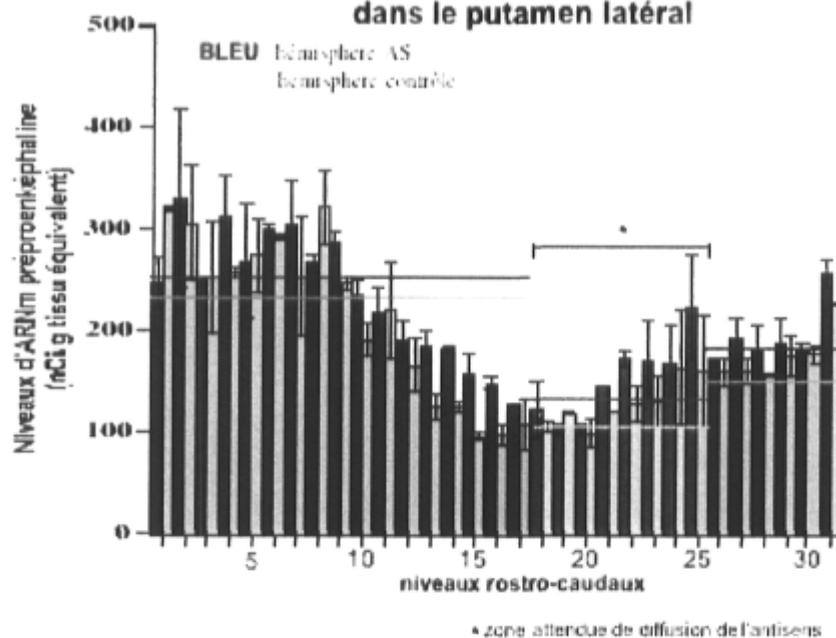


Figure 39 : Densité mesurée de préproenképhaline dans le putamen latéral de MA55.

**Effet de l'administration d'antisens D2 dans le putamen du macaque MA55 sur l'hybridation de la préproenképhaline, par comparaison avec l'ODN contrôle, dans le noyau caudé**

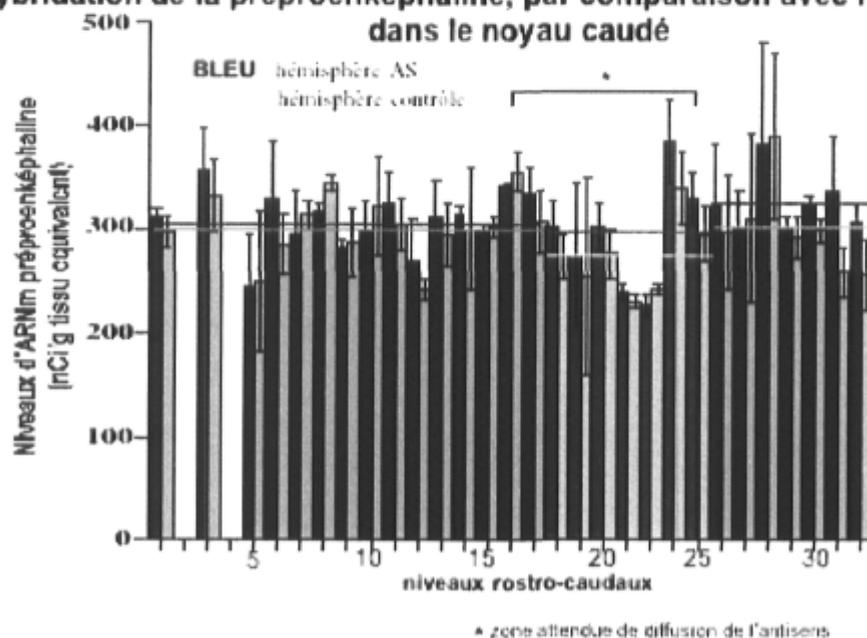


Figure 40 : Densité mesurée de préproenképhaline dans le noyau caudé de MA55.

### Hybridation de la substance P

Pour le putamen médian, l'hybridation de la substance P a démontré une certaine baisse des niveaux d'ARNm vis-à-vis de l'aire de diffusion supposée des ODN du côté antisens, et la courbe rostro-caudale du côté antisens forme un « U » alors que la courbe contrôle est très discrètement décroissante. Dans le cas du putamen latéral, on note une légère augmentation des niveaux de préprotachykinine du côté de l'antisens dans la région de diffusion des ODN et dans la région plus caudale, et l'apparence générale de la courbe rostro-caudale est similaire pour les deux hémisphères. Par ailleurs, le noyau caudé présente des différences mineures d'un côté à l'autre, la courbe antisens étant pratiquement constante en rostro-caudal, alors que la courbe contrôle présente un petit gradient rostro-caudal croissant des niveaux d'ARNm pour la substance P (figures 41, 42 et 43).

#### Effet de l'administration continue d'antisens D2 dans le putamen du macaque MA55 sur l'hybridation de l'ARNm de la substance P, par comparaison avec l'ODN contrôle, dans le putamen médian

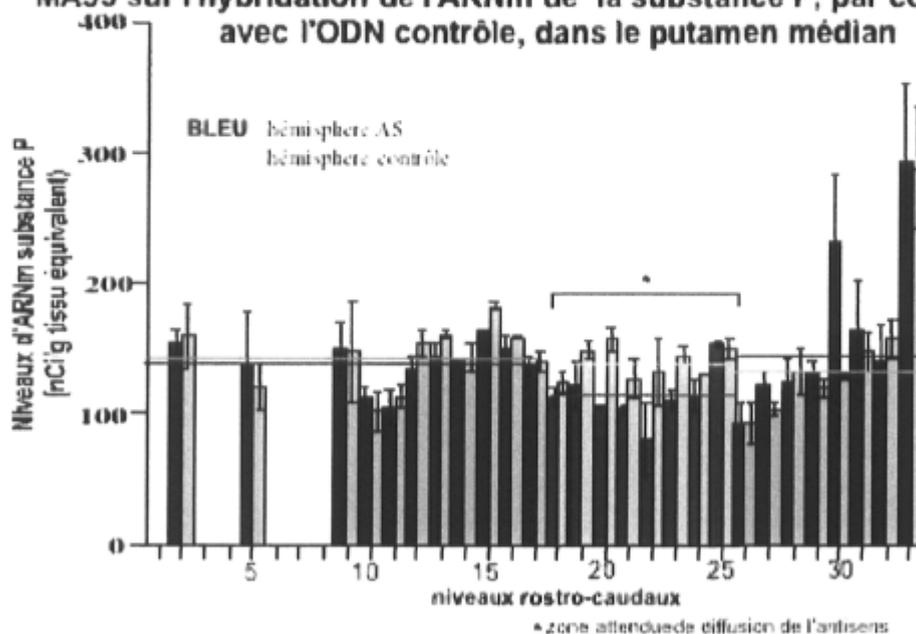


Figure 41 : Densité mesurée d'ARNm de substance P dans le putamen médian de MA55.

**Effet de l'administration continue d'antisens D2 dans le putamen du macaque MA55 sur l'hybridation de l'ARNm de la substance P, par comparaison avec l'ODN contrôle, dans le putamen latéral**

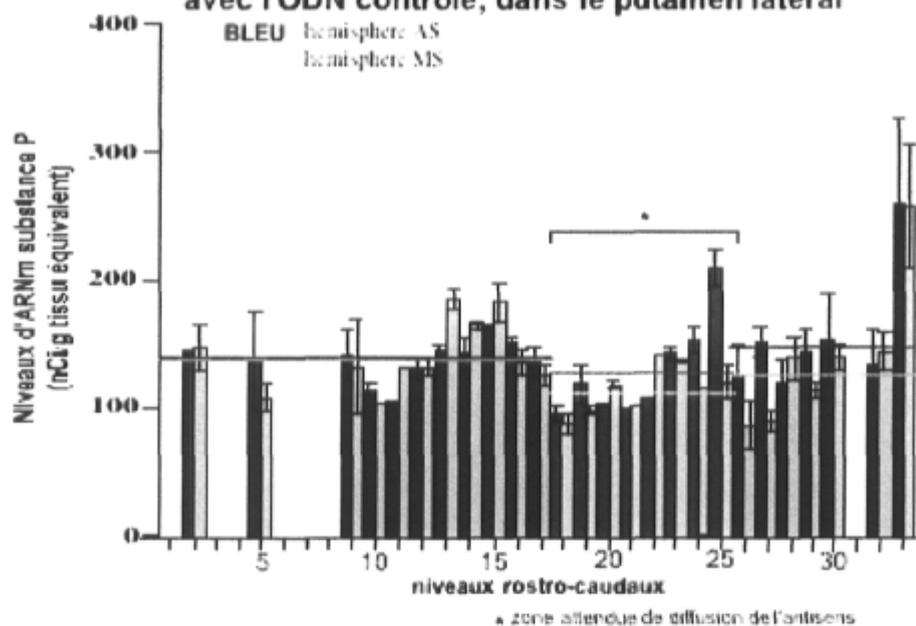


Figure 42 : Densité mesurée d'ARNm de substance P dans le putamen latéral de MA55.

**Effet de l'administration continue d'antisens D2 dans le putamen du macaque MA55 sur l'hybridation de l'ARNm de la substance P, par comparaison avec l'ODN contrôle, dans le noyau caudé**

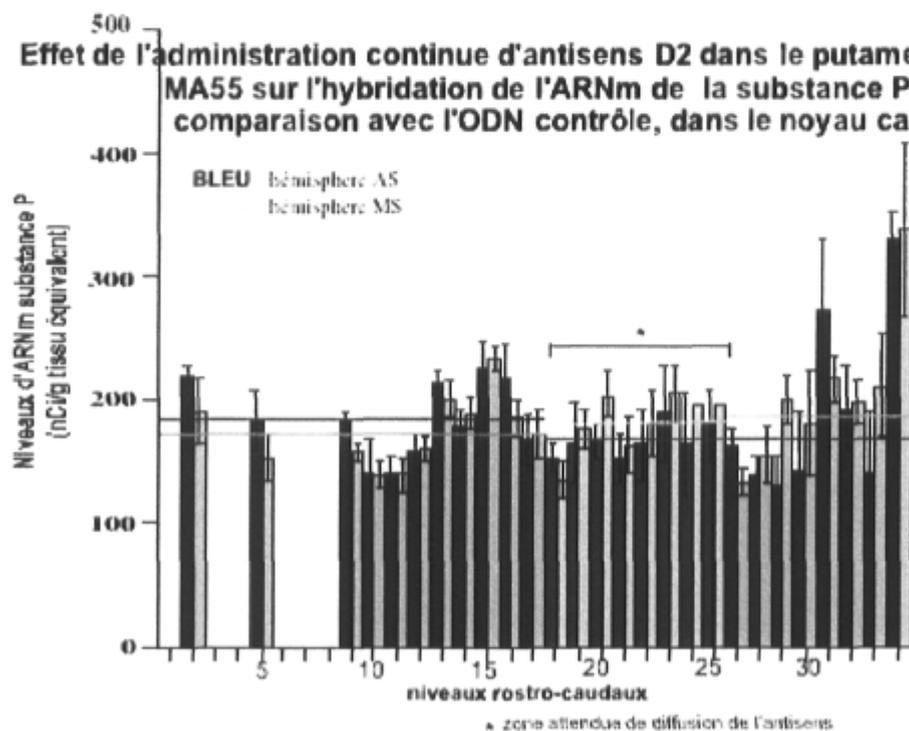


Figure 43 : Densité mesurée d'ARNm de substance P dans le noyau caudé de MA55.

### 3.3 MACAQUE MA35

#### 3.3.1 Évaluation comportementale

Au test d'utilisation préférentielle de la main de la règle sans pot, conformément à ce qui était attendu et de façon similaire à MA55, le singe MA35 a moins utilisé la main contralatérale (gauche) à l'hémisphère traité avec ODN antisens que lors des jours de contrôle (figure 44). Conséquemment, elle a augmenté son utilisation de la main contralatérale (droite) à l'hémisphère traité avec ODN contrôle, passant d'une moyenne de 9,7 % de main droite en contrôle à une moyenne de 18,9 % de main droite sous infusion continue d'ODN.

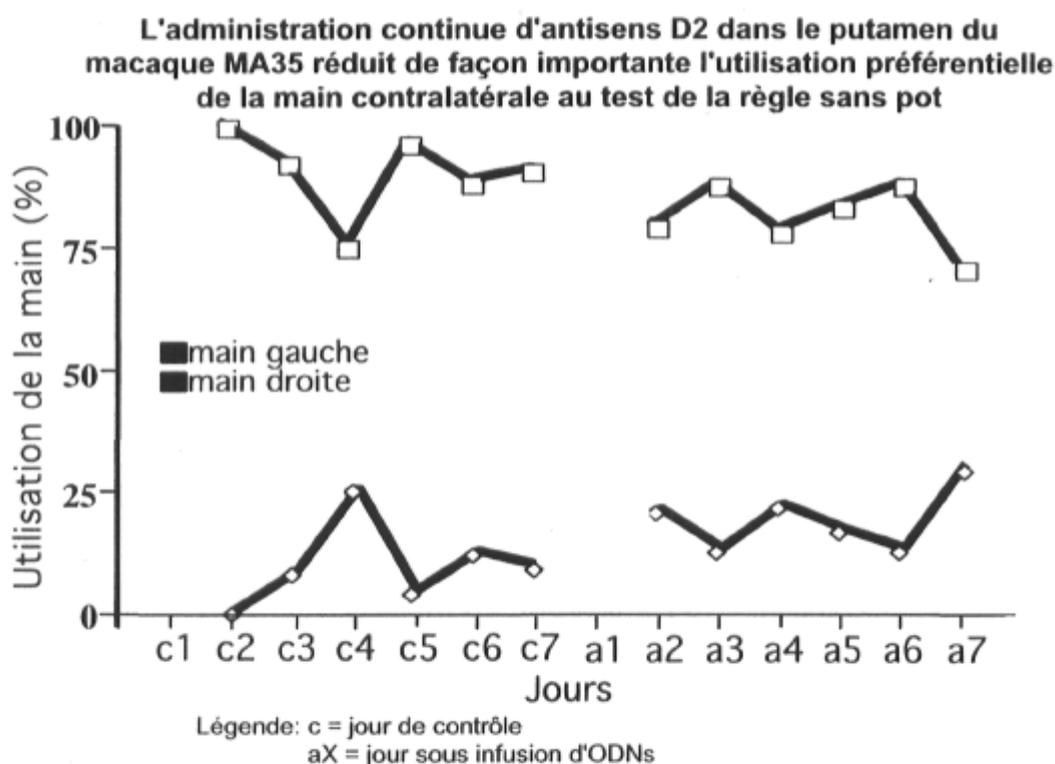


Figure 44 : Utilisation préférentielle de la main au test de la règle sans pot pour MA35.

Au test de la règle avec pots, l'animal a également baissé son utilisation préférentielle de la main contralatérale à l'hémisphère antisens (gauche) et donc augmenté son utilisation de la main contralatérale à l'ODN contrôle (droite). L'utilisation de sa main droite est

passée d'une moyenne de 42,0 % en contrôle à une moyenne de 57,3 % sous traitement antisens (figure 45).

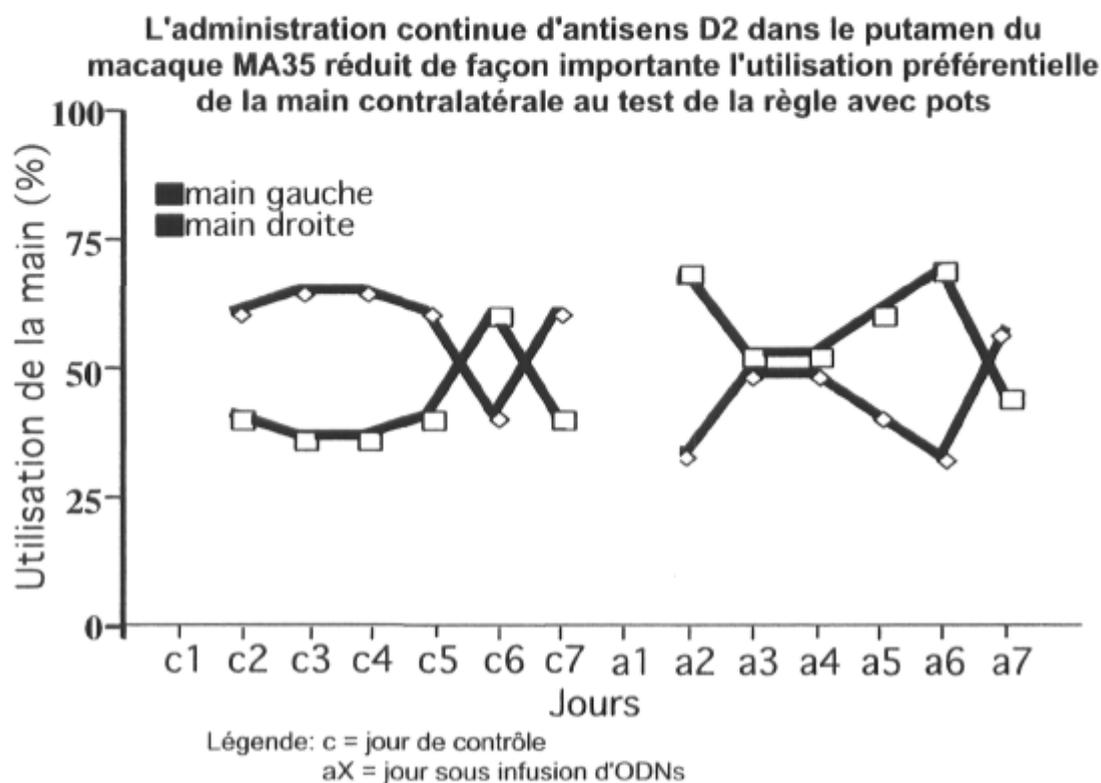


Figure 45 : Utilisation préférentielle de la main au test de la règle avec pots pour MA35.

Le test du mMAP n'a démontré aucune perte de vitesse lors de l'exécution de mouvements grossiers avec la main gauche ou la main droite durant le traitement. Pour la motricité fine, l'animal a continué d'améliorer ses temps durant l'infusion des ODN antisens et contrôle pour la main droite (ODN contrôle); pour la main gauche (ODN antisens), les temps se sont légèrement détériorés sous traitement, particulièrement pour les jours a2 et a3, avant de s'améliorer et d'atteindre le temps le plus bas au jour a7 (Figure 46).

L'infusion continue d'antisens dans le putamen du macaque ne réduit pas la vitesse d'exécution de mouvements fins ou grossiers du membre antérieur par rapport à l'infusion continue d'ODN contrôle ou par rapport aux jours sans ODNs

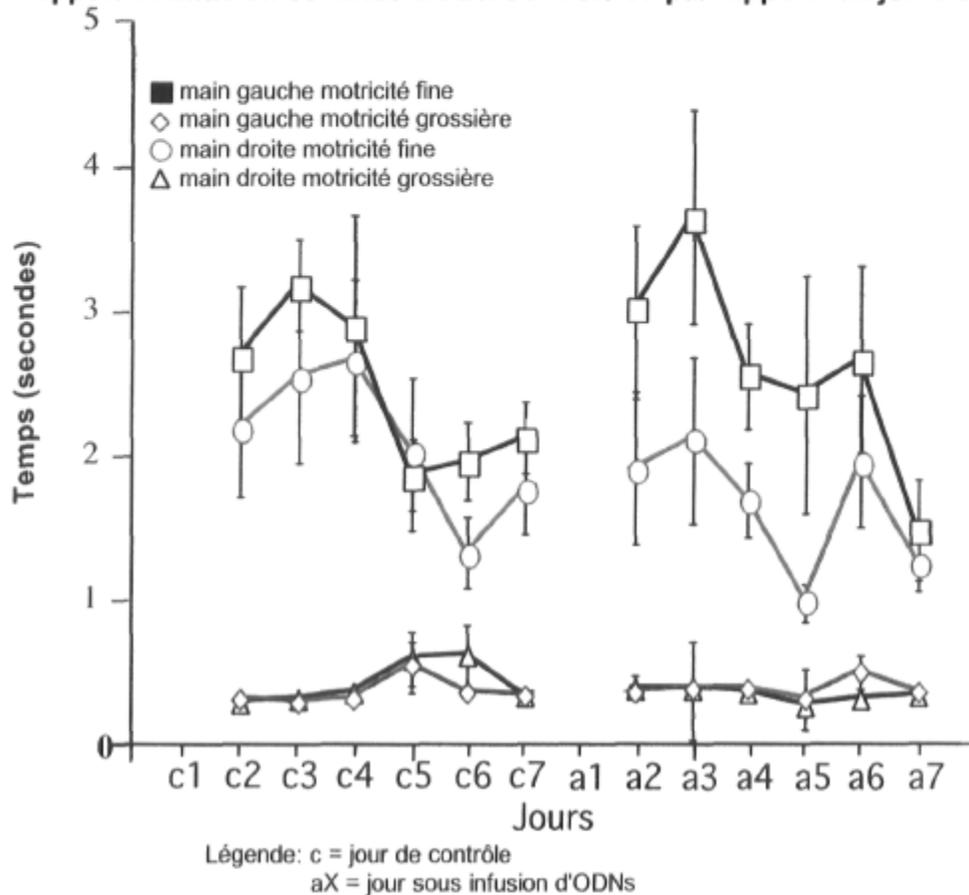


Figure 46 : Vitesse d'exécution des membres antérieurs de MA55 mesurée avec le mMAP, avec tige en forme de point d'interrogation et carottes trouées.

L'administration de l'agoniste dopaminergique quinpirole a donné lieu à des réponses peu consistantes, l'animal changeant de type de comportement locomoteur et de temps de réaction à l'injection à chaque séance. Devant la difficulté de comparer les jours antisens avec les jours contrôle, les résultats n'ont pas été pris en considération ici.

### 3.3.2 Évaluation biochimique

Les différentes techniques exécutées sur les coupes de cerveau de MA35 ont permis de visualiser les canules, qui étaient un peu plus dorsales que prévu dans le putamen, la canule antisens étant un peu moins dorsale que la canule contrôle.



Figure 47 : Hybridation de l'ARNm de la substance P sur une coupe frontale vue de face du cerveau de MA55 au niveau de la canule d'infusion de l'antisens (hémisphère droit) et de la canule d'infusion du missens (hémisphère gauche).

#### Essai de liaison à la raclopride

L'essai de liaison au raclopride a démontré une baisse légère de la densité des récepteurs D2 du côté antisens par rapport au côté contrôle au niveau de la zone de diffusion des ODN dans le putamen médian. Cette baisse était toutefois déjà visible aux niveaux plus rostraux et absente dans les niveaux plus caudaux. Dans le putamen latéral, on ne note aucune diminution évidente des récepteurs D2 dans l'hémisphère antisens par rapport à l'hémisphère contrôle au niveau de la zone de diffusion des ODN. Les deux courbes sont légèrement croissantes et ne présentent pas de dépression au niveau de la zone de diffusion des ODN. Dans le noyau caudé, on observe une plus grande densité du côté contrôle, les deux côtés présentant une courbe clairement décroissante (figures 48, 49 et 50).

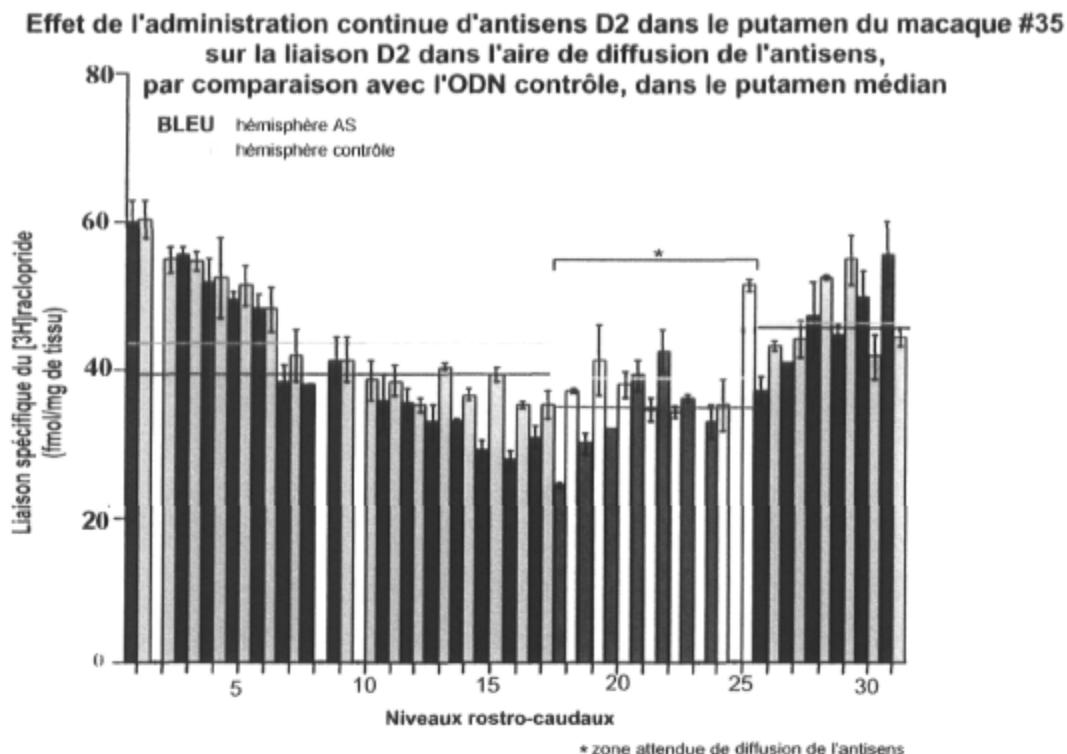


Figure 48 : Densité mesurée des récepteurs D2 dans le putamen médian de MA35 dans l'hémisphère traité à l'ODN antisens et dans l'hémisphère traité à l'ODN contrôle.

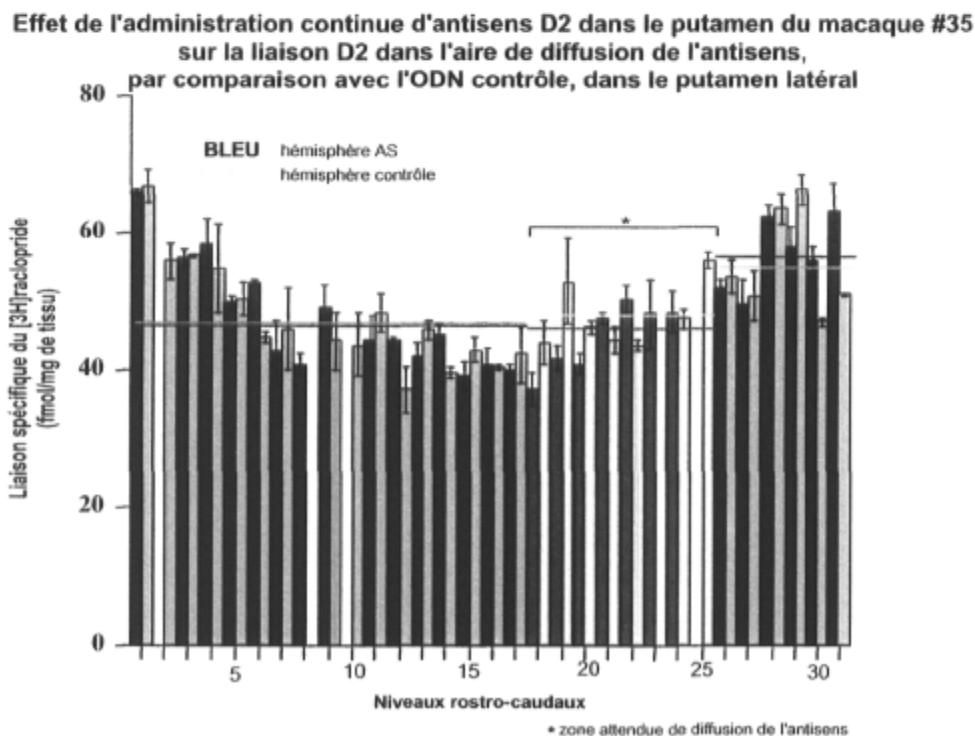


Figure 49 : Densité mesurée des récepteurs D2 dans le putamen latéral de MA35 dans l'hémisphère traité à l'ODN antisens et dans l'hémisphère traité à l'ODN contrôle.

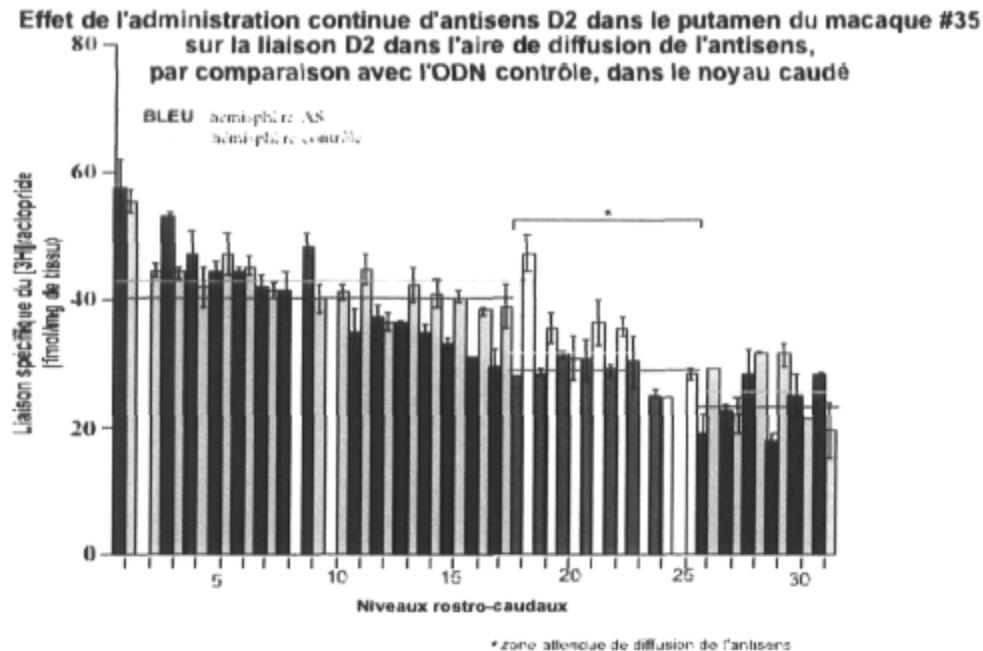


Figure 50 : Densité mesurée des récepteurs D2 dans le noyau caudé de MA35 dans l'hémisphère traité à l'ODN antisens et dans l'hémisphère traité à l'ODN contrôle.

#### Essai de liaison au SCH-23390

L'essai de liaison au SCH-23390 a lui aussi démontré, contrairement à ce qui était attendu et de façon similaire aux résultats obtenus chez MA55, une baisse de la densité des récepteurs (D1 dans ce cas-ci) du côté antisens par rapport au côté contrôle au niveau de la zone de diffusion des ODN dans le putamen médian. Cette différence entre le côté antisens et le côté contrôle est aussi visible mais moindre dans les niveaux plus rostraux, et est pratiquement absente dans les niveaux plus caudaux que la zone de diffusion supposée de l'antisens, tout comme dans le cas des récepteurs D2.

Dans le putamen latéral, on note une baisse plus marquée des D1 dans l'hémisphère antisens par rapport à l'hémisphère contrôle au niveau de la zone de diffusion des ODN. La baisse est aussi présente dans les niveaux plus rostraux que la zone de diffusion, mais la relation s'inverse aux niveaux plus caudaux, le côté antisens devenant plus haut que le côté contrôle. Dans le noyau caudé, on observe une plus grande variabilité entre le côté antisens et le côté contrôle, le côté antisens présentant uniformément une densité plus faible de D1, bien que les deux courbes aient une forme en cloche semblable (figures 51, 52 et 53).

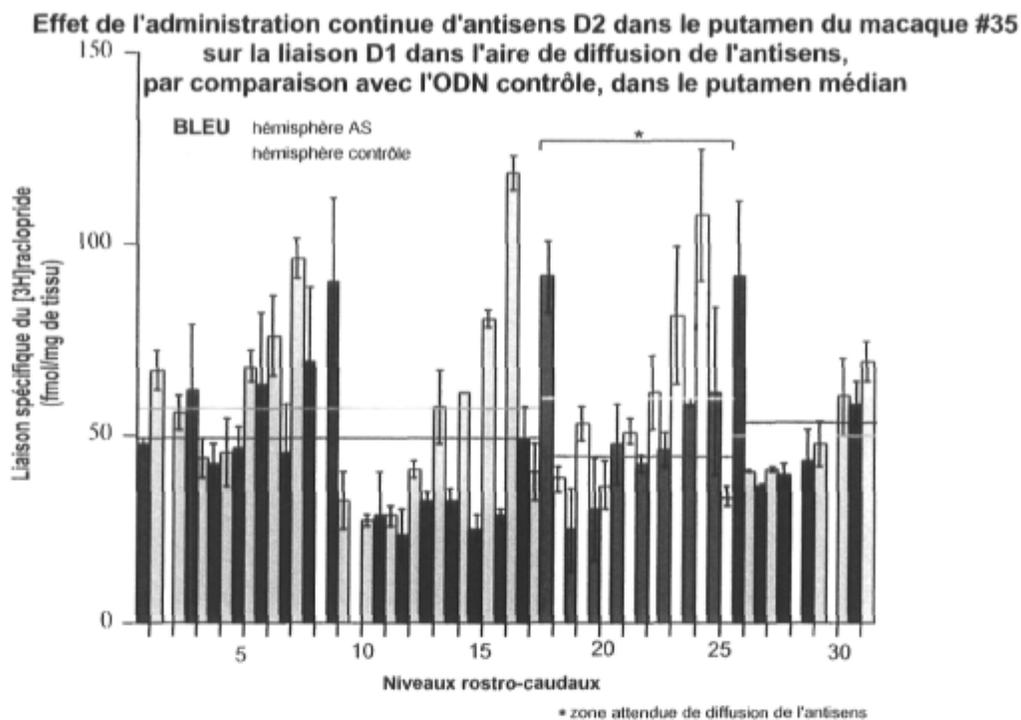


Figure 51 : Densité mesurée des récepteurs D1 dans le putamen médian de MA35 dans l'hémisphère traité à l'ODN antisens et dans l'hémisphère traité à l'ODN contrôle.

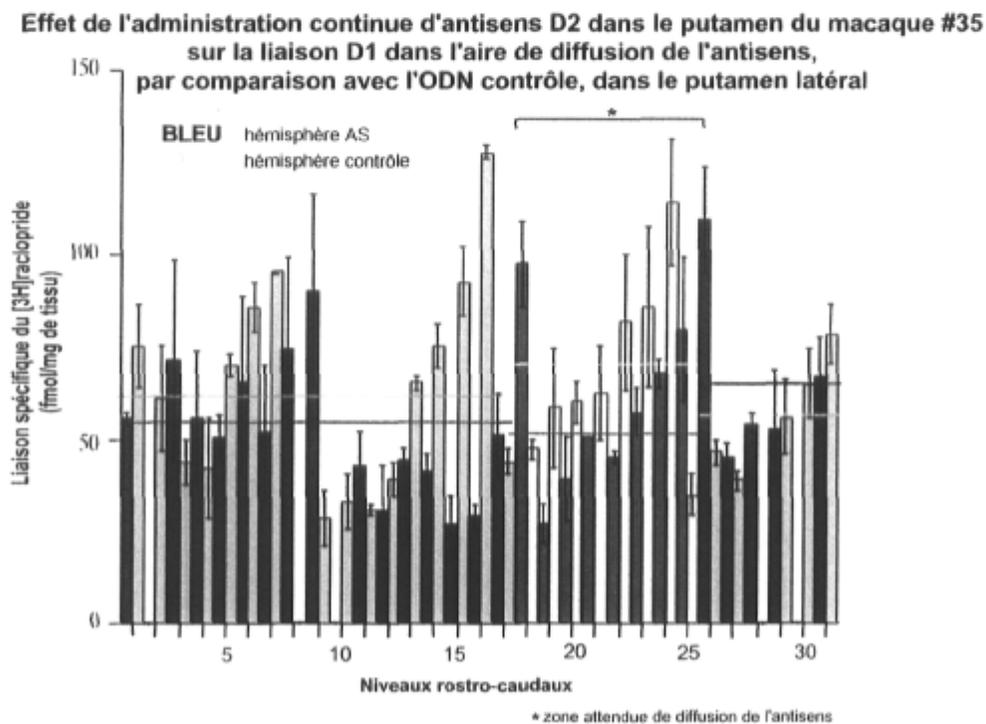


Figure 52 : Densité mesurée des récepteurs D1 dans le putamen latéral de MA35 dans l'hémisphère traité à l'ODN antisens et dans l'hémisphère traité à l'ODN contrôle.

**Effet de l'administration continue d'antisens D2 dans le putamen du macaque #35 sur la liaison D1 dans l'aire de diffusion de l'antisens, par comparaison avec l'ODN contrôle, dans le noyau caudé**

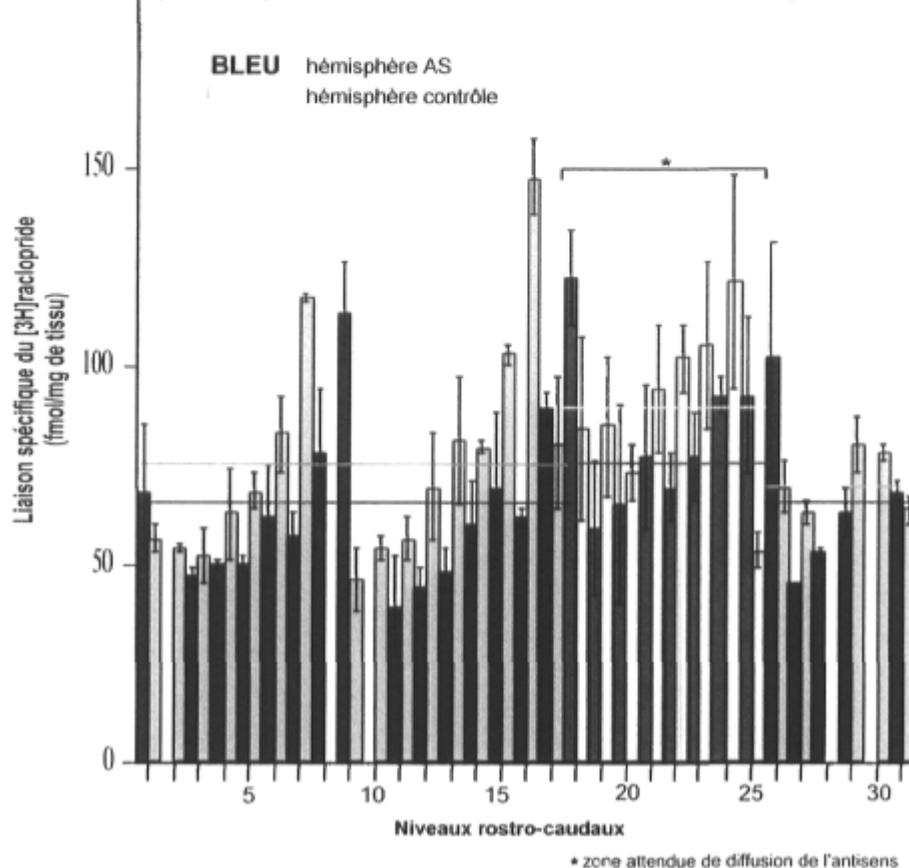


Figure 53 : Densité mesurée des récepteurs D1 dans le noyau caudé de MA55 dans l'hémisphère traité à l'ODN antisens et dans l'hémisphère traité à l'ODN contrôle.

### Hybridation de la préproenképhaline

L'hybridation de la préproenképhaline n'a permis d'observer que des différences légères entre le côté antisens et le côté contrôle, les niveaux d'ARNm étant un peu plus bas du côté antisens pour toutes les zones du putamen médian. Pour le putamen latéral, on remarque des niveaux d'ARNm pour la préproenképhaline pratiquement semblables des deux côtés tout au long du gradient rostro-caudal, avec toutefois des niveaux un peu plus élevés dans l'hémisphère traité à l'antisens que dans celui traité à l'ODN contrôle pour le niveau plus rostral (figures 54 et 55).

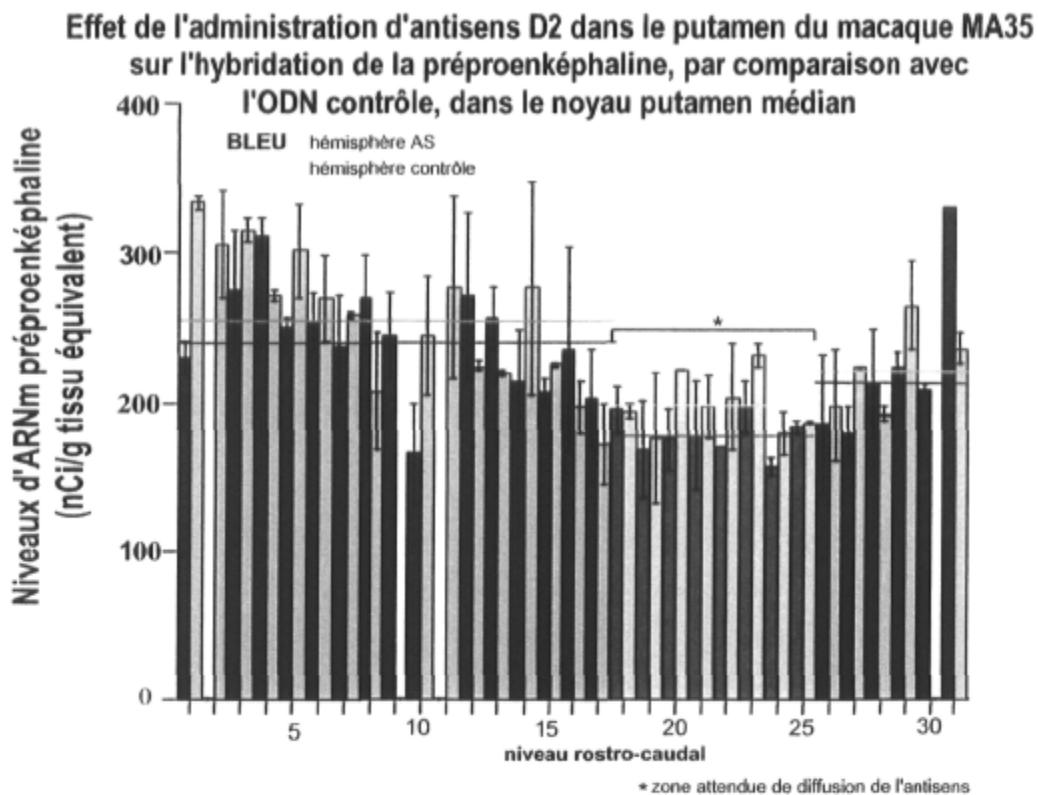


Figure 54 : Densité mesurée de préproenképhaline dans le putamen médian de MA35.

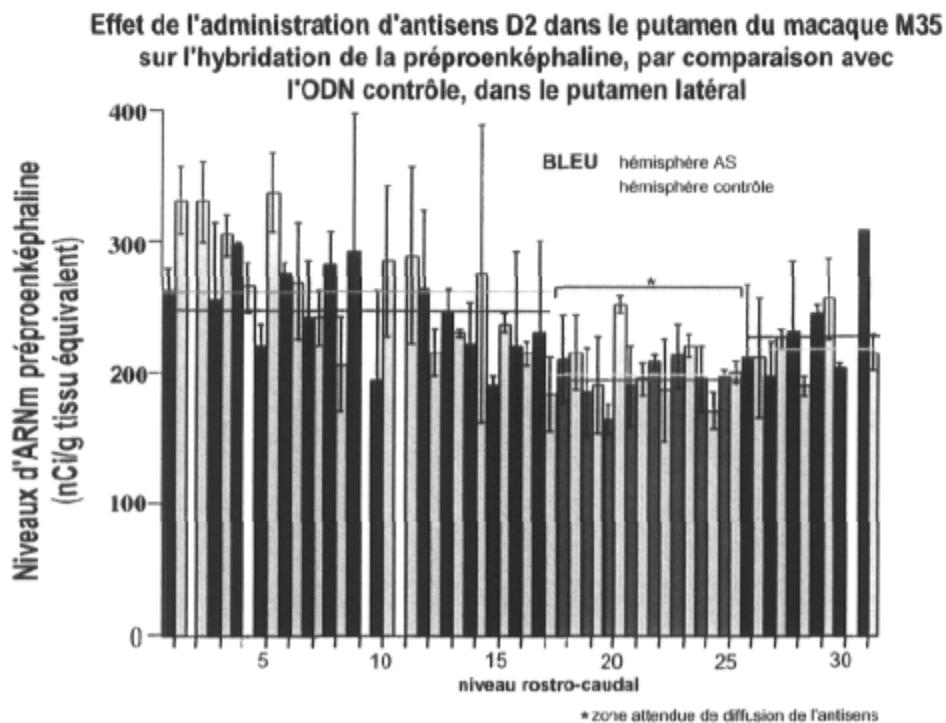


Figure 55 : Densité mesurée de préproenképhaline dans le putamen latéral de MA35.

Le noyau caudé montre deux courbes légèrement décroissantes, avec une élévation de la densité de préproenképhaline du côté contrôle pour la zone plus rostrale et du côté antisens pour la zone plus caudale. La différence entre les deux côtés est la plus faible au niveau de la zone de diffusion des ODN. Par ailleurs, l'allure générale des courbes montre une inflexion beaucoup moins accentuée au niveau de l'aire de diffusion des ODN que dans le cas de HA84 et également moins accentuée que dans le cas de MA55 (figure 56).

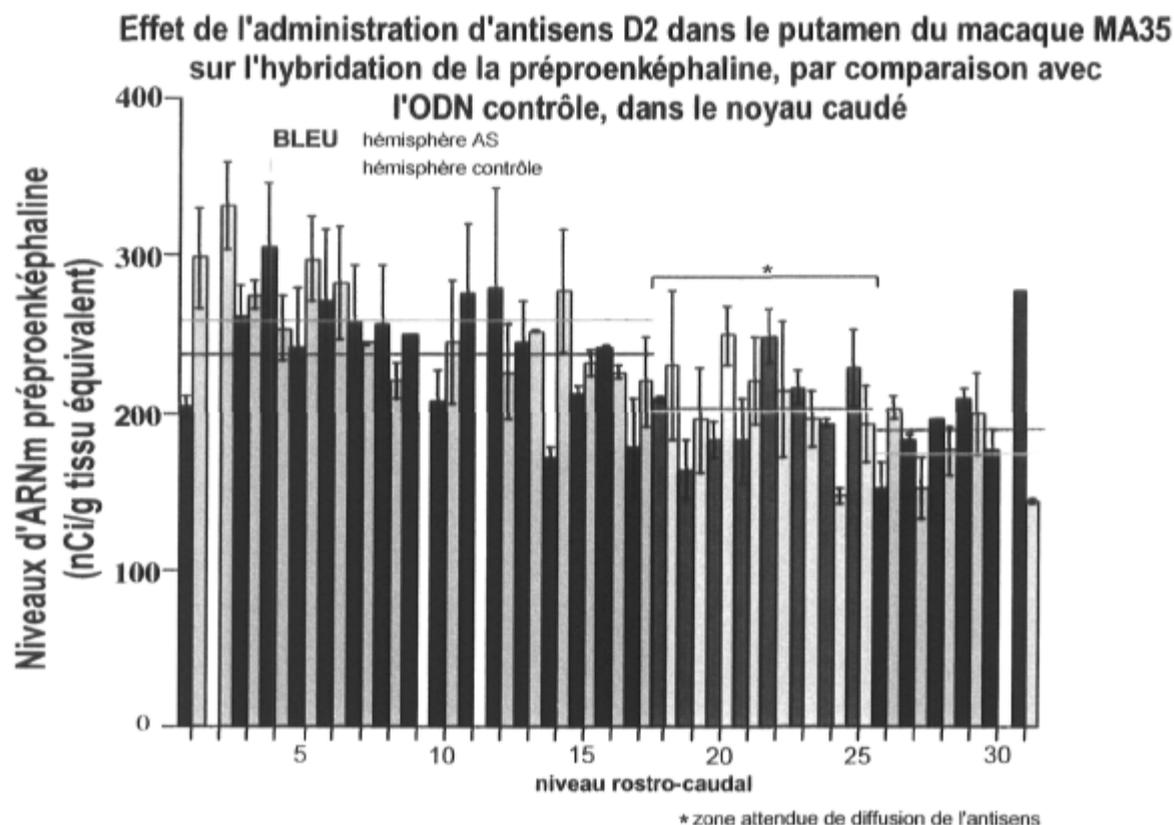


Figure 56 : Densité mesurée de préproenképhaline dans le noyau caudé de MA35.

### Hybridation de la substance P

Pour le putamen médian, l'hybridation de la substance P a démontré une certaine baisse des niveaux d'ARNm vis-à-vis de l'aire de diffusion supposée des ODN du côté antisens; la courbe rostro-caudale est toutefois similairement croissante du côté antisens et du côté contrôle. Dans le cas du putamen latéral, on note une légère augmentation des niveaux de préprotachykinine du côté de l'antisens dans la région de diffusion des ODN et dans la région plus caudale, et l'apparence générale de la courbe rostro-caudale est similaire

pour les deux hémisphères, soit croissante. Par ailleurs, le noyau caudé présente également des courbes semblables, en forme de cloche, avec différences mineures d'un côté à l'autre, la courbe antisens présentant des valeurs plus élevées au niveau de l'aire de diffusion des ODN et dans la région plus caudale et des valeurs moins élevées dans la région plus rostrale (figures 57, 58 et 59).

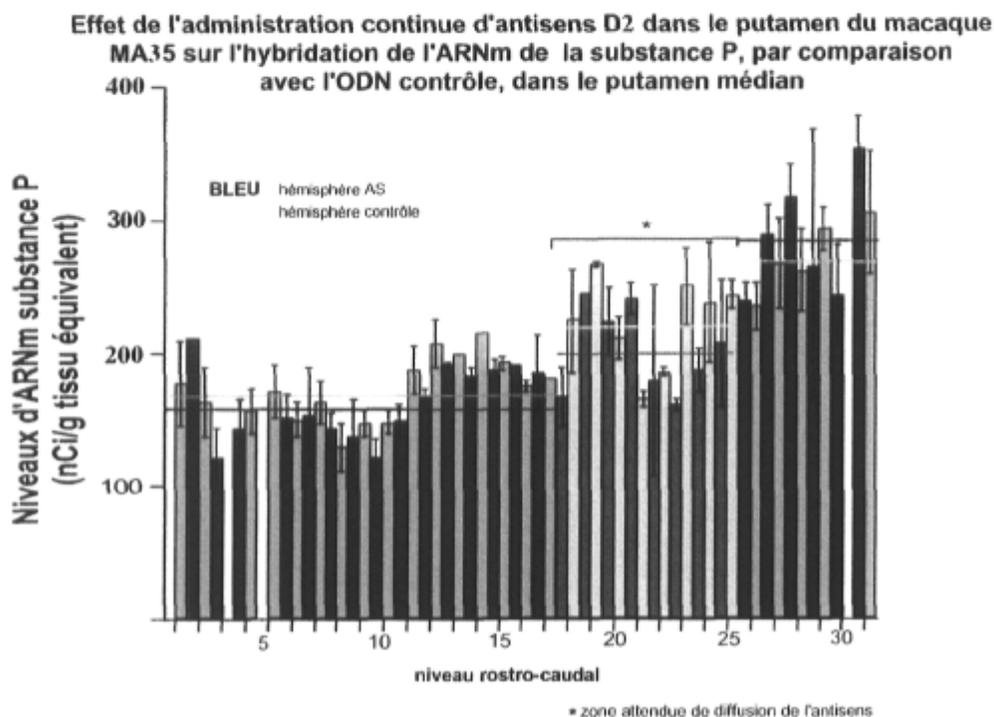


Figure 57 : Densité mesurée d'ARNm de substance P dans le putamen médian de MA35.

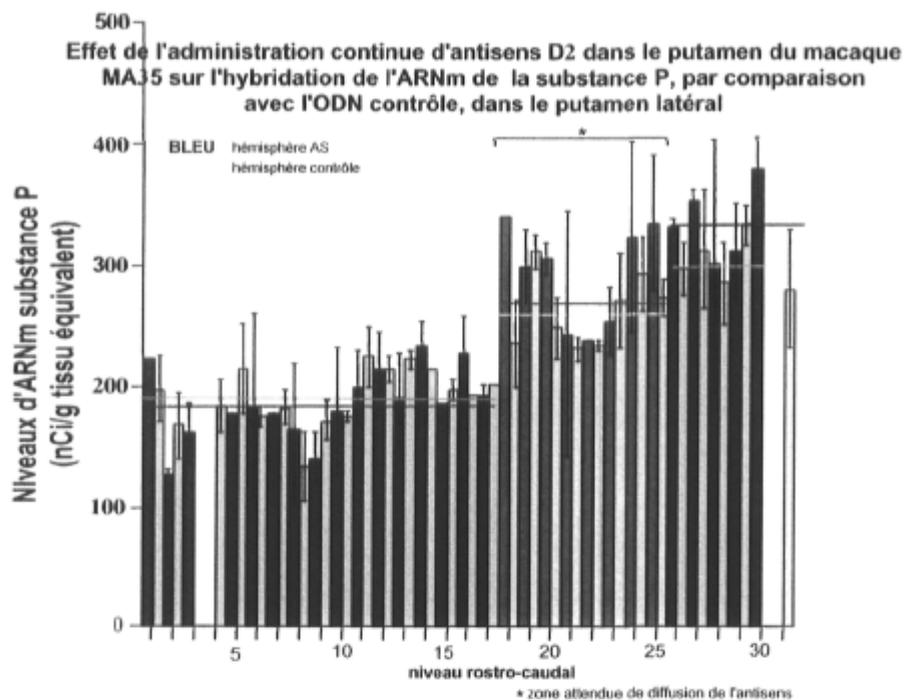


Figure 58 : Densité mesurée d'ARNm de substance P dans le putamen latéral de MA35.

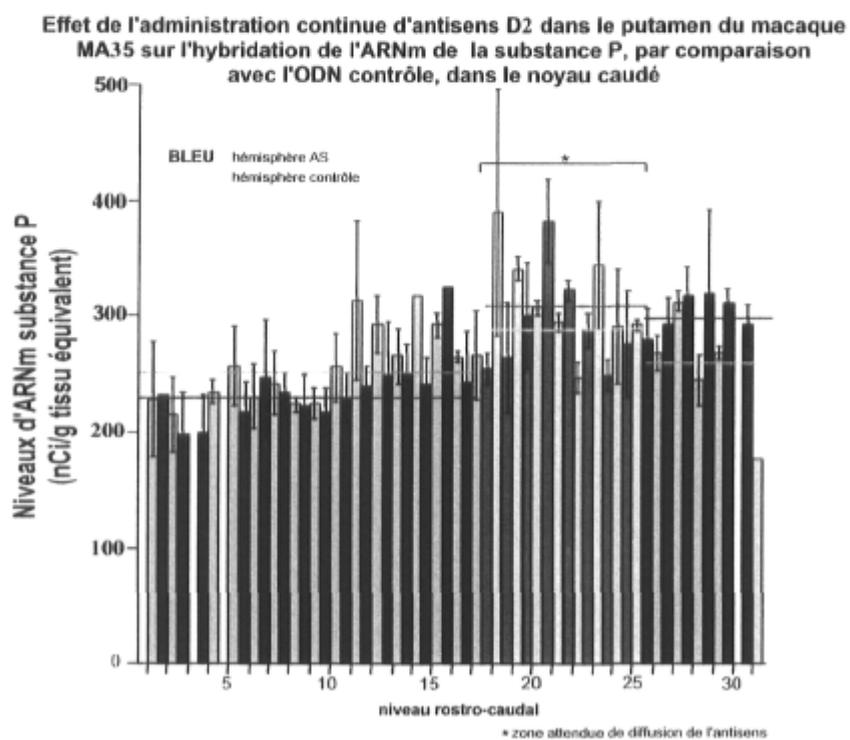


Figure 59 : Densité mesurée d'ARNm de substance P dans le noyau caudé de MA35.

### 3.4 MACAQUE MA26

#### 3.4.1 Évaluation comportementale

Au test d'utilisation préférentielle de la main de la règle sans pot, conformément à ce qui était attendu et de façon similaire bien que moindre à MA55 et MA35, le singe MA26 a moins utilisé la main contralatérale (droite) à l'hémisphère traité avec ODN antisens durant les jours antisens que lors des jours de contrôle. Conséquemment, elle a augmenté son utilisation de la main contralatérale (gauche) à l'hémisphère traité avec ODN contrôle, passant d'une moyenne de 51,5 % de main gauche en contrôle à une moyenne de 58,3 % de main gauche sous infusion continue d'ODN (figure 60). L'utilisation préférentielle de la main est demeurée la même après le changement de pompes (ODN contrôle des deux côtés) et n'est donc pas revenue au même niveau que lors des jours contrôle préopératoires sans ODN.

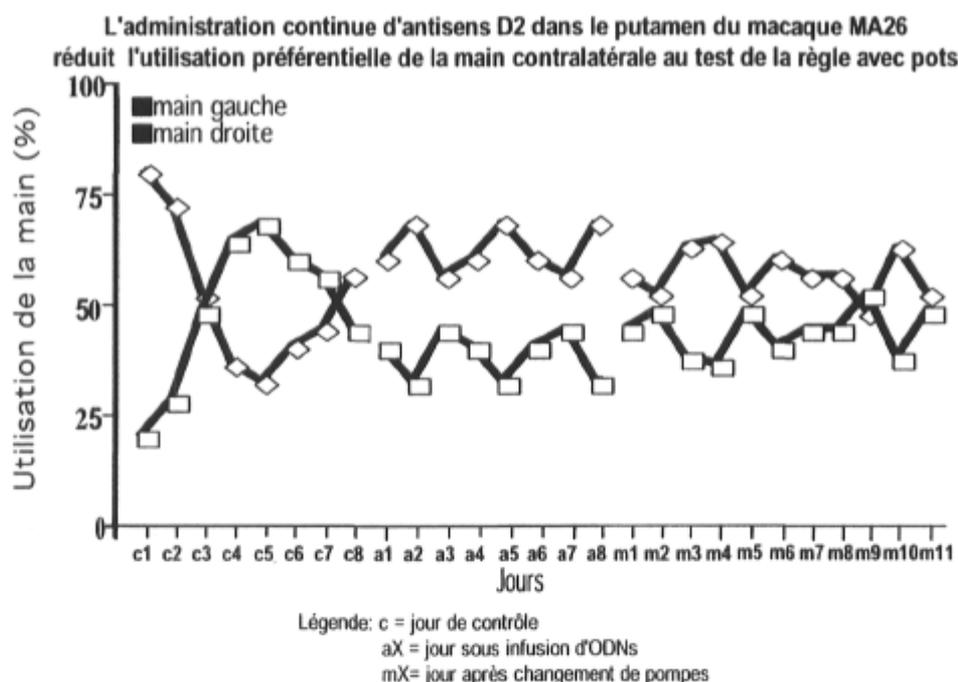


Figure 60 : Utilisation préférentielle de la main au test de la règle avec pots pour MA26.

Au test de la règle avec pots, l'animal a également baissé son utilisation préférentielle de la main contralatérale à l'hémisphère antisens (droite) et donc augmenté son utilisation de la main contralatérale à l'ODN contrôle (gauche). L'utilisation de sa main gauche est

passée d'une moyenne de 51,5 % en contrôle à une moyenne de 62,0 % sous traitement antisens. Suite au changement de pompes (ODN contrôle partout), l'utilisation de la main gauche a baissé à 56,5 %, se rapprochant des valeurs obtenues lors des jours contrôle préopératoires.

Le test du mMAP n'a démontré aucune perte de vitesse lors de l'exécution de mouvements fins ou grossiers avec la main gauche ou la main droite lors de l'infusion des ODN, l'animal continuant même d'améliorer ses temps durant l'infusion des ODN antisens et contrôle (Figure 61).

**Effet de l'infusion continue d'antisens dans le putamen du macaque MA26 sur la vitesse d'exécution de mouvements fins ou grossiers du membre antérieur, par rapport à l'infusion continue d'ODN contrôle ou par rapport aux jours sans ODNs**

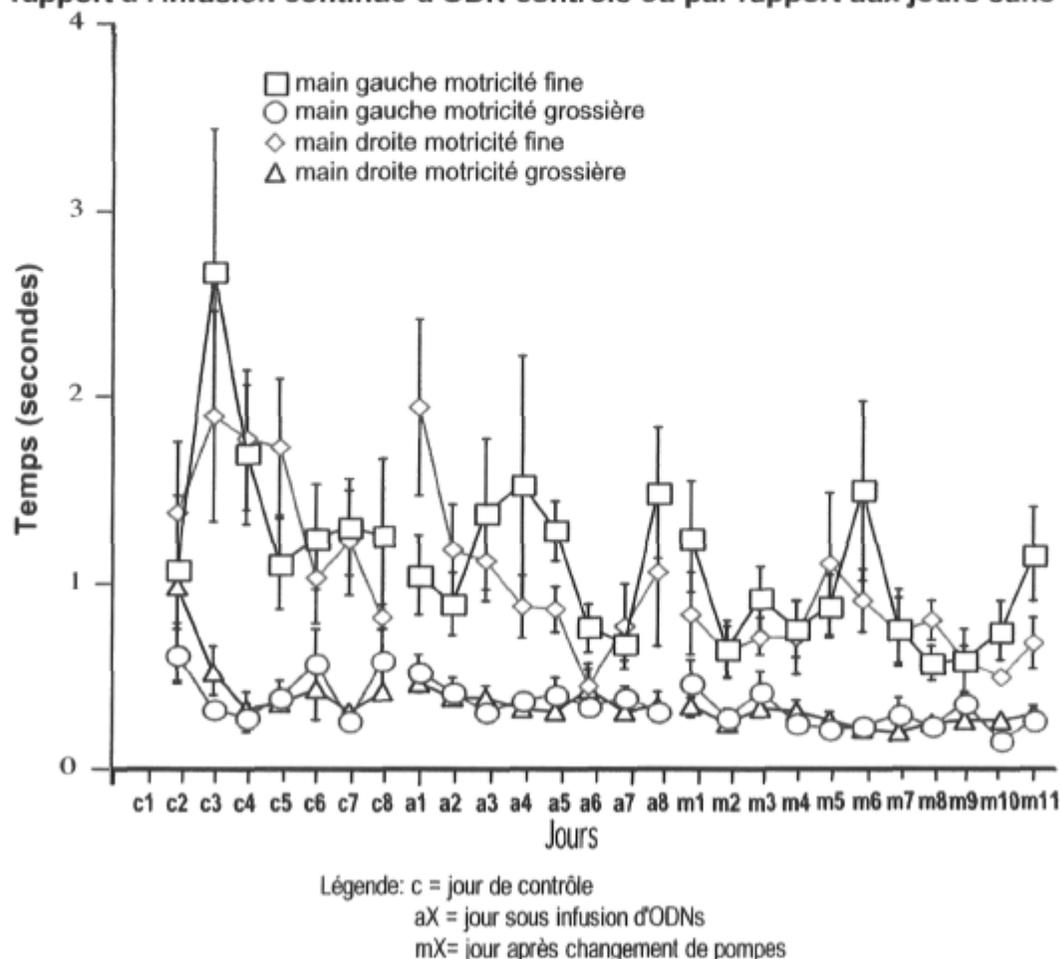


Figure 61 : Vitesse d'exécution des membres antérieurs de MA26 mesurée avec le mMAP, avec tige en forme de point d'interrogation et carottes trouées.

### 3.5 MACAQUE HP1 (singe hémiparkinsonien)

#### 3.5.1 Évaluation comportementale

Au test d'utilisation préférentielle de la main sous agoniste dopaminergique, on a pu observer tout d'abord une sensibilisation au quinpirole chez HP1 lors des jours de contrôle préopératoires et du premier jour d'injection de quinpirole sous ODN antisens. Au deuxième jour de test avec le quinpirole sous ODN antisens, la progression de la sensibilisation a été stoppée. Au dernier jour sous antisens ainsi qu'au premier test sous ODN contrôle, l'utilisation préférentielle de la main contralatérale à la lésion a décliné de façon importante, pour remonter aux deux tests au quinpirole suivants. L'utilisation de la main droite a ensuite connu une autre baisse, vraisemblablement à cause de l'augmentation importante et concomitante des dyskinésies de la main droite. Pour le SKF 82958, on a pu observer une tendance à la désensibilisation dès le début des tests, avec de légères remontées en plateau et de petites décroissances progressives (figure 62).

**Effet de l'administration continue d'ODNs antisens, puis d'ODNs contrôle, chez HP1 sur l'utilisation préférentielle de la main sous stimulation par des agonistes dopaminergiques**

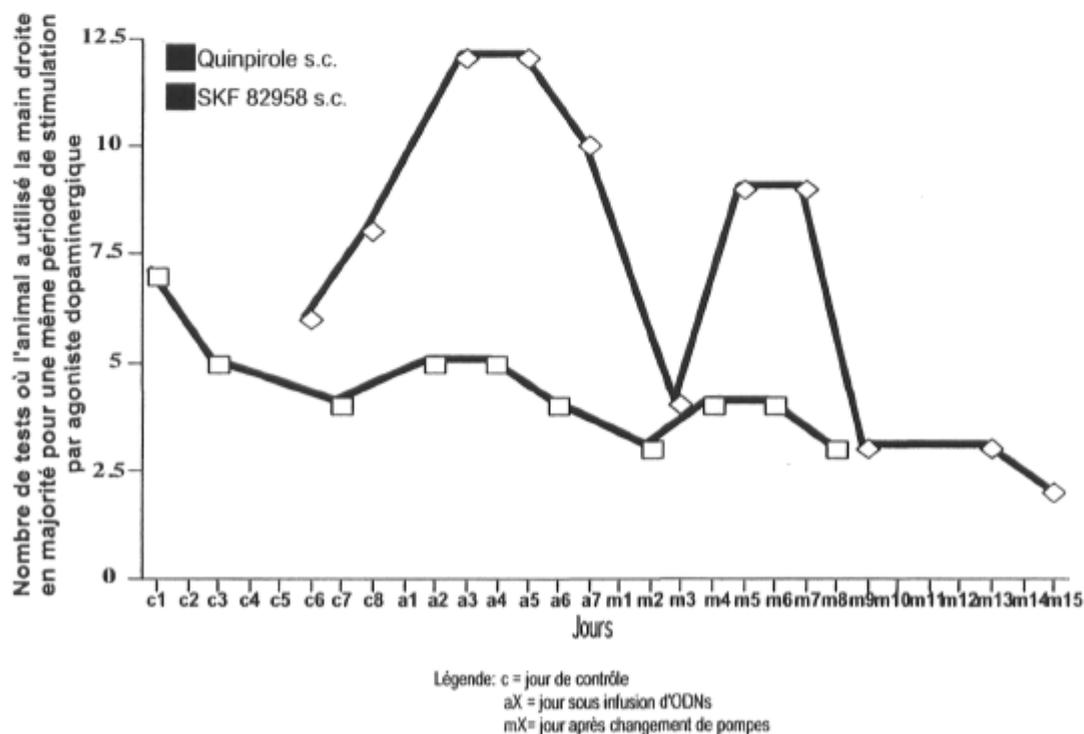


Figure 62 : Utilisation préférentielle de la main au test de la règle avec pots pour HP1.

### **3.6 MACAQUE HP2 (singe hémiparkinsonien)**

#### **3.6.1 Évaluation comportementale**

Au test d'utilisation préférentielle de la main sous agoniste dopaminergique, le sujet HP2 n'a jamais utilisé sa main droite, et ce peu importe l'agoniste dopaminergique ou l'infusion d'antisens ou d'ODN contrôle. Au niveau du nombre total de rotations contralatérales effectuées sous agoniste dopaminergique D2 ou D1, on a pu observer tout d'abord une diminution importante du nombre de tours effectués sous quinpirole lors des deux premiers jours sous antisens, avec une diminution plus importante la seconde journée. La troisième et dernière journée sous antisens, toutefois, on remarque une augmentation du nombre de tours. Suite au passage à l'ODN contrôle, et tel qu'attendu, le nombre de tours effectués augmente sensiblement et atteint des niveaux plus hauts que lors des jours de contrôle, suite à la sensibilisation au quinpirole. Pour le SKF 82958, on a pu observer une tendance à la désensibilisation entre le jour contrôle et le jour sous antisens, avec un plateau entre le jour antisens et le jour ODN contrôle. Ceci correspond à ce que l'on avait observé chez HP1 comme désensibilisation sous agoniste D1, et il n'y a pas d'inflexion significative de la courbe sous agoniste D1, contrairement à ce que l'on observe sous agoniste D2 (figure 63).

## L'infusion intra-striatale d'antisens D2 réduit le nombre de tours effectués sous agonistes D2 mais pas D1

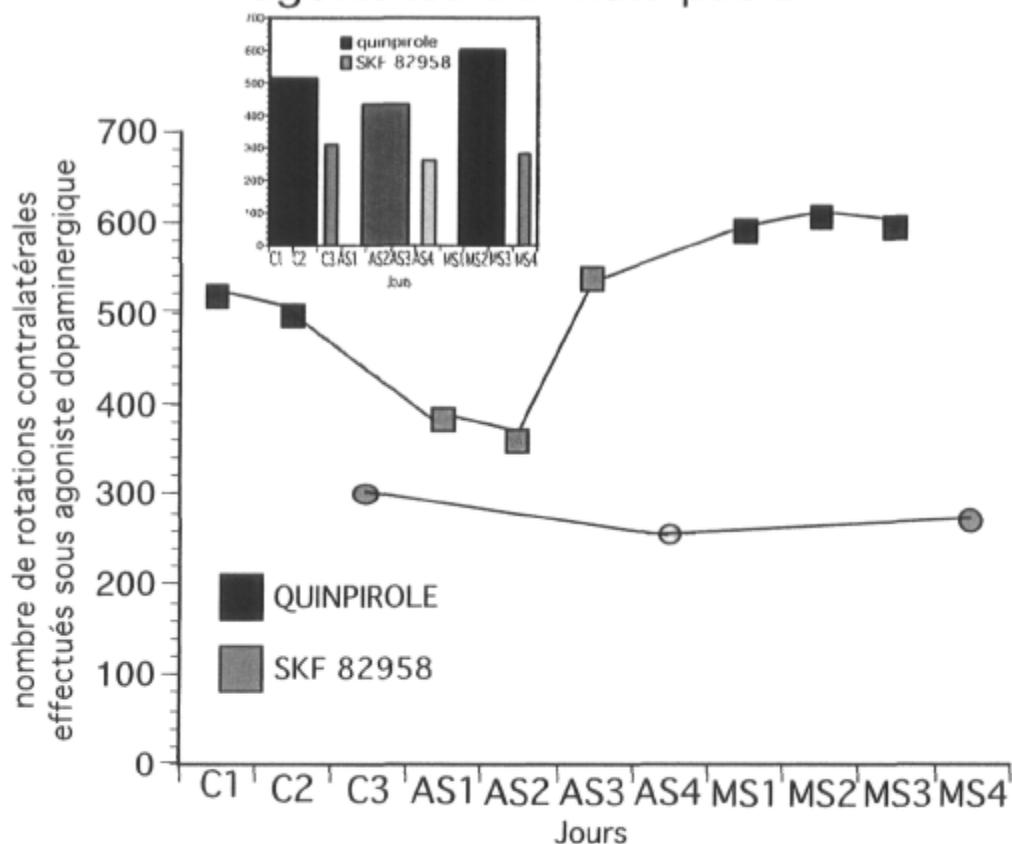


Figure 63 : Nombre de rotations contralatérales sous agonistes dopaminergiques pour HP2.

### 3.7 MACAQUES PA, PM, GA, GM

#### 3.7.1 Évaluation comportementale

Ces quatre sujets ayant démontré peu d'intérêt pour le mMAP, particulièrement GM et GA, les résultats étaient de peu d'intérêt et ne sont pas montrés ici.

L'effet comportemental de l'administration d'ODN contrôle et antisens est représenté séparément pour chaque singe, les groupes n'étant plus comparables vu l'exclusion de GM qui a montré des signes évidents de dépression et a développé un comportement

d'automutilation sous apomorphine qui a nécessité la mise en contention jusqu'à la fin de l'effet de la drogue, faussant les observations comportementales.

L'administration d'antisens est suivie d'une baisse dramatique de l'activité de base chez GA, baisse qui est maintenue lors de la seconde journée de mesure. Également, chez PA, on remarque une légère baisse globale de l'activité locomotrice après traitement antisens, bien que la baisse soit moins évidente lors de la seconde journée de mesure. L'administration d'ODN contrôle chez PM n'a pas semblé entraîner une baisse, l'activité locomotrice globale étant semblable avant et après le traitement (figure 64).

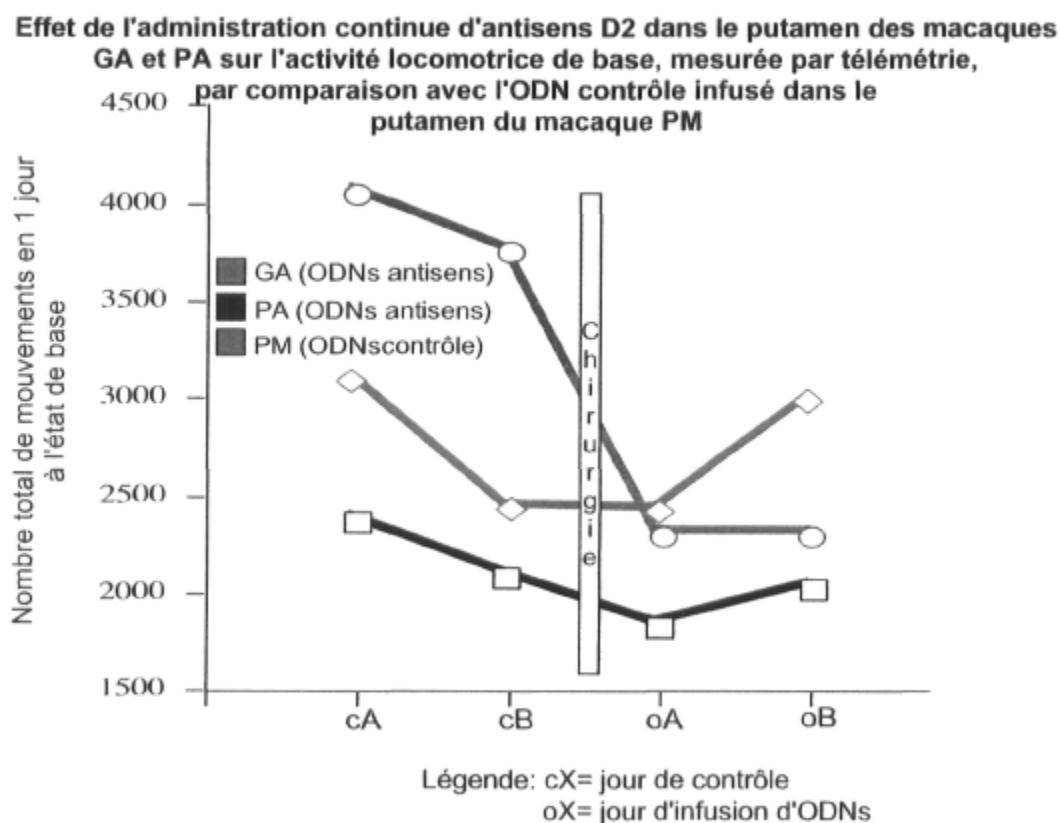


Figure 64 : Nombre total de mouvements sous apomorphine avant et après traitement avec l'ODN antisens (GA et PA) ou l'ODN contrôle (PM), GM étant exclue (dépression, automutilation).

Lors de la stimulation par l'apomorphine, on a pu remarquer une augmentation globale de l'activité locomotrice par rapport à l'état de base chez tous les singes. Chez GA, on remarque toutefois que la même stimulation par l'apomorphine produit moins d'activité

locomotrice de répétition en répétition, une tendance que l'on observe toujours suite à l'administration d'antisens bien que la courbe soit moins accentuée. Par ailleurs, le macaque PA démontre une augmentation dans le temps de la réponse locomotrice à l'apomorphine, et la courbe ne semble pas affectée par le traitement antisens. Chez PM, on remarque une réponse assez semblable avant et après l'administration d'ODN, une légère baisse globale pouvant être vue suite au traitement avec ODN contrôle (figure 65).

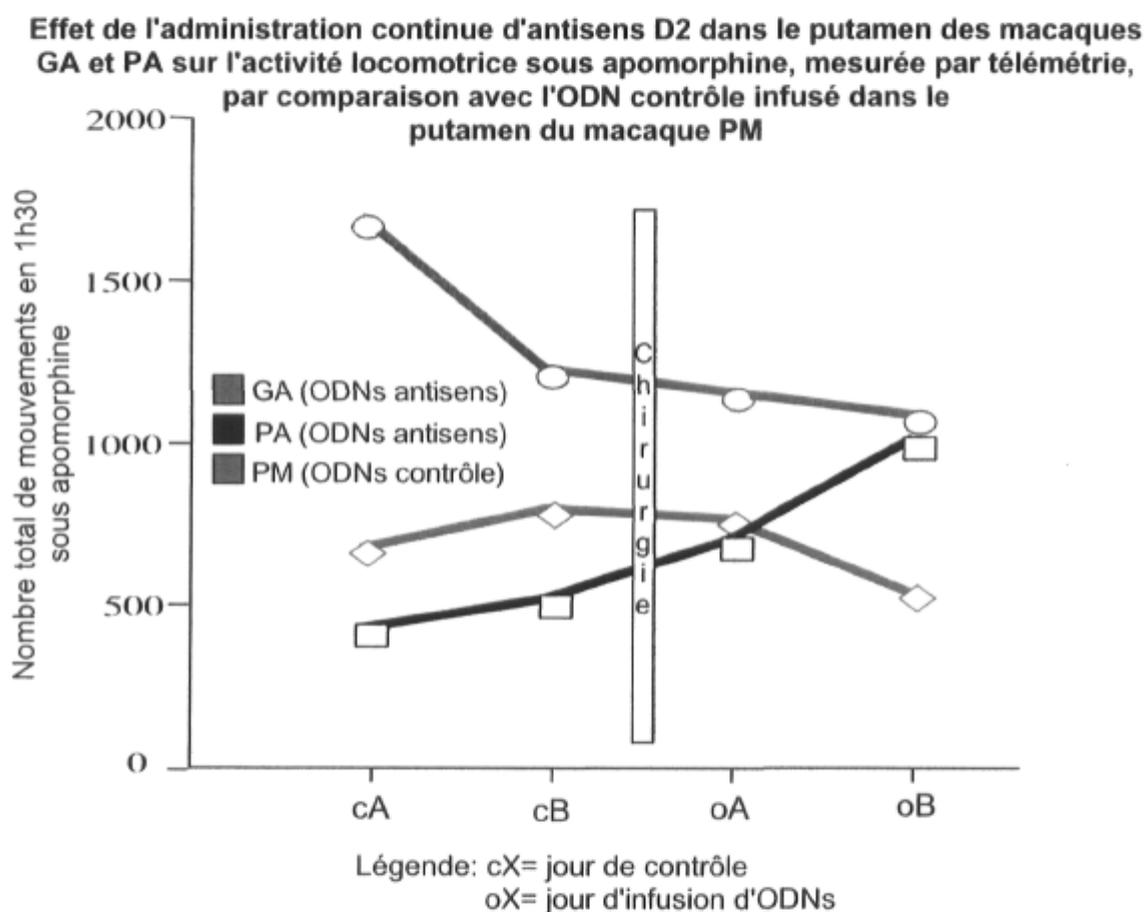


Figure 65 : Nombre total de mouvements sous apomorphine avant et après traitement avec l'ODN antisens (GA et PA) ou l'ODN contrôle (PM), GM étant exclue (dépression, automutilation).

Lors de la stimulation par le quinpirole, on a pu remarquer une augmentation globale de l'activité locomotrice par rapport à l'état de base chez tous les singes. Chez GA, contrairement à la réponse à la stimulation par l'apomorphine, on remarque une augmentation dans le temps de la réponse locomotrice à la même stimulation par

quinpirole, une tendance qui semble toutefois freinée suite à l'administration d'antisens. Par ailleurs, le macaque PA démontre une augmentation initiale de la réponse locomotrice lors du second challenge au quinpirole, suivie d'une diminution évidente de la réponse après l'administration du traitement antisens. Chez PM, on remarque une réponse assez semblable avant et après l'administration d'ODN, une légère tendance à la baisse lors des trois premières journées de mesure étant suivie d'une remontée à la dernière journée (figure 66).

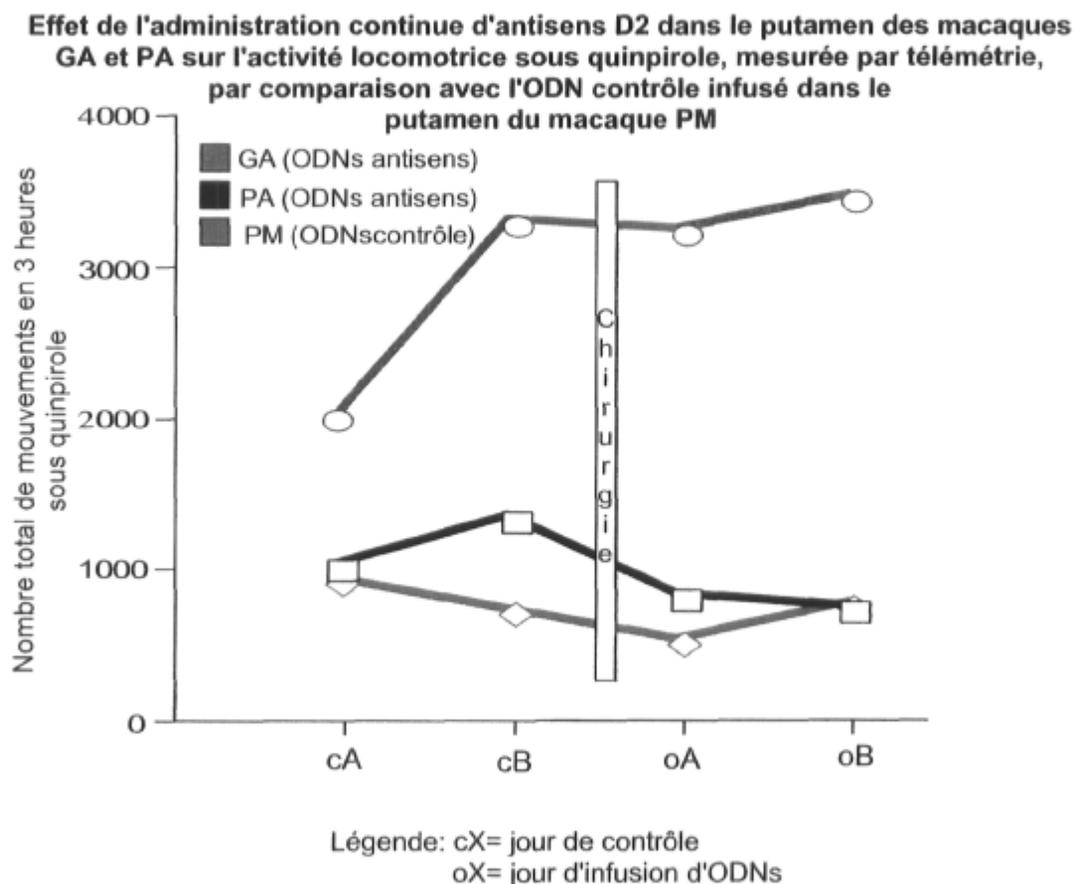


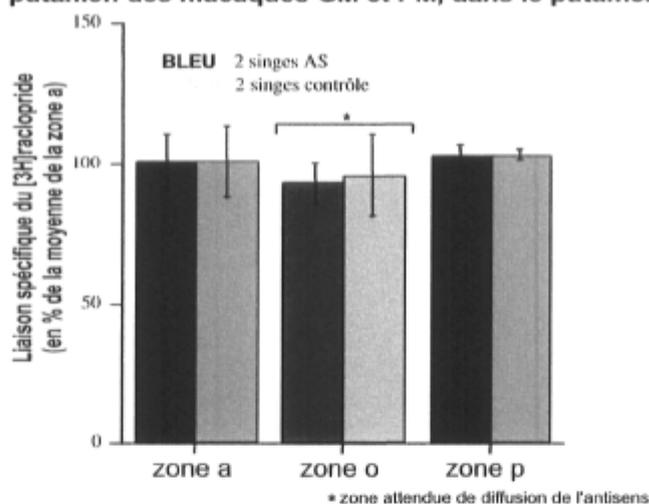
Figure 66 : Nombre total de mouvements sous quinpirole avant et après traitement avec l'ODN antisens (GA et PA) ou l'ODN contrôle (PM), GM étant exclue (dépression, automutilation).

### 3.7.2 Évaluation biochimique

#### Essai de liaison à la raclopride

L'essai de liaison au raclopride n'a démontré aucune différence significative de la densité des récepteurs D2 chez les singes antisens par rapport aux singes contrôle au niveau de la zone de diffusion des ODN dans le putamen. La comparaison aux niveaux plus rostraux et aux niveaux plus caudaux ne montre également pas de variation significative entre les deux groupes ou dans un même groupe selon le niveau rostro-caudal. Dans le noyau caudé, on ne note aucune diminution évidente des récepteurs D2 dans le groupe antisens par rapport au groupe contrôle au niveau de la zone de diffusion des ODN (figures 67 et 68).

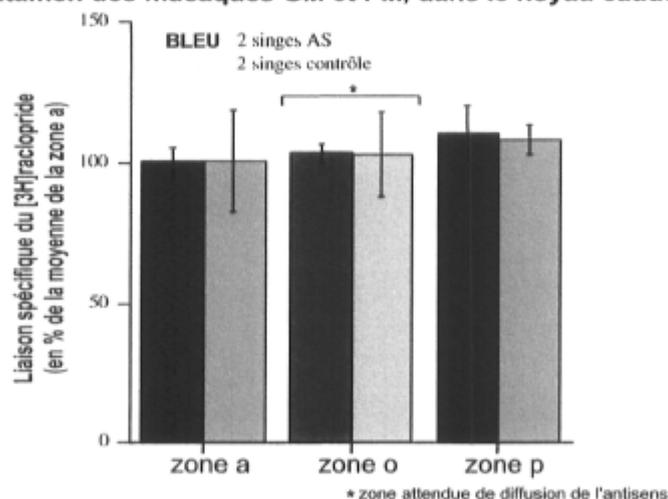
**Effet de l'administration continue d'antisens D2 dans le putamen des macaques GA et PA sur la liaison D2 par comparaison avec l'ODN contrôle infusé dans le putamen des macaques GM et PM, dans le putamen**



Légende: zone a = zone antérieure à la zone de diffusion, plus rostrale  
 zone o = zone de diffusion des ODNs  
 zone p = zone postérieure à la zone de diffusion, plus caudale

Figure 67 : Densité mesurée des récepteurs D2 dans le putamen total bilatéral de PA et GA, traitées à l'ODN antisens, par rapport à la densité mesurée pour PM et GM, traitées à l'ODN contrôle.

**Effet de l'administration continue d'antisens D2 dans le putamen des macaques GA et PA sur la liaison D2 par comparaison avec l'ODN contrôle infusé dans le putamen des macaques GM et PM, dans le noyau caudé**



Légende: zone a = zone antérieure à la zone de diffusion, plus rostrale  
 zone o = zone de diffusion des ODN  
 zone p = zone postérieure à la zone de diffusion, plus caudale

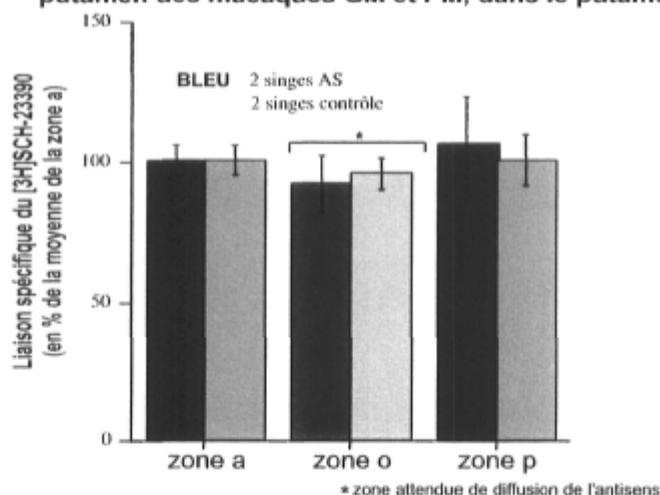
Figure 68 : Densité mesurée des récepteurs D2 dans le noyau caudé total bilatéral de PA et GA, traitées à l'ODN antisens, par rapport à la densité mesurée pour PM et GM, traitées à l'ODN contrôle.

### Essai de liaison au SCH-23390

L'essai de liaison au SCH-23390 n'a pas démontré non plus de baisse de la densité des récepteurs (D1 dans ce cas-ci) chez les singes antisens par rapport aux singes contrôle au niveau de la zone de diffusion des ODN dans le putamen. Aucune différence évidente n'est visible aux niveaux plus rostraux ou plus caudaux et l'allure de la progression de la densité selon le niveau rostro-caudal est similaire à celle de la densité des récepteurs D2.

Dans le noyau caudé, on observe une plus grande variabilité entre le groupe antisens et le groupe contrôle, le groupe antisens tendant à exprimer une densité plus faible de D1 au niveau des ODN, bien que les deux courbes ne divergent pas de façon significative (figures 69 et 70).

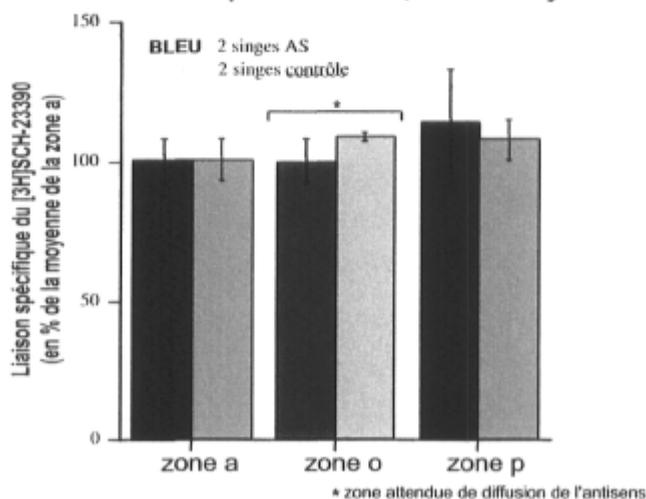
**Effet de l'administration continue d'antisens D2 dans le putamen des macaques GA et PA sur la liaison D1 par comparaison avec l'ODN contrôle infusé dans le putamen des macaques GM et PM, dans le putamen**



Légende: zone a = zone antérieure à la zone de diffusion, plus rostrale  
 zone o = zone de diffusion des ODNs  
 zone p = zone postérieure à la zone de diffusion, plus caudale

Figure 69 : Densité mesurée des DIR dans le putamen total bilatéral de PA et GA, traitées à l'ODN antisens, par rapport à la densité mesurée pour PM et GM, traitées à l'ODN contrôle.

**Effet de l'administration continue d'antisens D2 dans le putamen des macaques GA et PA sur la liaison D1 par comparaison avec l'ODN contrôle infusé dans le putamen des macaques GM et PM, dans le noyau caudé**



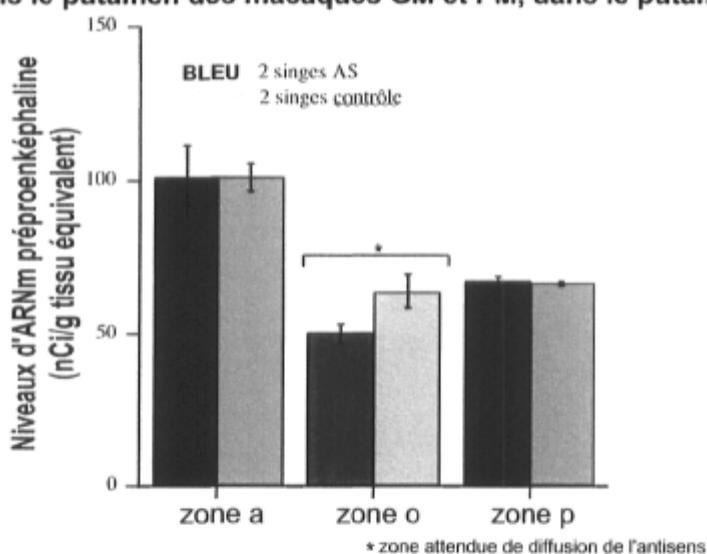
Légende: zone a = zone antérieure à la zone de diffusion, plus rostrale  
 zone o = zone de diffusion des ODNs  
 zone p = zone postérieure à la zone de diffusion, plus caudale

Figure 70 : Densité mesurée des DIR dans le noyau caudé total bilatéral de PA et GA, traitées à l'ODN antisens, par rapport à la densité mesurée pour PM et GM (ODN contrôle).

### Hybridation de la préproenképhaline

L'hybridation de la préproenképhaline a permis d'observer une différence significative entre le groupe antisens et le groupe contrôle, les niveaux d'ARNm étant plus bas du côté antisens au niveau de la zone de diffusion de l'ODN, alors qu'ils sont comparables pour les niveaux plus rostraux ou plus caudaux. On remarque également un gradient décroissant évident du niveau d'ARNm de la PPE le long de l'axe rostro-caudal pour les deux courbes. Le noyau caudé montre deux courbes similaires entre elles à tous les niveaux (figures 71 et 72).

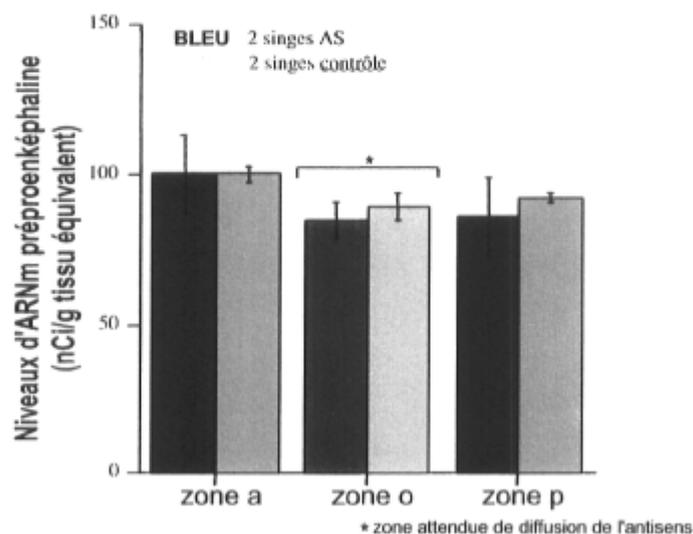
**Effet de l'administration continue d'antisens D2 dans le putamen des macaques GA et PA sur les niveaux d'ARNm de la préproenképhaline par comparaison avec l'ODN contrôle infusé dans le putamen des macaques GM et PM, dans le putamen**



Légende: zone a = zone antérieure à la zone de diffusion, plus rostrale  
 zone o = zone de diffusion des ODNs  
 zone p = zone postérieure à la zone de diffusion, plus caudale

Figure 71 : Densité mesurée d'ARNm préproenképhaline dans le putamen total bilatéral de PA et GA, traitées à l'ODN antisens, par rapport à la densité mesurée pour PM et GM (ODN contrôle).

**Effet de l'administration continue d'antisens D2 dans le putamen des macaques GA et PA sur les niveaux d'ARNm de la préproenképhaline par comparaison avec l'ODN contrôle infusé dans le putamen des macaques GM et PM, dans le noyau caudé**



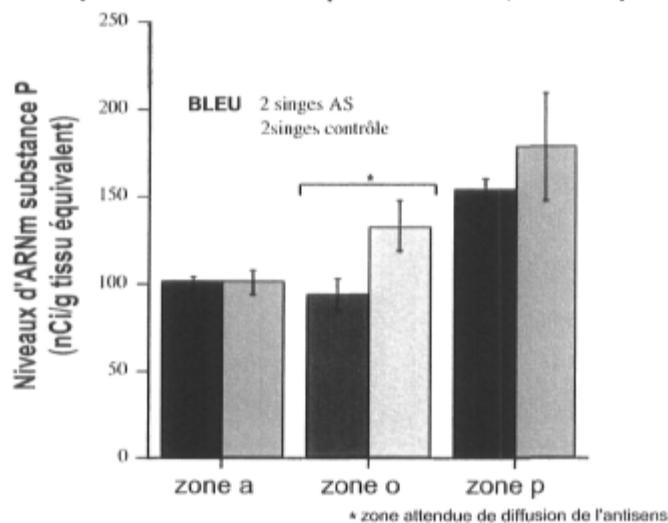
Légende: zone a = zone antérieure à la zone de diffusion, plus rostrale  
 zone o = zone de diffusion des ODNs  
 zone p = zone postérieure à la zone de diffusion, plus caudale

Figure 72 : Densité mesurée d'ARNm préproenképhaline dans le noyau caudé total bilatéral de PA et GA, traitées à l'ODN antisens, par rapport à la densité mesurée pour PM et GM (ODN contrôle).

### Hybridation de la substance P

Pour le putamen médian, l'hybridation de la substance P a démontré une baisse certaine des niveaux d'ARNm vis-à-vis de l'aire de diffusion supposée des ODN chez les singes antisens; la courbe rostro-caudale est toutefois similairement croissante du côté antisens et du côté contrôle. Par ailleurs, le noyau caudé présente également des courbes d'allure croissante, sans différence majeure d'un côté à l'autre (figures 73 et 74).

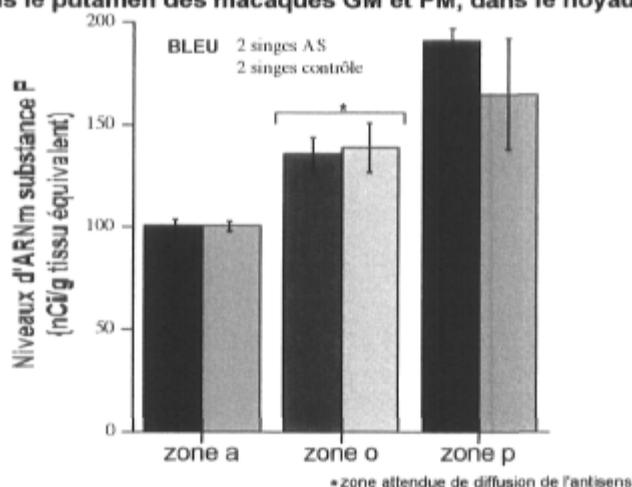
**Effet de l'administration continue d'antisens D2 dans le putamen des macaques GA et PA sur les niveaux d'ARNm de la substance P par comparaison avec l'ODN contrôle infusé dans le putamen des macaques GM et PM, dans le putamen**



Légende: zone a = zone antérieure à la zone de diffusion, plus rostrale  
 zone o = zone de diffusion des ODNs  
 zone p = zone postérieure à la zone de diffusion, plus caudale

Figure 73 : Densité mesurée d'ARNm substance P dans le putamen total bilatéral de PA et GA, traitées à l'ODN antisens, par rapport à la densité pour PM et GM (ODN contrôle).

**Effet de l'administration continue d'antisens D2 dans le putamen des macaques GA et PA sur les niveaux d'ARNm de la substance P par comparaison avec l'ODN contrôle infusé dans le putamen des macaques GM et PM, dans le noyau caudé**



Légende: zone a = zone antérieure à la zone de diffusion, plus rostrale  
 zone o = zone de diffusion des ODNs  
 zone p = zone postérieure à la zone de diffusion, plus caudale

Figure 74 : Densité mesurée d'ARNm substance P dans le noyau caudé total bilatéral de PA et GA, traitées à l'ODN antisens, par rapport à la densité pour PM et GM (ODN contrôle).

## CHAPITRE 4 : DISCUSSION

### 4.1 DISCUSSION GÉNÉRALE

Le présent travail a permis de démontrer que la stratégie antisens pouvait être utilisée de façon efficace chez le primate non humain pour la caractérisation du rôle de protéines exprimées au niveau du système nerveux central. L'infusion continue intracérébrale d'ODN à une concentration idéale de 5 µg/µl permet une diffusion satisfaisante des ODN dans la substance grise, cause peu de toxicité et est assez efficace pour donner des changements comportementaux observables et spécifiques. Ces résultats ont été obtenus malgré le fait que la diminution de la protéine visée (le récepteur D2 ici) n'ait pas été détectable par les techniques de liaison utilisées, de façon peu surprenante vu la pharmacocinétique du récepteur ciblé (Qin *et al.*, 1995; Weiss *et al.*, 1997a et b; Davidkova *et al.*, 1998).

Cette étude a également permis de mettre en lumière certaines caractéristiques du récepteur D2 au niveau du putamen chez le primate non humain: il est associé à l'utilisation préférentielle de la main, au climbing et à l'initiation de rotation sous quinpirole chez des animaux lésés, mais n'affecte pas la vitesse d'exécution. Ces résultats se comparent à ceux obtenus chez les rongeurs et confirment les trouvailles au niveau de la vitesse d'exécution chez les souris knock-out D2 de Kelly *et al.* (Weiss *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 1997b; Davidkova *et al.*, 1998; Kelly *et al.*, 1998). Du point de vue biochimique, la diminution de la synthèse du récepteur D2 paraît affecter à la baisse les niveaux de substance P et de préproenképhaline, ce qui différencierait de l'effet d'un blocage D2 pharmacologique ou d'un knock-out du récepteur D2 (Le Moine et Bloch, 1995; Baik *et al.*, 1995; Missale *et al.*, 1998; Steiner et Gerfen, 1998 et 1999; Jung *et al.*, 1999; Morissette *et al.*, 1999; Murer *et al.*, 2000). Nous ne pouvons malheureusement pas comparer les résultats biochimiques à ceux obtenus chez le rat, les niveaux de neuropeptides chez des animaux sous antisens D2 n'ayant pas été rapportés dans les études.

## **4.2 CHOIX DU SUJET**

Tel que précédemment mentionné, la stratégie antisens constitue une alternative prometteuse à l'approche pharmacologique et à l'approche transgénique. Utilisée au niveau du système nerveux central, elle a donné des résultats intéressants jusqu'à maintenant chez les rongeurs, en particulier en ce qui concerne le rôle des récepteurs dopaminergiques. Ces récepteurs sont d'un intérêt tout particulier car ils seraient impliqués dans la pathogenèse des dyskinésies induites par la L-DOPA chez les malades atteints de la maladie de Parkinson.

Afin d'obtenir des résultats plus facilement transposables chez l'humain, il importe de pouvoir appliquer la stratégie antisens chez le primate. Le changement de sujet animal du rongeur au primate nécessite toutefois un ajustement vu l'impossibilité d'utiliser un très grand nombre de sujets, le manque de connaissance quant au séquençage des gènes, le changement de dimension des structures visées, les types de tests comportementaux possibles à exécuter avec les animaux et finalement l'absence de données sur le sujet.

## **4.3 L'ANIMAL**

Le macaque à longue queue constituant un bon modèle animal tant comportemental que biochimique pour tester de nouvelles molécules visant à traiter la maladie de Parkinson, il s'agit d'un sujet de choix pour tenter de caractériser le rôle exact du récepteur D2 au niveau des ganglions de la base. Vu les ressources importantes nécessaires à l'entretien de ces singes, il n'a toutefois pas été possible d'utiliser un grand nombre de sujets pour une même expérience. Par ailleurs, nous avons dû mettre au point nos propres tests comportementaux afin de tenter de mesurer l'impact de l'antisens D2 sur le comportement moteur de l'animal, les tests utilisés chez les rats lors d'expériences semblables étant non applicables aux primates. De plus, vu le comportement unique de chaque animal, tous les singes utilisés n'ont pas participé de la même manière aux tests comportementaux développés lors de ce projet. Par conséquent, la comparaison des résultats obtenus s'est faite par rapport au comportement de base d'un singe donné et les

résultats biochimiques n'ont été regroupés que pour la dernière expérience. Nous n'avons donc pas cherché à faire d'analyses statistiques qui eurent été de peu de poids et nous sommes donc restés dans le descriptif pour les résultats.

Le “défrichage” ayant été accompli lors de ce travail et dans celui d'Isabelle Weppe, nous sommes maintenant en mesure de suggérer un modèle d'utilisation de la stratégie antisens D2 chez le macaque ainsi que des techniques d'évaluation de son impact comportemental et biochimique. Des expériences menées avec un plus grand nombre d'animaux seront nécessaires pour confirmer le succès de ce modèle d'utilisation de la stratégie antisens chez le primate non humain afin de caractériser le rôle exact du récepteur D2 au niveau des ganglions de la base.

Afin d'avoir le plus de chance possible d'observer un effet de notre sonde antisens sur le comportement moteur du macaque, nous avons choisi de cibler le putamen, structure des ganglions de la base riche en récepteurs D2 et plus susceptible d'influencer le comportement locomoteur du singe que le noyau caudé selon les études par lésion (Kendall *et al.*, 2000).

#### **4.4 RÉCEPTEUR D2**

Le clonage du récepteur D2 du *Macaca cynomolgus* ayant été effectué lors d'un précédent travail par Isabelle Weppe, nous référons à son mémoire pour une discussion à ce niveau.

#### **4.5 PROPRIÉTÉS DE LA SONDE ANTISENS**

##### **4.5.1 Général**

La sonde antisens a été synthétisée selon les règles actuellement considérées comme garantissant un meilleur résultat. Premièrement, la sonde est d'une longueur totale se situant entre 15-20 bases afin de garantir la spécificité sans compromettre la pénétration intracellulaire. Deuxièmement, la séquence choisie vise la région du codon d'initiation afin d'augmenter l'efficacité à altérer la traduction de l'ARNm et de s'assurer de toucher tant le

D2R court que le D2R long. Troisièmement, elle comporte un squelette modifié en phosphorothioates « end-capped » uniquement afin d'assurer le meilleur ratio stabilité sur toxicité. Finalement, nous avons utilisé une sonde contrôle constituée à partir des mêmes bases mais réparties aléatoirement, ce que l'on retrouve de façon usuelle dans la majorité des expérimentations avec la stratégie antisens (Weiss *et al.*, 1997a; Stein, 1998; Crooke, 1999; Myers et Dean, 2000). Par ailleurs, bien que nous ne puissions quantifier l'effet non spécifique de nos sondes, n'ayant pas comparé tant les sondes contrôle qu'antisens avec une infusion de salin isotonique, nous pouvons supposer que les différences observées sous antisens par rapport à la séquence contrôle aléatoire dite « scrambled » (brouillée) sont des effets spécifiques de la sonde antisens D2.

La plupart des spécialistes recommandent de synthétiser plusieurs sondes antisens et contrôles différentes afin d'en tester l'efficacité et la toxicité *in vitro* ou sur un petit groupe de sujets animaux. Cette technique permet de vérifier l'efficacité des sondes et de choisir la plus appropriée. Les sujets utilisés pour la présente expérience étant des singes de type macaque, cette procédure a été impossible à réaliser. En effet, le récepteur D2 du *Macaca cynomolgus* n'avait jamais été cloné et encore moins exprimé par des lignées cellulaires transgéniques, ce qui interdisait tout test *in vitro*. De plus, chaque expérience avec les primates en question représentant une somme considérable d'argent et de temps, il était impossible de tester préalablement plusieurs sondes différentes sur les animaux. Les différences existant entre le gène D2 du macaque à longue queue et celui des autres espèces animales les plus utilisées en laboratoire empêchaient également de mener un essai sur un autre type de bête. Cela constitue donc une lacune pour les expérimentations rapportées dans le présent mémoire, la sonde antisens mise au point ne pouvant être considérée de façon sûre comme peu toxique et très efficace pour diminuer la synthèse du récepteur D2 au niveau de l'encéphale du primate. Le caractère pionnier du travail consistait toutefois justement en grande partie à juger de la possibilité d'utiliser efficacement une sonde antisens dans ce contexte. Il faut donc garder en mémoire que la sonde ici utilisée n'est peut-être pas optimale, et nous ne pouvons donc affirmer avoir exploré largement le potentiel de la stratégie antisens chez le primate, tant au niveau de la sonde elle-même que de son mode d'administration. Nous offrons cependant un essai encourageant avec cette

technique ainsi qu'un premier point de comparaison dans l'utilisation de la stratégie antisens chez les primates non humains.

#### 4.5.2 Mode d'administration

Vu le volume des structures visées chez le macaque par rapport à celles du rat, l'infusion d'ODN dans le liquide céphalo-rachidien était impossible, nécessitant une quantité trop importante de sonde antisens. De plus, l'infusion dans le LCR ne permet pas de viser les récepteurs d'une structure cérébrale donnée et présente un potentiel de toxicité plus élevé vu les hautes concentrations nécessaires lors de l'injection pour balancer la dilution dans le LCR. Par ailleurs, l'injection intracérébrale d'un vecteur exprimant l'antisens D2 était techniquement impossible à réaliser, vu le manque d'études permettant de se situer (type de vecteur, séquence, etc.), et elle risquait d'entraîner une réponse immunologique plus complexe. Nous avons donc choisi d'injecter les ODN directement dans le striatum afin de tenter de cibler avec précision les récepteurs d'une structure cérébrale choisie. Ceci nous permettait à la fois d'espérer couvrir une part importante de la structure avec la sonde malgré un volume considérablement plus grand que chez les rongeurs, et de découvrir l'implication dans le comportement moteur des récepteurs D2 de cette structure cible, particulièrement impliquée dans la maladie de Parkinson (voir section Diffusion plus bas).

L'infusion continue a été privilégiée par rapport aux injections ponctuelles car supposée permettre une plus grande réduction des récepteurs et causer moins de dommages cérébraux. Il est à noter que l'utilisation de canules intrastriatales cause une perte neuronale due au traumatisme infligé aux tissus par l'insertion de la canule et l'infusion du liquide. Ceci pourrait en soit causer une atteinte motrice et nous n'avons pas contrôlé l'effet d'une canule avec du salin seulement. Par contre, les singes n'ayant démontré aucun ralentissement dans le test de préhension avec le mMAP, il est peu probable que la lésion infligée au niveau du putamen ait été d'importance puisque les singes lésés au niveau du putamen de Kendall (Kendall *et al.*, 2000) avaient démontré une atteinte significative de leur rapidité lors de tests se rapprochant du mMAP. Par contre, les petites lésions du putamen dues à la canule mise en place et retirée pourraient avoir affecté les mesures biochimiques faites sur les coupes de cerveau des sujets. En effet, la canule n'ayant jamais

exactement la même position dans le putamen malgré l'approche stéréotaxique la plus rigoureuse possible (chaque singe présentant des variations anatomiques légères et le degré de précision lors de l'introduction de la canule n'étant pas de zéro), il est possible qu'un certain degré de perte neuronale ait influencé les calculs. Nous avons tenté de minimiser l'impact de cela en ne tenant pas compte de la zone de tissu lésée par la canule lors des quantifications, mais le fait que cette zone soit plus latérale ou médiale et plus ou moins étendue a pu fausser les résultats biochimiques obtenus.

### 4.5.3 Diffusion et toxicité

La caractérisation de la diffusion de l'antisens injecté en continu durant 7 jours au niveau de l'encéphale du primate constitue un résultat majeur de la présente étude. Grâce à l'infusion de la sonde marquée à la biotine, nous sommes en mesure d'affirmer que la diffusion de l'antisens s'effectue sur plus du tiers de l'aire du putamen en coupe frontale et sur plus de 2,8 mm en rostro-caudal, au minimum. Ceci constitue donc une proportion appréciable du volume du putamen. Par ailleurs, nous avons pu montrer la présence de biotine à l'intérieur des corps et noyaux neuronaux situés dans le volume de diffusion de la sonde antisens, ce qui nous assure que la sonde a effectivement pu pénétrer à l'intérieur des neurones et ainsi exercer son action. Finalement, le décompte des noyaux dans la zone de diffusion et hors de la zone de diffusion ne démontrant pas de perte neuronale secondaire à l'infusion de l'antisens, nous pouvons affirmer que l'infusion intrastriale de cette sonde a permis une diffusion satisfaisante de la sonde jusqu'à sa cible, et cela sans évidence de toxicité majeure causant la mort neuronale.

Il demeure toutefois possible que les sondes antisens et contrôle aient causé une toxicité au niveau neuronal sans aller jusqu'à provoquer la mort des cellules, pouvant par exemple mettre en branle des mécanismes inflammatoires et induire ou supprimer l'expression de certains gènes. Afin de caractériser ces effets non spécifiques, il faudrait ultérieurement conduire une expérience comparant les effets biochimiques et comportementaux des sondes par rapport à une infusion de salin. Toutefois, plusieurs expériences menées chez les rongeurs ont démontré que les sondes « end-capped » comme la nôtre causent peu de toxicité même au niveau biochimique (Broberger *et al.*, 2000; Agrawal, 1999). Il est intéressant de noter cependant l'absence d'études chez les rongeurs

ayant quantifié l'effet de l'antisens D2 sur l'expression de neuropeptides comme la PPE et la substance P. La présente étude constitue donc notre seul point de référence, et les résultats ne permettent donc pas de distinguer entre une toxicité ou un effet spécifique, sauf au niveau de la comparaison entre la sonde contrôle et la sonde antisens.

Puisque nous considérons que la diffusion dans la structure dépend beaucoup plus de la pression générée par la minipompe osmotique Alzet que de la concentration des ODN lorsque celle-ci varie dans un même ordre de grandeur, nous avons considéré que la diffusion a été comparable dans toutes les expériences malgré la baisse de concentration des ODN jusqu'au tiers de la concentration initialement utilisée lors du marquage à la biotine. Il pourrait toutefois être intéressant de confirmer cette hypothèse en infusant différentes concentrations d'antisens marqué pour en noter la diffusion. Par ailleurs, le marquage nucléaire pourrait varier de façon plus importante selon la concentration utilisée, mais nous n'avons pas évalué l'intensité du marquage et ne pouvons donc pas comparer. Les concentrations ont été diminuées en cours d'expérience afin de tenter de réduire la toxicité potentielle et les coûts associés à l'utilisation de sondes oligo.

#### **4.6 ÉTUDES COMPORTEMENTALES**

Nous avons pu confirmer que ce mode d'administration permettait de couvrir une part satisfaisante du volume de la structure grâce aux résultats obtenus avec la sonde marquée à la biotine. La diffusion ne touchant toutefois pas le volume entier du putamen, nous sommes conscients de ne pouvoir espérer un effet comportemental aussi évident que celui obtenu chez les rongeurs. De plus, la diffusion ne couvrant pas tout le putamen, il est possible que nous observions une plus grande variabilité d'un singe à l'autre selon la position finale légèrement variable de la canule, les différentes régions du putamen n'étant pas considérées comme uniformes pour leur implication dans les diverses tâches motrices (Pisa, 1988). Malgré l'implantation sous stéréotaxie des canules, l'utilisation de rayons X et la rectification des coordonnées visées après la visualisation du volume de diffusion, la coupe des cerveaux nous a permis de voir qu'il existe une marge d'erreur millimétrique dans la position finale de la canule. Nous croyons toutefois que vu la diffusion des ODN sur toute la largeur du putamen, la variation de position de la canule est peu significative,

sauf dans le cas du premier singe (HA84) où les coordonnées visées n'étaient pas les mêmes que dans les autres cas, la canule étant franchement trop médiale et située entre le putamen et le globus pallidus externe. La répétition de l'expérience avec un plus grand nombre de singes permettrait de voir si l'importance du changement comportemental corrèle avec la position finale exacte de la canule.

### Utilisation préférentielle de la main

En général, les singes soumis aux tests de la règle avec ou sans pot ont démontré une tendance à diminuer leur utilisation de la main contralatérale durant l'infusion de l'antisens. Les changements au niveau de l'utilisation de la main étant présents mais peu prononcés, nous nous appuyons sur la tendance globale et systématique à moins utiliser la main contralatérale lors de l'infusion d'antisens à au moins l'un des tests pour proposer que la sonde antisens D2 a permis d'observer des changements au niveau du comportement moteur, et que tel qu'attendu (de la Fuente-Fernández *et al.*, 2000), ils ont consisté à diminuer l'utilisation préférentielle de la main sous l'influence du putamen recevant l'antisens. Si à l'occasion un animal n'a pas changé son patron gauche-droite lors de certains tests, il est à souligner qu'aucun animal chez qui les canules étaient positionnées dans le putamen n'a démontré d'augmentation de l'utilisation de la main contralatérale sous infusion d'antisens.

Un résultat particulièrement intéressant au niveau de ces tests se rencontre chez MA26, chez qui l'infusion d'antisens a créé une diminution de l'utilisation de la main contralatérale réversible lors du passage à l'infusion contrôle au test de la règle avec pots. Toutefois, bien que le sujet ait démontré des changements similaires lors de l'infusion de l'antisens au test de la règle sans pot, la réversibilité attendue sous passage à l'infusion contrôle n'a pas eu lieu. Cet animal étant ambidextre au contrôle et la tâche étant simple à réaliser, il est possible qu'il ait pris l'habitude de ramasser les récompenses d'une certaine manière sous antisens et ait maintenu cette habitude malgré l'absence d'antisens et la récupération des récepteurs D2. MA55 et MA35 ont doublé l'utilisation de la main contrôle durant l'infusion d'antisens au test de la règle sans pot, en moyenne. Au test de la règle avec pots, seule MA35 a démontré une diminution de l'utilisation de la main contralatérale. Il est probable, le test étant techniquement plus difficile et MA55 étant gauchère presque à

100 % à ce test durant les contrôles, que la diminution partielle des récepteurs D2 n'ait pas été suffisante pour changer son patron moteur.

Le volume de diffusion limité et la baisse probablement partielle des D2 pourrait également expliquer le fait que les singes n'aient pas complètement cessé l'utilisation de la main contralatérale à l'infusion d'antisens. Rappelons que chez les rats soumis à un antisens D2, de tels tests d'utilisation préférentielle de la patte avant n'ont pu être réalisés et nous ne pouvons donc comparer nos résultats à ceux d'autres équipes.

Un seul animal a démontré une tendance à l'augmentation de l'utilisation de la main contralatérale à l'antisens. Tel que mentionné précédemment, il s'agit du sujet HA84 chez qui la canule était beaucoup trop médiale vu l'utilisation de coordonnées stéréotaxiques différentes. La diffusion de l'antisens s'est donc faite en grande partie dans le globus pallidus externe et, dans une moindre portion que chez les autres animaux, dans le putamen médian. Puisque l'on sait que le globus pallidus du rat exprime de l'ARNm des récepteurs D2 en quantité importante et réagit à l'infusion d'antagoniste D2 en démontrant une induction de Fos semblable à celle observée dans le striatum lors d'une infusion intrastriale identique (Marshall *et al.*, 2001), on peut supposer que la diminution sous antisens des récepteurs D2 exprimés par le globus pallidus externe même (et non les récepteurs présynaptiques des terminaisons striato-pallidales tels que possiblement touchés dans l'étude de Galvan (Galvan *et al.*, 2001) ait causé une diminution de l'inhibition des neurones pallido-thalamiques et donc une favorisation du mouvement de ce côté, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de l'utilisation préférentielle de la main contralatérale à l'antisens. Il ne s'agit que de suppositions toutefois, mais de voir l'effet de l'infusion d'antisens D2 à l'intérieur des différentes structures des ganglions de la base pourrait éventuellement constituer une autre expérience profitable.

Un seul animal lésé MPTP a été utilisé pour le test d'utilisation préférentielle de la main, soit le macaque hémiparkinsonien HP1. Sous agoniste D1, on remarque une courbe décroissante d'utilisation de la main droite (contralatérale à la lésion et aux sondes antisens puis contrôle) qui ne semble pas se modifier sous l'influence de l'antisens ou de la séquence brouillée (« scrambled sequence »). La stimulation pulsatile par agoniste D1 de

façon chronique (comme ici sur près d'un mois) est reconnue pour donner des bénéfices moteurs de plus en plus courte durée et de plus en plus de dyskinésies (Morissette *et al.*, 1999; Calon *et al.*, 2000). Par conséquent, la courbe d'utilisation de la main contralatérale à la lésion sous SKF 82958 est celle attendue chez un singe hémiparkinsonien ordinaire, et l'antisens D2 ne paraît donc pas avoir affecté de façon non spécifique la voie D1.

Sous agoniste D2, on remarque une courbe croissante lors des jours contrôle et du premier jour antisens, avec ensuite une courbe décroissante sous antisens et premier test ODN contrôle, avec une remontée par la suite. Les agonistes D2 courte durée comme le quinpirole ont tendance à causer une sensibilisation avec la répétition, ce qui explique probablement la montée rapide lors des jours contrôle. Les antisens prenant habituellement moins de 48 h pour avoir un impact au niveau comportemental après injection, il est surprenant que la courbe continue à monter au premier jour d'antisens. Il est possible que la canule ait été placée un peu trop haute ou trop latérale et qu'alors la diffusion de l'antisens jusqu'aux régions motrices du putamen ait pu en être retardée. Par ailleurs, les antisens pouvant avoir un impact jusqu'à au moins 48 h après la fin d'injections répétées, il est également plausible que la première journée d'expérimentation sous sonde aléatoire ait reflété la fin de l'effet de l'antisens (Weiss *et al.*, 1997a; Zhou *et al.*, 1996).

En fait, la courbe décroissante semble déplacée vers la droite par rapport à la courbe attendue, et il est possible que cela soit explicable par la position de la canule, position qui n'a pu être confirmée puisque l'animal n'a pas été sacrifié. Par ailleurs, la diminution inattendue de l'utilisation de la main contralatérale au dernier jour d'expérimentation sous sonde aléatoire est probablement liée à l'augmentation significative des dyskinésies. En effet, d'un point de vue qualitatif, les dyskinésies s'étaient considérablement accrues et, lors de cette dernière journée, l'animal a presque toujours cherché à utiliser sa main droite en premier. Toutefois, des dyskinésies majeures l'empêchant de se saisir des morceaux de fruits, l'animal passait à la main gauche après plusieurs essais infructueux. Il semblerait donc que le singe préférait utiliser la main droite, mais ne pouvait parvenir à la contrôler adéquatement. De telles dyskinésies incapacitantes n'étaient pas visibles au moment où l'animal s'est mis à moins utiliser sa main droite aux journées antisens et à la première journée sonde contrôle. Ceci soulève la question de l'effet de l'antisens sur les dyskinésies

sous agonistes dopaminergiques, puisqu'elles ont semblé augmenter de façon majeure et rapide après l'arrêt de l'antisens. Cela n'a malheureusement pas encore été étudié, et l'expérience avec HP1 n'était pas conçue pour le faire.

#### Rotations contralatérales sous agonistes dopaminergiques

L'expérience avec HP2 présente des similitudes avec celle de HP1. Au niveau des rotations contralatérales sous SKF 82958, on remarque une tendance légère vers la désensibilisation. Il est à noter toutefois que les expériences avec le SKF ont été limitées à une stimulation par tranche (tranche contrôle, tranche antisens, tranche ODN aléatoires) afin de tenter de ne pas induire de dyskinésies majeures comme chez HP1 tout en répétant plusieurs fois la stimulation au quinpirole. Une prochaine expérience pourrait mériter un plus grand nombre de contrôles sous SKF 82958 (au moins deux par tranche).

Au décours des stimulations par le quinpirole, on remarque une baisse dramatique des rotations contralatérales sous antisens, tel qu'attendu (Weiss *et al.*, 1997b; Zhou *et al.*, 1996). Qui plus est, le nombre de rotations diminue entre le premier et le deuxième test, ce qui confirme l'effet spécifique de l'antisens, plutôt qu'un résultat non spécifique dû à la création d'une lésion (bien qu'un effet dû à une lésion aussi minime et n'affectant pas la vitesse d'exécution ait de toute façon été surprenant). Le troisième test se faisant au jour 7 postimplantation de la canule, l'augmentation du nombre de tours peut s'expliquer par une compensation du système passant par l'augmentation de la synthèse des D2 chez un animal lésé et stimulé de façon pulsatile ou par une sensibilisation au quinpirole. Sous ODN contrôle le nombre de tours augmente encore et plafonne, tel qu'attendu et de façon similaire à l'utilisation préférentielle de la main chez HP1.

#### Vitesse d'exécution

Aucun sujet n'ayant démontré de diminution de sa vitesse d'exécution au mMAP suite à la pose de la canule et l'infusion d'antisens, il semble évident que les RD2 n'ont pas un rôle prépondérant à ce niveau, et ceci en accord avec les modèles de souris knock-out D2 ayant tenu compte du bagage génétique (Kelly *et al.*, 1998).

### Climbing

Le sujet MA55 a été le seul à faire du climbing lorsque stimulé au quinpirole. Sous antisens, tel qu'attendu, il a diminué de façon majeure le nombre de climblings, et ce de façon plus importante au deuxième test sous antisens qu'au premier, et malgré une tendance à la sensibilisation lors des jours contrôle (Davidkova *et al.*, 1998). Il serait intéressant de tenter de sélectionner des singes faisant du climbing sous quinpirole pour répéter l'expérience.

### Quantité de mouvement chez PM, GA et PA

Les résultats comportementaux chez PM, GA et PA sont difficiles à interpréter vu le fait que ces animaux n'étaient pas acclimatés depuis longtemps à leur cage d'observation, faute de temps, et vu que GM a dû être retirée des analyses suite au développement d'un comportement dépressif de base et d'un comportement automutilatoire sous agonistes. De plus, vu la grande différence d'âge entre PM et GA, et les récepteurs dopaminergiques se modifiant avec l'âge (Palacios *et al.*, 1988), il est possible que PM ne soit pas un contrôle adéquat pour le comportement par rapport à GA. Par ailleurs, la concentration d'ODN a été plus basse chez ces quatre singes et, puisqu'ils sont les sujets ayant démontré les résultats les moins consistants au niveau comportemental, on peut également supposer que la concentration de 2,5 µg/µl est trop basse pour donner des effets comportementaux moteurs notables lors d'une administration bilatérale d'antisens (versus sonde aléatoire). Il est toutefois à noter que le niveau d'activité à l'état de base semble avoir tendance à diminuer chez les deux animaux recevant l'antisens, tendance que l'on ne retrouve pas chez PM (sonde contrôle). Ceci correspondrait aux résultats attendus (Clifford *et al.*, 2000; Davidkova *et al.*, 1998; Dzedzicka-Wasylewska, *et al.*, 2000; Jung *et al.*, 1999; Kelly *et al.*, 1998; Weiss *et al.*, 1993 et 1997; Zhang et Creese, 1993; Zhou *et al.*, 1996) et soulève l'intéressante possibilité que la chirurgie elle-même ne crée pas une diminution de l'activité motrice, tel qu'observé chez PM.

Dans le cas de la stimulation à l'apomorphine, on ne retrouve pas de diminution de l'activité suite à l'administration de l'antisens chez PA mais plutôt une sensibilisation au fil des répétitions. Au contraire, on remarque une discrète diminution de l'activité

postchirurgie chez PM, et une désensibilisation progressive et légère chez GA même avant la chirurgie. Ces données sont difficilement interprétables puisque chaque singe réagit différemment ici. L'apomorphine étant un agoniste dopaminergique mixte, il n'est toutefois pas surprenant que PA puisse se sensibiliser malgré la présence de l'antisens. Pour ce qui est de la stimulation au quinpirole, PA et GA démontrent tel qu'attendu une diminution de l'activité globale ou à tout le moins un frein à la sensibilisation attendue. Dans le cas de PM toutefois, bien qu'il n'y ait pas de baisse globale importante de l'activité motrice, on ne retrouve étonnamment pas la réaction de sensibilisation habituelle sous quinpirole, ce qui rend les résultats difficilement interprétables à nouveau. L'appareil qui mesure les mouvements de l'animal n'étant sensible qu'aux mouvements qui font passer le collier émetteur à travers son champ, cette méthode de mesure n'est peut-être pas très sensible puisqu'un animal comme PM, qui réagit au quinpirole avec des mouvements stéréotypés de la tête surtout plutôt que des membres, ne verra pas ses mouvements comptés de manière adéquate.

Pour une prochaine expérience, nous recommandons donc de ne pas utiliser une concentration aussi basse d'ODN, de compter l'activité locomotrice avec un appareil beaucoup plus sensible à tout type de mouvement ou alors d'élaborer d'autres tests comportementaux (par exemple, choisir des singes qui font du climbing sous agonistes dopaminergiques) et enfin de choisir des sujets dont l'âge se compare et qui auront eu quelques semaines pour s'adapter à leur environnement. Le modèle avec antisens dans un seul hémisphère et sonde aléatoire dans l'autre semble plus facile à étudier au point de vue comportemental.

#### **4.7 ÉTUDES BIOCHIMIQUES**

Tel que précédemment mentionné, la présence de la lésion due à la canule dans le putamen a pu nuire aux évaluations biochimiques. En effet, la canule n'étant jamais au même endroit exactement, ceci constitue un facteur d'erreur dans les quantifications réalisées. De plus, à part pour les singes GA, GM, PA et PM, les manipulations de laboratoires ayant été réalisées séparément pour chaque individu et sur un intervalle de temps de plus d'un an, les résultats ne peuvent que difficilement être comparés d'un animal

à un autre. De plus, les niveaux de récepteurs dopaminergiques n'étant pas symétriques au niveau des deux hémisphères chez les macaques (Giardino, 1996), les singes MA35 et MA55 ne permettent pas d'affirmer si les légères différences d'un hémisphère à l'autre constituent l'état de base de l'animal ou l'effet de l'antisens. Par conséquent, les résultats les plus fiables au niveau biochimique sont probablement ceux de GA, GM, PA et PM, en particulier parce que la moyenne d'âge était comparable pour les deux groupes, que les manipulations et analyses ont été réalisées simultanément et qu'une moyenne a été obtenue pour les deux hémisphères de chaque animal puis pour chaque groupe. Ainsi, les résultats ont été représentés en proportion de la moyenne globale des niveaux plus rostraux pour chaque groupe par rapport à lui-même, rendant la position de la canule dans chaque putamen ainsi que les niveaux de base pour chaque animal moins déterminants. À noter que l'âge importe car les récepteurs dopaminergiques connaissent une baisse naturelle avec le vieillissement normal (Roth et Joseph, 1994).

#### Essais de liaison D2 et D1

Aucune diminution des récepteurs D2 ou D1 n'a pu être mise en évidence suite à l'administration d'antisens D2. Cela est compatible avec les études chez le rat, qui n'ont pu mettre en évidence que de très légères baisses des niveaux de D2 (environ 15 %) malgré le fait que dans leur cas, l'antisens diffusait dans tout le volume du putamen (Weiss *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1996). Ceci est dû, tel que précédemment mentionné, à la présence à la surface des neurones striataux d'un pool non fonctionnel de récepteurs D2, qui forment la majorité des récepteurs mesurés lors d'un essai de liaison (Qin *et al.*, 1995). Il est à noter que chez PA, PM, GM et GA, aucune diminution ni des D2 ni des D1 n'a été visible dans le groupe antisens par rapport au groupe contrôle. Chez MA55 et MA35, une diminution légère à la fois des RD1 et des RD2 a été mise en évidence dans l'hémisphère antisens par rapport à l'hémisphère contrôle, mais cette baisse étant visible également dans le noyau caudé ou dans les niveaux où l'antisens n'avait pas diffusé, cette asymétrie correspond fort probablement à l'état de base de ces animaux.

### Hybridations in situ PPE et substance P

Contrairement aux résultats obtenus avec l'infusion d'antagonistes dopaminergiques (Missale et al., 1998; Steiner et Gerfen, 1998), l'administration d'antisens D2 a causé une diminution de la préproenképhaline chez GM, PM, PA et GA, et peu de changements chez MA55 et MA35. Puisque le groupe antisens (PA et GA) a également présenté une baisse des niveaux de substance P par rapport au groupe sonde aléatoire (PM et GM), alors que MA55 et MA35 ont à nouveau eu des niveaux comparables du côté antisens et du côté contrôle, on peut se demander s'il s'agit d'un effet spécifique de la diminution de synthèse des D2 ou encore un effet toxique qui diminue la synthèse des neuropeptides. Il serait étonnant que la sonde antisens présente des effets toxiques non spécifiques que la sonde aléatoire ne présenterait pas. Il est donc plus probable que la diminution de la synthèse des récepteurs D2 ait un effet différent du blocage pharmacologique du récepteur de surface. On ne sait toutefois pas exactement comment les niveaux de D2, de PPE et de substance P sont reliés, mais la diminution concomitante des deux neuropeptides est en faveur d'une communication entre les voies directe et indirecte. Nous ne pouvons malheureusement pas ici nous référer aux résultats obtenus chez le rat pour comparer puisque, à notre connaissance, aucune équipe n'a mesuré les niveaux de ces neuropeptides sous antisens D2, ce qui apparaît assez surprenant.

### 4.8 CONCLUSION

L'utilité de la stratégie antisens afin de caractériser le rôle des récepteurs dopaminergiques centraux a déjà été établie chez des modèles de rongeurs. Cette méthode d'étude des récepteurs permet une diminution de la protéine visée sans régulation à la hausse, sans compensation lors de la phase embryonnaire et avec une spécificité supérieure à celle des agents pharmacologiques.

Le présent mémoire tend à démontrer que, bien que de nouvelles expériences avec un plus grand nombre de sujets devraient être menées afin de vérifier la reproductibilité des résultats, la sonde antisens peut aussi être un outil précieux de recherche chez le primate non humain lorsque utilisée en infusion intracérébrale. Malgré l'absence prévisible de

### Hybridations in situ PPE et substance P

Contrairement aux résultats obtenus avec l'infusion d'antagonistes dopaminergiques (Missale et al., 1998; Steiner et Gerfen, 1998), l'administration d'antisens D2 a causé une diminution de la préproenképhaline chez GM, PM, PA et GA, et peu de changements chez MA55 et MA35. Puisque le groupe antisens (PA et GA) a également présenté une baisse des niveaux de substance P par rapport au groupe sonde aléatoire (PM et GM), alors que MA55 et MA35 ont à nouveau eu des niveaux comparables du côté antisens et du côté contrôle, on peut se demander s'il s'agit d'un effet spécifique de la diminution de synthèse des D2 ou encore un effet toxique qui diminue la synthèse des neuropeptides. Il serait étonnant que la sonde antisens présente des effets toxiques non spécifiques que la sonde aléatoire ne présenterait pas. Il est donc plus probable que la diminution de la synthèse des récepteurs D2 ait un effet différent du blocage pharmacologique du récepteur de surface. On ne sait toutefois pas exactement comment les niveaux de D2, de PPE et de substance P sont reliés, mais la diminution concomitante des deux neuropeptides est en faveur d'une communication entre les voies directe et indirecte. Nous ne pouvons malheureusement pas ici nous référer aux résultats obtenus chez le rat pour comparer puisque, à notre connaissance, aucune équipe n'a mesuré les niveaux de ces neuropeptides sous antisens D2, ce qui apparaît assez surprenant.

### 4.8 CONCLUSION

L'utilité de la stratégie antisens afin de caractériser le rôle des récepteurs dopaminergiques centraux a déjà été établie chez des modèles de rongeurs. Cette méthode d'étude des récepteurs permet une diminution de la protéine visée sans régulation à la hausse, sans compensation lors de la phase embryonnaire et avec une spécificité supérieure à celle des agents pharmacologiques.

Le présent mémoire tend à démontrer que, bien que de nouvelles expériences avec un plus grand nombre de sujets devraient être menées afin de vérifier la reproductibilité des résultats, la sonde antisens peut aussi être un outil précieux de recherche chez le primate non humain lorsque utilisée en infusion intracérébrale. Malgré l'absence prévisible de

changement du niveau de la protéine D2 au niveau des essais de liaison, une diffusion adéquate et des effets comportementaux consistants ont été observés et permettent de croire à l'efficacité des oligonucléotides antisens au niveau du striatum chez le macaque.

Par ailleurs, bien que ces résultats soient à confirmer par l'étude d'un plus grand nombre de singes qui partageraient des caractéristiques de base comparables, il semblerait que la diminution partielle des récepteurs D2 au niveau du putamen cause une diminution des rotations et du climbing induits par les agonistes dopaminergiques lorsque présents ainsi qu'une diminution de l'utilisation préférentielle de la main contralatérale. La vitesse d'exécution ne serait toutefois pas modifiée par une telle diminution des récepteurs (surtout étudié en infusion unilatérale toutefois).

L'infusion intrastriatale d'oligonucléotides n'ayant pas causé de perte neuronale importante et n'ayant pas provoqué de changement au niveau de la vélocité, tels que retrouvés lors de lésions des mêmes structures, il semblerait que la toxicité en soit mineure.

L'efficacité et la faible toxicité de la stratégie antisens en infusion intracérébrale chez le macaque, si confirmées par de futures expériences avec un plus grand nombre de sujets, permettent de présenter un nouvel outil de recherche dans le cadre des maladies impliquant le système dopaminergique. On peut entre autres penser à des applications pour la caractérisation de l'impact de chaque récepteur dopaminergique au niveau des dyskinésies induites par la L-DOPA. Éventuellement, il pourrait être possible d'envisager l'utilisation de la stratégie antisens comme option thérapeutique chez des patients atteints de troubles neurodégénératifs ou même, en visant les protéines concernées, de tumeurs solides du système nerveux central, pour lesquelles peu de traitements efficaces sont disponibles encore maintenant.

## BIBLIOGRAPHIE

- Agrawal S (1999) Importance of nucleotide sequence and chemical modifications of antisense oligonucleotides. *Biochim Biophys Acta*. Dec 10;1489(1):53-68. Review.
- Ahlskog JE, Muentner MD (2001) Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov Disord*. May;16(3):448-58.
- Baas H. (2000) Dyskinesia in Parkinson's disease. Pathophysiology and clinical risk factors. *J Neurol*. Sep; 247 Suppl 4:IV112-6.
- Baik JH, Picetti R, Saiardi A, Thiriet G, Dierich A, Depaulis A, Le Meur M, Borrelli E (1995) Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature*. Oct 5;377(6548):424-8.
- Beaudry G, Langlois MC, Weppe I, Rouillard C, Levesque D (2000) Contrasting patterns and cellular specificity of transcriptional regulation of the nuclear receptor nerve growth factor-inducible B haloperidol and clozapine in the rat forebrain. *J Neurochem*. Oct;75(4):1694-702.
- Beckstead RM, Wooten GF, Trugman JM (1988) Distribution of D1 and D2 dopamine receptors in the basal ganglia of the cat determined by quantitative autoradiography. *J Comp Neurol*. Feb 1;268(1):131-45.
- Bedard PJ, Blanchet PJ, Levesque D, Soghomonian JJ, Grondin R, Morissette M, Goulet M, Calon F, Falardeau P, Gomez-Mancilla B, Doucet JP, Robertson GS, Di Paolo T (1999) Pathophysiology of L-dopa-induced dyskinesias. *Mov Disord*. 14(S1) 1:4-8. Review.
- Bezard E, Brotchie JM, Gross CE (2001) Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: potential for new therapies. *Nat Rev Neurosci*. Aug;2(8):577-88. Review.
- Blanchet PJ, Allard P, Gregoire L, Tardif F, Bedard PJ (1996) Risk factors for peak dose dyskinesia in 100 levodopa-treated parkinsonian patients. *Can J Neurol Sci*. Aug;23(3):189-93.
- Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, Martignoni E (2000) Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. Sep; 62(1):63-88. Review.
- Boraud T, Bezard E, Bioulac B, Gross CE. (2001) Dopamine agonist-induced dyskinesias are correlated to both firing pattern and frequency alterations of pallidal neurones in the MPTP-treated monkey. *Brain*. Mar.; 124(3):546-57.
- Broberger C, Nylander I, Geijer T, Terenius L, Hokfelt T and Georgieva J (2000) Differential effects of intrastrially infused fully and endcap phosphorothioate

- antisense oligonucleotides on morphology, histochemistry and prodynorphin expression in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 75(1):25-45
- Calon F, Birdi S, Rajput AH, Hornykiewicz O, Bedard PJ, Di Paolo T (2002) Increase of preproenkephalin mRNA levels in the putamen of Parkinson disease patients with levodopa-induced dyskinesias. *J Neuropathol Exp Neurol.* Feb;61(2):186-96.
- Calon F, Hadj Tahar A, Blanchet PJ, Morissette M, Grondin R, Goulet M, Doucet JP, Robertson GS, Nestler E, Di Paolo T, Bedard PJ (2000) Dopamine-receptor stimulation: biobehavioral and biochemical consequences. *Trends Neurosci.* Oct;23(10 Suppl):S92-100.
- Calon F, Goulet M, Blanchet PJ, Martel JC, Piercey MF, Bedard PJ, Di Paolo T (1995) Levodopa or D2 agonist induced dyskinesia in MPTP monkeys: correlation with changes in dopamine and GABA<sub>A</sub> receptors in the striatopallidal complex. *Brain Res.* May 22;680(1-2):43-52.
- Camps M, Kelly PH, Palacios JM (1990) Autoradiographic localization of dopamine D1 and D2 receptors in the brain of several mammalian species. *J Neural Transm Gen Sect.* 80(2):105-27.
- Carter MS, Krause JE (1990) Nucleotide, protein structure, expression, and some regulatory mechanisms of the rat preprotachykinin gene encoding substance P, neurokinin A, neuropeptide K, and neuropeptide gamma. *J Neurosci.* Jul;10(7):2203-14.
- Cicchetti F, Prensa L, Wu Y, Parent A (2000) Chemical anatomy of striatal interneurons in normal individuals and in patients with Huntington's disease. *Brain Res Brain Res Rev.* Nov;34(1-2):80-101. Review.
- Clifford JJ, Usiello A, Vallone D, Kinsella A, Borrelli E, Waddington JL (2000) Topographical evaluation of behavioural phenotype in a line of mice with targeted gene deletion of the D2 dopamine receptor. *Neuropharmacology.* Jan 28;39(3):382-90.
- Comb, M., Seeburg, P.H., Adelman, J., Eiden, L. and Herbert, E (1982) Primary structure of the human Met- and Leu-enkephalin precursor and its mRNA. *Nature* 295(5851), 663-666
- Crooke ST (2000) Progress in the antisense technology: the end of the beginning. *Methods Enzymol.* 313: 3-45
- Dal Toso R, Sommer B, Ewert M, Herb A, Pritchett DB, Bach A, Shivers BD, Seeburg PH (1989) The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO J.* Dec 20;8(13):4025-34.
- Davidkova G, Zhou LW, Morabito M, Zhang SP, Weiss B (1998) D2 dopamine antisense RNA expression vector, unlike haloperidol, produces long-term inhibition of D2

- dopamine-mediated behaviors without causing Up-regulation of D2 dopamine receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* Jun;285(3):1187-96.
- DeLong MR (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* Jul;13(7):281-5. Review.
- Durif F (1999) Treating and preventing levodopa-induced dyskinesias: current and future strategies. *Drugs Aging.* May;14(5):337-45. Review.
- Durif F, Vidailhet M, Debilly B, Agid Y (1999) Worsening of levodopa-induced dyskinesias by motor and mental tasks. *Mov Disord.* Mar;14(2):242-5.
- Dziedzicka-Wasylewska M, Kolasiewicz W, Rogoz Z, Margas W, Maj J (2000) The role of dopamine D2 receptor in the behavioural effects of imipramine-study with the use of antisense oligonucleotides. *J Physiol Pharmacol.* Sep; 51 (3): 401-409
- Flaherty AW, Graybiel AM (1993) Output architecture of the primate putamen. *J Neurosci.* Aug;13(8):3222-37.
- Flanagan TRJ, Emerich DF, Winn SR. (1994) Providing Pharmacological Access to the Brain : Alternate Approaches, San Diego; Academic Press.
- de la Fuente-Fernandez R, Kishore A, Calne DB, Ruth TJ, Stoessl AJ (2000) Nigrostriatal dopamine system and motor lateralization. *Behav Brain Res.* Jul;112(1-2):63-8.
- Galvan A, Floran B, Erlij D, Aceves J (2001) Intrapallidal dopamine restores motor deficits induced by 6-hydroxydopamine in the rat. *J Neural Transm.* 108(2):153-66.
- Gash DM, Zhang Z, Umberger G, Mahood K, Smith M, Smith C, Gerhardt GA (1999) An automated movement assessment panel for upper limb motor functions in rhesus monkeys and humans. *J Neurosci Methods.* Jul 15;89(2):111-7.
- Gerfen CR, Keefe KA, Gauda EB (1995) 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. *J Neurosci.* Dec;15(12):8167-76.
- Gerfen CR et Wilson CJ.(1996) The basal ganglia. Swanson LW, Björklund A et Hökfelt T (Eds), Handbook of Chemical Neuroanatomy, Vol 12: Integrated Systems of the CNS, Part III. (pp. 402-409). Elsevier Science B.V.
- Gershanik O, Heikkila RE, Duvoisin RC (1983) Behavioral correlations of dopamine receptor activation. *Neurology.* Nov;33(11):1489-92.
- Giardino L (1996) Right-left asymmetry of D1- and D2-receptor density is lost in the basal ganglia of old rats. *Brain Res.* May 13;720(1-2):235-8.

- Giros B, Sokoloff P, Martres MP, Riou JF, Emorine LJ, Schwartz JC (1989) Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. *Nature*. Dec 21-28;342(6252):923-6.
- Glickstein SB, Schmauss C (2001) Dopamine receptor functions: lessons from knockout mice. *Pharmacol Ther*. Jul; 91(1): 63-83
- Hadj Tahar A, Grégoire L, Darré A, Bélanger N, Meltzer L, Bédard PJ (2004) Effect of a selective glutamate antagonist on L-dopa-induced dyskinesias in drug-naïve parkinsonian monkeys. *Neurobiology of Disease*. 15: 171-176.
- Hall H, Sedvall G, Magnusson O, Kopp J, Halldin C, Farde L (1994) Distribution of D1- and D2-dopamine receptors, and dopamine and its metabolites in the human brain. *Neuropsychopharmacology*. Dec;11(4):245-56.
- Hauber W (1998) Involvement of basal ganglia transmitter systems in movement initiation. *Prog Neurobiol*. Dec;56(5):507-40. Review.
- Hebb MO and Robertson HA (1997) End-capped antisense oligodeoxynucleotides effectively inhibit gene expression in vivo and offer a low-toxicity alternative to fully modified phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Brain Res Mol Brain Res* 47(1-2):223-8
- Herve D, Le Moine C, Corvol JC, Belluscio L, Ledent C, Fienberg AA, Jaber M, Studler JM, Girault JA (2001) Galpha(olf) levels are regulated by receptor usage and control dopamine and adenosine action in the striatum. *J Neurosci*. Jun 15;21(12):4390-9.
- Josselyn SA, Miller R, Beninger RJ (1997) Behavioral effects of clozapine and dopamine receptor subtypes. *Neurosci Biobehav Rev*. Sep;21(5):531-58. Review.
- Jung MY, Skryabin BV, Arai M, Abbondanzo S, Fu D, Brosius J, Robakis NK, Polites HG, Pintar JE, Schmauss C (1999) Potentiation of the D2 mutant motor phenotype in mice lacking dopamine D2 and D3 receptors. *Neuroscience*. 91(3):911-24.
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci*. Dec;18(12):527-35. Review.
- Kelly MA, Rubinstein M, Phillips TJ, Lessov CN, Burkhart-Kasch S, Zhang G, Bunzow JR, Fang Y, Gerhardt GA, Grandy DK, Low MJ (1998) Locomotor activity in D2 dopamine receptor-deficient mice is determined by gene dosage, genetic background, and developmental adaptations. *J Neurosci*. May 1;18(9):3470-9.
- Kendall AL, David F, Rayment G, Torres EM, Annett LE, Dunnett SB (2000) The influence of excitotoxic basal ganglia lesions on motor performance in the common marmoset. *Brain*. Jul; 123 (Pt 7): 1442-58.

- Kulkarni SK, Ninan I. Current concepts in the molecular diversity and pharmacology of dopamine receptors. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. Nov; 18(9): 599-613
- Lang AE, Lozano AM (1998a) Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med*. Oct 8;339(15):1044-53. Review.
- Lang AE, Lozano AM (1998b) Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med*. Oct 15;339(16):1130-43. Review.
- Langlois MC, Beaudry G, Zekki H, Rouillard C, Levesque D (2001) Impact of antipsychotic drug administration on the expression of nuclear receptors in the neocortex and striatum of the rat brain. *Neuroscience*. 106(1):117-28.
- Langston JW, Quik M, Petzinger G, Jakowec M, Di Monte DA(2000) Investigating levodopa-induced dyskinesias in the parkinsonian primate. *Ann Neurol*. Apr;47(4 S1):S79-89. Review.
- Le Moine C, Bloch B (1995) D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J Comp Neurol*. May 8;355(3):418-26.
- Loschmann PA, Smith LA, Lange KW, Jaehnig P, Jenner P, Marsden CD (1991) Motor activity following the administration of selective D-1 and D-2 dopaminergic drugs to normal common marmosets. *Psychopharmacology (Berl)*. 105(3):303-9.
- Marcotte ER, Sullivan RM, Mishra RK (1994) Striatal G-proteins: effects of unilateral 6-hydroxydopamine lesions. *Neurosci Lett*. Mar 14;169(1-2):195-8.
- Marshall JF, Henry BL, Billings LM, Hoover BR (2001) The role of the globus pallidus D2 subfamily of dopamine receptors in pallidal immediate early gene expression. *Neuroscience*. 105(2):365-78.
- McGeorge AJ, Faull RL (1989) The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience*. 29(3):503-37.
- Meador-Woodruff JH, Mansour A, Healy DJ, Kuehn R, Zhou QY, Bunzow JR, Akil H, Civelli O, Watson SJ Jr (1991) Comparison of the distributions of D1 and D2 dopamine receptor mRNAs in rat brain. *Neuropsychopharmacology*. Dec;5(4):231-42.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*. Jan;78(1):189-225. Review.
- Morissette M, Grondin R, Goulet M, Bedard PJ, Di Paolo T (1999) Differential regulation of striatal preproenkephalin and preprotachykinin mRNA levels in MPTP-lesioned monkeys chronically treated with dopamine D1 or D2 receptor agonists. *J Neurochem*. Feb;72(2):682-92.

- Morissette M, Goulet M, Soghomonian JJ, Blanchet PJ, Calon F, Bedard PJ, Di Paolo T (1997) Preproenkephalin mRNA expression in the caudate-putamen of MPTP monkeys after chronic treatment with the D2 agonist U91356A in continuous or intermittent mode of administration: comparison with L-DOPA therapy. *Brain Res Mol Brain Res*. Oct 3;49(1-2):55-62.
- Murer MG, Dziewczapolski G, Salin P, Vila M, Tseng KY, Ruberg M, Rubinstein M, Kelly MA, Grandy DK, Low MJ, Hirsch E, Raisman-Vozari R, Gershanik O (2000) The indirect basal ganglia pathway in dopamine D(2) receptor-deficient mice. *Neuroscience*. 99(4):643-50.
- Myers KJ, Dean NM (2000) Sensible use of antisense: how to use oligonucleotides as research tools. *Trends Pharmacol Sci*. Jan;21(1):19-23. Review.
- Olanow CW, Tatton WG (1999) Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci*. 22: 123-44. Review
- Okubo Y, Olsson H, Ito H, Lofti M, Suhara T, Halldin C, Farde L (1999) PET mapping of extrastriatal D2-like dopamine receptors in the human brain using an anatomic standardization technique and [<sup>11</sup>C]FLB 457. *Neuroimage*. Dec;10(6):666-74.
- Palacios JM, Camps M, Cortes R, Probst A (1988) Mapping dopamine receptors in the human brain. *J Neural Transm Suppl*. 27:227-35.
- Parent A, Hazrati LN (1995a) Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev*. Jan;20(1):91-127. Review.
- Parent A, Hazrati LN (1995b) Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Brain Res Rev*. Jan;20(1):128-54. Review.
- Parent A, Lavoie B, Smith Y, Bedard P (1990) The dopaminergic nigropallidal projection in primates: distinct cellular origin and relative sparing in MPTP-treated monkeys. *Adv Neurol*. 53:111-6.
- Parent A, Sato F, Wu Y, Gauthier J, Levesque M, Parent M (2000) Organization of the basal ganglia: the importance of axonal collateralization. *Trends Neurosci*. Oct;23(10 Suppl):S20-7. Review.
- Piccini P, Weeks RA, Brooks DJ (1997) Alterations in opioid receptor binding in Parkinson's disease patients with levodopa-induced dyskinesias. *Ann Neurol*. Nov; 42(5): 720-6
- Pisa M (1988) Regional specialization of motor functions in the rat striatum: implications for the treatment of parkinsonism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*.;12(2-3):217-24. Review.

- Prensa L, Parent A (2001) The nigrostriatal pathway in the rat: A single-axon study of the relationship between dorsal and ventral tier nigral neurons and the striosome/matrix striatal compartments. *J Neurosci*. Sep 15;21(18):7247-60.
- Prensa L, Cossette M, Parent A (2000) Dopaminergic innervation of human basal ganglia. *J Chem Neuroanat*. Dec;20(3-4):207-13.
- Qin Z-H, Zhou L-W, Zhang S-P, Wang Y and Weiss B (1995) D2 dopamine receptor antisense oligodeoxynucleotide inhibits the synthesis of a functional pool of D2 dopamine receptor. *Mol Pharmacol* 48: 730-737
- Rajakumar N, Laurier L, Niznik HB and Stoessl AJ (1997) Effects of intrastriatal infusion of D2 receptor antisense oligonucleotide on apomorphine-induced behaviors in the rat. *Synapse* 26(3):199-208
- Rascol O, Brooks DJ, Korczyn AD, De Deyn PP, Clarke CE, Lang AE (2000) A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. 056 Study Group. *N Engl J Med*. May 18;342(20):1484-91.
- Richfield EK, Young AB, Penney JB (1987) Comparative distribution of dopamine D-1 and D-2 receptors in the basal ganglia of turtles, pigeons, rats, cats, monkeys. *J Comp Neurol*. Aug 15;262(3):446-63.
- Roth GS et Joseph JA (1994) Cellular and molecular mechanisms of impaired dopaminergic function during aging. *Ann N Y Acad Sci*. May 31; 719; 129-135
- Schwartz JC, Levesque D, Martres MP, Sokoloff P (1993) Dopamine D3 receptor: basic and clinical aspects. *Clin Neuropharmacol*. Aug;16(4):295-314. Review.
- Sealfon SC, Olanow CW (2000) Dopamine receptors: from structure to behavior. *Trends Neurosci*. Oct;23(10 Suppl):S34-40. Review.
- Sibley DR (1999) New insights into dopaminergic receptor function using antisense and genetically altered animals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 39:313-41. Review.
- Surmeier DJ, Song WJ, Yan Z (1996) Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *J Neurosci*. Oct 15;16(20):6579-91.
- Stein CA. How to design an antisense oligodeoxynucleotide experiment: a consensus approach. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. 1998 Apr;8(2):129-32. Review.
- Steiner H, Gerfen CR (1999) Enkephalin regulates acute D2 dopamine receptor antagonist-induced immediate-early gene expression in striatal neurons. *Neuroscience*. 88(3):795-810.
- Steiner H, Gerfen CR (1998) Role of dynorphin and enkephalin in the regulation of striatal output pathways and behavior. *Exp Brain Res*. Nov;123(1-2):60-76. Review.

- Szabo J, Cowan WM (1984) A stereotaxic atlas of the brain of the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *J Comp Neurol.* Jan 10;222(2):265-300.
- Tremblay M, Rouillard C, Levesque D (1999) Dopamine D3 receptor antisense administration reduces basal c-fos and NGFI-B mRNA levels in the rat forebrain. *Synapse.* Apr;32(1):51-7.
- Vallone D, Picetti R, Borrelli E (2000) Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev.* Jan;24(1):125-32. Review.
- Weiss B, Zhang SP, Zhou LW (1997a) Antisense strategies in dopamine receptor pharmacology. *Life Sci.* 60(7):433-55. Review.
- Weiss B, Davidkova G, Zhou L-W, Zhang S-P and Morabito M (1997b) Expression of a D2 dopamine receptor antisense RNA in brain inhibits D2-mediated behaviors. *Neurochem Int.* 31(4): 571-580.
- Weiss B, Zhou LW, Zhang SP and Qin ZH (1993) Antisense oligodeoxynucleotide inhibits D2 dopamine receptor-mediated behavior and D2 messenger RNA. *Neuroscience* 55(3): 607-12.
- Wise SP, Murray EA, Gerfen CR (1996) The frontal cortex-basal ganglia system in primates. *Crit. Rev. Neurobiol.*;10(3-4):317-56. Review.
- Wu Y, Richard S, Parent A (2000) The organization of the striatal output system: a single-cell juxtacellular labeling study in the rat. *Neurosci. Res.* Sep;38(1):49-62.
- Zhang M and Creese I (1993) Antisense oligonucleotides reduces brain dopamine D2 receptors: behavioral correlates. *Neurosci, Lett* 161: 223-226.
- Zhang SP, Zhou LW, Morabito M, Lin RC, Weiss B (1996) Uptake and distribution of fluorescein-labeled D2 dopamine receptor antisense oligodeoxynucleotide in mouse brain. *J Mol. Neurosci.* Spring;7(1):13-28.
- Zhou LW, Zhang SP and Weiss B (1996) Intra-striatal administration of an oligodeoxynucleotide antisense to the D2 dopamine receptor mRNA inhibits D2 receptor-mediated behavior and D2 dopamine receptors in normal mice and in mice lesioned with 6-hydroxydopamine. *Neurochem. Int.* 29(6):583-95.