



**EXPLORATION DES ORIGINES DES ANOMALIES DE  
L'ÉLECTRORÉTINOGRAMME CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE  
MALADIES PSYCHIATRIQUES  
Des biomarqueurs potentiels des maladies du cerveau**

**Thèse**

**Joëlle Lavoie**

**Doctorat en neurobiologie**  
*Philosophiæ doctor (Ph.D.)*

Québec, Canada

© Joëlle Lavoie, 2014



# RÉSUMÉ

L'un des principaux obstacles en psychiatrie est qu'il est difficile d'avoir accès directement au cerveau pour l'étudier et mieux comprendre la pathobiologie des maladies mentales. Il importe donc de développer des nouvelles approches pour investiguer indirectement les fonctions cérébrales. Puisque la rétine fait partie du système nerveux central, il a été suggéré que les fonctions rétinienne mesurées par l'électrorétinographie (ERG) pourraient refléter les désordres neurochimiques retrouvés dans les troubles mentaux. En fait, plusieurs études ont démontré la présence d'anomalies de l'ERG qui pourraient servir de biomarqueurs chez des personnes atteintes ou à risque de troubles psychiatriques, dont le trouble affectif saisonnier (TAS) et la schizophrénie. Cependant, l'origine de ces anomalies demeure inconnue et l'objectif principal de cette thèse est d'explorer les origines moléculaires potentielles de ces déficits, et ce, grâce à des modèles animaux de maladies psychiatriques ou à l'utilisation d'un agent pharmacologique.

De par leur implication reconnue dans les maladies psychiatriques, les molécules ciblées dans cette thèse sont la mélatonine, la dopamine centrale, la sérotonine centrale et la glycoène synthase kinase-3 (GSK3). La première étude de cette thèse démontre qu'un débalancement dans la sécrétion de mélatonine serait partiellement à l'origine des anomalies de l'ERG observées dans le TAS. Or, la deuxième étude de cette thèse vient compléter la précédente et démontre qu'il est plus probable que les anomalies de l'ERG retrouvées dans le TAS découlent d'une dysfonction de la neurotransmission sérotoninergique centrale et dopaminergique centrale qu'une altération dans la biodisponibilité des récepteurs dopaminergiques D1R et D2R. Ces études permettent de proposer un modèle multifactoriel qui expliquerait l'origine des anomalies de l'ERG observées dans le TAS. Quant à la troisième étude de cette thèse, elle démontre que la surexpression de GSK3, qui est un facteur de risque pour la schizophrénie et le trouble bipolaire, provoque la même anomalie de l'ERG que celle qui est observée chez les enfants à haut risque de développer l'une de ces maladies. Enfin, la quatrième étude démontre que GSK3 joue un rôle primordial dans la régulation de l'horloge biologique. En somme, cette thèse démontre que l'ERG s'avère un outil prometteur pour la recherche en psychiatrie.



# ABSTRACT

One of the major obstacles in psychiatry is the difficult access to the functioning brain to better understand the biological underpinning of brain disorders. There is a need to develop new approaches to study the neurological functions indirectly. Since the retina is part of the central nervous system, it had been suggested that retinal functions, as measured with the electroretinogram (ERG), may reflect the central dysfunctions reported in psychiatric disorders. In fact, several ERG anomalies, which may serve as biomarkers, have been observed in people with or at risk of psychiatric disorders, such as seasonal affective disorder (SAD) and schizophrenia. However, the origins of these ERG anomalies remain elusive and the goal of this thesis is to explore the potential molecular underpinning of these ERG deficits with animal models of psychiatric disorders or the use of a pharmacological agent.

Because of their well-described involvement in psychiatric disorders, the targeted molecules of the experiments presented in this thesis are melatonin, central dopamine, central serotonin and glycogen synthase kinase-3 (GSK3). The first study demonstrates that a dysfunction in melatonin secretion may partially be involved in the ERG anomalies observed in people with SAD. The second study is a complement of the first one and reports that impairments in central serotonin and central dopamine neurotransmission are more likely to be involved in the ERG anomalies observed in patients with SAD than changes in the retinal bioavailability of dopamine receptors D1R and D2R. A multifactorial model of the ERG anomalies in people with SAD has been proposed according to the findings of these two previous studies. Moreover, the third study demonstrates that GSK3 overexpression, which is a risk factor for schizophrenia and bipolar disorder, replicates the ERG anomaly reported in offspring at high genetic risk for these disorders. Finally, the fourth study demonstrates that GSK3 plays an important role in regulating the biological clock. Overall, this thesis suggests that ERG measurements represent a useful tool in psychiatric research.



# TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	iii
ABSTRACT .....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES FIGURES .....	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xix
REMERCIEMENTS .....	xxi
AVANT-PROPOS.....	xxiii
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Biomarqueurs et facteurs de risque des maladies psychiatriques .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. La psychiatrie et ses défis.....	1
1.1.2. Les biomarqueurs en psychiatrie.....	3
Qu'est-ce qu'un biomarqueur?.....	3
La problématique des biomarqueurs.....	4
Exemples d'approches pour développer des biomarqueurs psychiatriques .....	6
1.1.3. La neurobiologie des monoamines.....	8
La sérotonine .....	9
<i>Exemple de modèle animal : la souris Tph2-KI</i> .....	11
La dopamine .....	11
<i>Exemples de modèles animaux de dysfonction dopaminergique</i> .....	13
1.1.4. La voie de signalisation Akt/GSK3 .....	14
Exemples de modèles animaux pour GSK3 .....	17
1.1.5. La neurobiologie des maladies psychiatriques .....	17
Le trouble affectif saisonnier .....	18
<i>Caractéristiques et critères diagnostiques du trouble affectif saisonnier</i> .....	18
<i>Les hypothèses de l'étiologie du TAS</i> .....	18
La schizophrénie.....	21
<i>Caractéristiques cliniques de la schizophrénie</i> .....	21
<i>Facteurs de risque génétiques liés à la schizophrénie</i> .....	22
<i>L'implication des neurotransmetteurs</i> .....	24
<i>Les facteurs environnementaux</i> .....	25
Le trouble bipolaire .....	26
<i>Caractéristiques cliniques du trouble bipolaire</i> .....	26
<i>Neurobiologie et cibles thérapeutiques du trouble bipolaire</i> .....	26
<b>1.2. La rétine comme partie du système nerveux central .....</b>	<b>28</b>
1.2.1. La physiologie de la rétine.....	28
Les photorécepteurs .....	30
<i>La phototransduction</i> .....	32
Les cellules bipolaires.....	35
Les cellules ganglionnaires.....	36
Les neurotransmetteurs de la rétine .....	37
<i>La dopamine</i> .....	37

<i>La sérotonine</i> .....	38
De la rétine au cortex visuel.....	38
1.2.2. La voie « non visuelle » de la rétine et la régulation des rythmes circadiens .....	40
L'horloge biologique endogène.....	40
<i>Études comportementales circadiennes chez l'animal</i> .....	41
La voie rétino-hypothalamique .....	42
La mélatonine .....	43
<b>1.3. Mesure des fonctions rétinienne par l'électrorétinogramme</b> .....	44
1.3.1. L'électrorétinogramme (ERG).....	45
L'enregistrement de l'ERG.....	45
Les paramètres de l'ERG.....	47
1.3.2. Anomalies de l'ERG chez les patients atteints de maladies psychiatriques .....	49
Le trouble affectif saisonnier .....	49
La schizophrénie et le trouble bipolaire.....	51
Les troubles du spectre autistique .....	53
La dépendance aux drogues.....	54
Considérations méthodologiques.....	56
Résumé des observations et conclusion.....	58
<b>1.4. Objectifs et hypothèses de la recherche</b> .....	60
1.4.1. Objectif général .....	60
1.4.2. Étude de l'impact de la prise de mélatonine orale sur l'ERG.....	61
1.4.3. Étude de l'implication de la sérotonine et de la dopamine centrale sur l'ERG.....	62
1.4.4. Étude de l'implication de GSK3 sur l'ERG.....	63
1.4.5. Étude de l'implication de GSK3 dans l'horloge biologique.....	64
<b>CHAPITRE 2 : NEGATIVE IMPACT OF MELATONIN INGESTION ON THE PHOTOPIC ELECTRORETINOGRAM OF DOGS</b> .....	67
<b>CHAPITRE 3 : THE ELECTRORETINOGRAM AS A BIOMARKER OF CENTRAL DOPAMINE AND SEROTONIN: POTENTIAL RELEVANCE TO PSYCHIATRIC DISORDERS</b> .....	87
<b>CHAPITRE 4 : GLYCOGEN SYNTHASE KINASE-3 OVEREXPRESSION REPLICATES ELECTRORETINOGRAM ANOMALIES OF OFFSPRING AT HIGH GENETIC RISK FOR SCHIZOPHRENIA AND BIPOLAR DISORDER</b> .....	117
<b>CHAPITRE 5 : GLYCOGEN SYNTHASE KINASE-3<math>\beta</math> HAPLOINSUFFICIENCY LENGTHENS THE CIRCADIAN LOCOMOTOR ACTIVITY PERIOD IN MICE</b> .....	141
<b>CHAPITRE 6 : DISCUSSION GÉNÉRALE</b> .....	155
<b>6.1. Récapitulation des résultats</b> .....	155
6.1.1. Étude de l'impact de la prise de mélatonine orale sur l'ERG.....	156
6.1.2. Étude de l'implication de la sérotonine et de la dopamine centrale sur l'ERG.....	163
Implication de la sérotonine centrale sur l'ERG.....	163
Implication de la dopamine centrale sur l'ERG.....	167
Implication des récepteurs dopaminergiques D1R et D2R sur l'ERG .....	172

Avantages et limites de cette étude .....	175
Le modèle multifactoriel du TAS .....	176
6.1.3. Étude de l'implication de GSK3 sur l'ERG.....	177
6.1.4. Étude de l'implication de GSK3 dans l'horloge biologique .....	182
<b>6.2. Applications et voies futures</b> .....	<b>185</b>
6.2.1. La mélatonine exogène comme régulateur de l'horloge biologique .....	185
6.2.2. Les anomalies de l'ERG comme biomarqueurs des maladies psychiatriques .	186
6.2.3. GSK3 $\beta$ comme cible thérapeutique des troubles de l'horloge biologique .....	187
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>189</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>191</b>



## LISTE DES TABLEAUX

**Table 1.1.** Résumé des anomalies de l'ERG observées chez les patients atteints de maladies psychiatriques.....59

**Table 2.1.** Individual results of the dogs in photopic condition. Dogs 1 to 3 are females and dogs 4 to 7 are males. The mean result for all parameters before (control) and after melatonin ingestion as well as their difference are presented with the standard deviation (SD).....81

**Table 2.2.** Individual results of the dogs for the photopic flicker ERG. Dogs 1 to 3 are females and dogs 4 to 7 are males. The mean amplitude at every frequency before (control) and after melatonin ingestion as well as their difference are presented with the standard deviation (SD).....82

**Table 2.3.** Individual results of the dogs in scotopic condition. Dogs 1 to 3 are females and dogs 4 to 7 are males. The mean result for all parameters before (control) and after melatonin ingestion as well as their difference are presented with the standard deviation (SD).....83



## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.1.</b> Stades potentiels de l'utilisation des biomarqueurs en psychiatrie.....	4
<b>Figure 1.2.</b> Représentation de la synthèse de sérotonine .....	9
<b>Figure 1.3.</b> Représentation de la synthèse de dopamine .....	12
<b>Figure 1.4.</b> Résumé de la voie de signalisation Akt/GSK3 .....	16
<b>Figure 1.5.</b> Représentation des différentes couches de la rétine ainsi que des types de cellules rétinienne.....	30
<b>Figure 1.6.</b> Représentation de l'effet des changements des niveaux de GMPc dans les bâtonnets. 33	
<b>Figure 1.7.</b> Détails de la phototransduction dans les bâtonnets.....	34
<b>Figure 1.8.</b> Représentation des projections centrales des cellules ganglionnaires de la rétine.....	39
<b>Figure 1.9.</b> Schématisation de la boucle de rétroaction négative qui régule l'horloge biologique dans chacune des cellules de l'organisme .....	41
<b>Figure 1.10.</b> Schéma résumant les cibles influencées par les ipRGC suite à la stimulation lumineuse jusqu'à la sécrétion de la mélatonine par la glande pinéale .....	43
<b>Figure 1.11.</b> Montage expérimental pour l'enregistrement de l'ERG chez la souris. Pour le besoin de la photo, le Ganzfeld a été reculé, mais il est placé presque au dessus de l'animal lors d'un enregistrement réel .....	46
<b>Figure 1.12.</b> Exemple d'un tracé d'ERG de souris en condition photopique (A) et scotopique (B) ainsi que la façon dont les principaux paramètres sont mesurés .....	47
<b>Figure 1.13.</b> Représentation d'un tracé d'ERG scotopique chez la souris à chacune des intensités lumineuses utilisées pour générer la courbe intensité/réponse (A). Courbe intensité/réponse de l'onde b avec la représentation des paramètres du Vmax et du logK (B) .....	48
<b>Figure 2.1.</b> Photopic ERG of dogs before and after melatonin ingestion. Example of the ERG waveform of a male dog before and after melatonin ingestion. Mean (n = 7) luminance-response functions of absolute a-wave and b-wave showing the photopic ERG of dogs during control condition and following melatonin ingestion. Error bars represent the standard deviation of the mean .....	84
<b>Figure 2.2.</b> Example of the flicker ERG waveform of a male dog before and after melatonin ingestion at the frequencies of 6 Hz, 12 Hz, 20 Hz and 30 Hz. Mean (n = 7) amplitudes at each frequency in the control condition and following melatonin ingestion. Error bars represent the standard deviation of the mean.....	85

**Figure 2.3.** Scotopic ERG of dogs before and after melatonin ingestion. Example of the ERG waveform of a male dog before and after melatonin ingestion. Mean (n = 7) luminance-response functions of absolute a-wave and b-wave showing the scotopic ERG of dogs during control condition and following melatonin ingestion. Error bars represent the standard deviation of the mean..... 86

**Figure 3.1.** Example of mice electroretinogram waveform obtained at Vmax in photopic (A) and scotopic (B) conditions. The photopic Vmax was achieved at 722 cd·s/m<sup>2</sup> and scotopic Vmax at 0.98 cd·s/m<sup>2</sup>. The a-wave amplitude is measured from the baseline to trough of the a-wave, and the b-wave is measured from trough of the a-wave to peak of the b-wave. The arrows indicate flash onset. OP: oscillatory potential..... 106

**Figure 3.2.** Photopic luminance-response function (LRF) between tryptophan hydroxylase 2 knockin (Tph2-KI) (n = 9) and wildtype (WT) (n = 8) mice for the a-wave amplitude (A), b-wave amplitude (B), a-wave implicit time (C) and b-wave implicit time (D). Scotopic luminance-response function between Tph2-KI (n = 8) and WT (n = 8) mice for the a-wave amplitude (E), b-wave amplitude (F), a-wave implicit time (G) and b-wave implicit time (H). Error bars represent the standard deviation (SD). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; N.S.: not significant..... 107

**Figure 3.3.** Examples of raw electroretinogram (ERG) traces and filtered oscillatory potential (OPs) in wildtype (WT) and Tph2-KI mice obtained at Vmax. The photopic Vmax was achieved at 722 cd·s/m<sup>2</sup> and scotopic Vmax at 0.98 cd·s/m<sup>2</sup>. (A) Photopic ERG and (B) photopic OPs. (C) Scotopic ERG and (D) scotopic OPs. A longer photopic b-wave implicit time was observed in Tph2-KI mice. None of the other ERG parameters or the OPs were changed in Tph2-KI mice compared to WT mice..... 108

**Figure 3.4.** Serotonin tissue content in the retina (A) and in the striatum (B) of Tph2-KI and WT mice. Dopamine tissue content in the retina (C) and dialysate dopamine from the striatum (D) of DAT-KO and WT mice. Error bars represent the standard error of the mean (SEM). \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . Abbreviation as in figure 3.2..... 109

**Figure 3.5.** Photopic luminance-response function between dopamine transporter knockout (DAT-KO) (n = 12) and wildtype (WT) (n = 12) mice for the a-wave amplitude (A), b-wave amplitude (B), a-wave implicit time (C) and b-wave implicit time (D). Scotopic luminance-response function between DAT-KO (n = 12) and WT (n = 15) mice for the a-wave amplitude (E), b-wave amplitude (F), a-wave implicit time (G) and b-wave implicit time (H). Error bars represent the standard deviation (SD). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; N.S.: not significant..... 110

**Figure 3.6.** Examples of raw electroretinogram (ERG) traces and filtered oscillatory potential (OPs) in wildtype (WT) and DAT-KO mice obtained at Vmax. The photopic Vmax was achieved at 722 cd·s/m<sup>2</sup> and scotopic Vmax at 0.98 cd·s/m<sup>2</sup>. (A) Photopic ERG and (B) photopic OPs. (C) Scotopic ERG and (D) scotopic OPs. No significant change could be observed in the ERG parameters or in the OPs at Vmax intensities in DAT-KO mice ..... 111

**Figure 3.7.** Photopic luminance-response function (LRF) between dopamine D1 receptor knockout (D1R-KO) (n = 11) and wildtype (WT) (n = 12) mice for the a-wave amplitude (A), b-wave amplitude (B), a-wave implicit time (C) and b-wave implicit time (D). Scotopic luminance-response function between D1R-KO (n = 15) and WT (n = 17) mice for the a-wave amplitude (E), b-wave amplitude (F),

a-wave implicit time (G) and b-wave implicit time (H). Error bars represent the standard deviation (SD). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; N.S.: not significant.....112

**Figure 3.8.** Examples of raw electroretinogram (ERG) traces and filtered oscillatory potential (OPs) in wildtype (WT) and D1R-KO mice obtained at  $V_{max}$ . The photopic  $V_{max}$  was achieved at  $722 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  and scotopic  $V_{max}$  at  $0.98 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ . (A) Photopic ERG and (B) photopic OPs. (C) Scotopic ERG and (D) scotopic OPs. A decrease in b-wave amplitude can be observed in D1R-KO mice in photopic and scotopic condition. b-wave implicit time was longer in HO mice compared to WT in photopic condition. The sum of OPs was also decreased in photopic and scotopic condition .....113

**Figure 3.9.** Photopic luminance-response function (LRF) between dopamine D2 receptor knockout (D2R-KO) ( $n = 17$ ) and wildtype (WT) ( $n = 13$ ) mice for the a-wave amplitude (A), b-wave amplitude (B), a-wave implicit time (C) and b-wave implicit time (D). Scotopic luminance-response function between D2R-KO ( $n = 11$ ) and WT ( $n = 14$ ) mice for the a-wave amplitude (E), b-wave amplitude (F), a-wave implicit time (G) and b-wave implicit time (H). Error bars represent the standard deviation (SD). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; N.S.: not significant.....114

**Figure 3.10.** Examples of raw electroretinogram (ERG) traces and filtered oscillatory potential (OPs) in wildtype (WT) and D2R-KO mice obtained at  $V_{max}$ . The photopic  $V_{max}$  was achieved at  $722 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  and scotopic  $V_{max}$  at  $0.98 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ . (A) Photopic ERG and (B) photopic OPs. (C) Scotopic ERG and (D) scotopic OPs. No change in the ERG parameters were found to be significant in D2R-KO mice. The sum of OPs was significantly higher in D2R-KO mice compared to WT mice in photopic condition.....115

**Figure 4.1.** Example of mice ERG waveform observed at  $V_{max}$  in photopic (A) and scotopic (B) conditions. The photopic  $V_{max}$  was selected at  $2.86 \text{ log cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  and scotopic  $V_{max}$  at  $-0.0105 \text{ log cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ . The arrows indicate the way the parameters are measured.....133

**Figure 4.2.** Representative Western blot analysis performed with tissue extracts of wild-type (WT) mice and mice having increased glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3 $\beta$ ) expression (prpGSK3 $\beta$  mice) for an evaluation of GSK3 expression and densitometric analysis ( $n = 5$  per genotype) of the Western blot in the cortex (A and B), the striatum (C and D) and the retina (E and F). The partial proteolysis of endogenous GSK3 $\beta$  and GSK3 $\beta$ -his (asterisks) is confirmed. The alternatively spliced form of endogenous GSK3 $\beta$  is indicated with GSK3 $\beta^{alt}$ . GSK3 $\beta$ -his migrates between the endogenous GSK3 $\beta$  and GSK3 $\beta^{alt}$  forms. Error bars represent the SD. (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ) .....134

**Figure 4.3.** Photopic luminance-response function between mice having increased glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3 $\beta$ ) expression (prpGSK3 $\beta$ ;  $n = 13$ ) and wild-type mice (WT;  $n = 15$ ) for the a-wave amplitude (A), b-wave amplitude (B), a-wave implicit time (C) and b-wave implicit time (D). Scotopic luminance-response function between prpGSK3 $\beta$  ( $n = 13$ ) and WT ( $n = 15$ ) mice for the a-wave amplitude (E), b-wave amplitude (F), a-wave implicit time (G) and b-wave implicit time (H). Error bars represent the SD. (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ) .....135

**Figure 4.4.** (A) Distribution of the  $V_{max}$  amplitude in scotopic condition for wild-type (WT) mice and mice having increased glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3 $\beta$ ) expression (prpGSK3 $\beta$ ) mice. (B) Example of an electroretinogram trace at  $V_{max}$  for one WT mouse (black) and one prpGSK3 $\beta$  mouse

(gray) at scotopic Vmax. A decrease in b-wave amplitude and no change in the other ERG parameters in scotopic condition are observed. Error bars represent the SD. (\*\* $p < 0.001$ )..... 136

**Figure 4.5.** Photopic luminance-response function between mice having reduced glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3 $\beta$ ) expression (GSK3 $\beta^{+/-}$ ; n = 11) and wild-type mice (WT; n = 10) for the a-wave amplitude (A), b-wave amplitude (B), a-wave implicit time (C) and b-wave implicit time (D). Scotopic luminance-response function between GSK3 $\beta^{+/-}$  mice (n = 12) and WT (n = 12) mice for the a-wave amplitude (E), b-wave amplitude (F), a-wave implicit time (G) and b-wave implicit time (H). Error bars represent the SD. (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ )..... 137

**Figure 4.6.** (A) Distribution of the Vmax amplitude in photopic condition for wild-type (WT) and mice having reduced glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3 $\beta$ ) expression (GSK3 $\beta^{+/-}$ ). (B) Example of a photopic electroretinogram (ERG) trace at Vmax for one WT mouse (black) and one GSK3 $\beta^{+/-}$  mouse (gray). An increase in b-wave amplitude at Vmax is observed in GSK3 $\beta^{+/-}$  mice in photopic condition. (C) Distribution of the Vmax amplitude in scotopic condition for WT and GSK3 $\beta^{+/-}$  mice. (D) Example of a scotopic ERG trace at Vmax for one WT mouse (black) and one GSK3 $\beta^{+/-}$  mouse (gray). An increase in b-wave amplitude at Vmax in GSK3 $\beta^{+/-}$  mice is demonstrated in scotopic condition. Error bars represent the SD. (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ )..... 138

**Figure 4.7.** Photopic luminance-response function among glycogen synthase kinase-3 alpha (GSK3 $\alpha$ ) heterozygous (GSK3 $\alpha^{+/-}$ ; n = 9), homozygous (GSK3 $\alpha^{-/-}$ ; n = 9) and wild-type (WT; n = 8) mice for the a-wave amplitude (A), b-wave amplitude (B), a-wave implicit time (C) and b-wave implicit time (D). Scotopic luminance-response function between GSK3 $\alpha^{+/-}$  (n = 11), GSK3 $\alpha^{-/-}$  (n = 12) and WT (n = 12) mice for the a-wave amplitude (E), b-wave amplitude (F), a-wave implicit time (G) and b-wave implicit time (H). Error bars represent the SD. (# $p < 0.005$ ; ## $p < 0.01$ ; difference between WT and GSK3 $\alpha^{+/-}$  mice) (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; difference between WT and GSK3 $\alpha^{-/-}$  mice) ..... 139

**Figure 4.8.** (A) Distribution of the Vmax amplitude in photopic condition for wild-type (WT), GSK3 $\alpha$  heterozygous (GSK3 $\alpha^{+/-}$ ) and GSK3 $\alpha$  homozygous (GSK3 $\alpha^{-/-}$ ) mice. (B) Example of a photopic electroretinogram (ERG) trace at Vmax for one WT mouse (black), one GSK3 $\alpha^{+/-}$  mouse (grey) and one GSK3 $\alpha^{-/-}$  mouse (dotted line). An increase in a- and b-wave amplitude at Vmax is observed in GSK3 $\alpha^{-/-}$  mice in photopic condition. (C) Distribution of the Vmax amplitude in scotopic condition for WT, GSK3 $\alpha^{+/-}$  and GSK3 $\alpha^{-/-}$  mice. (D) Example of a scotopic ERG trace at Vmax for one WT mouse (black), one GSK3 $\alpha^{+/-}$  mouse (grey) and one GSK3 $\alpha^{-/-}$  mouse (dotted line). An increase in b-wave amplitude at Vmax is observed in GSK3 $\alpha^{-/-}$  mice in scotopic condition. Error bars represent the SD. (\*\* $p < 0.01$ ; N.S.: not significant) ..... 140

**Figure 5.1.** Representative wheel running behavior for WT and GSK3 $\beta^{+/-}$  mice. Example of a double-plotted actogram for a WT mouse (A) and a GSK3 $\beta^{+/-}$  mouse (B) showing running activity under LD and DD. The lights were turned on at 7:00 am (white bars) and turned off at 7:00 pm (gray bars). The activity profile was then transferred on a schematic representation over 24h for the WT mouse under LD (C) and DD (D) as well as for the GSK3 $\beta^{+/-}$  mouse under LD (E) and DD (F)..... 152

**Figure 5.2.** Mean level of locomotor activity between WT and GSK3 $\beta^{+/-}$  mice. Number of wheel revolutions per minute under LD and DD (A). Number of wheel revolutions per day under LD and DD

(B). Number of wheel revolutions under LD during the light phase (C) and the dark phase (D). Number of wheel revolutions under DD during the subjective light phase (E) and the subjective dark phase (F). The results are presented with the SEM. (\*:  $p < 0.05$ ) .....153

**Figure 6.1.** Résumé du modèle multifactoriel du TAS ainsi que des mécanismes potentiels qui pourraient être à l'origine des anomalies de l'ERG observées chez les personnes atteintes de ce trouble. Les flèches en pointillé représentent des hypothèses à vérifier .....177

**Figure 6.2.** Résumé des mécanismes physiologiques qui pourraient être à l'origine de l'augmentation de l'amplitude de l'onde b observée chez les souris  $GSK3\beta^{+/-}$  et  $GSK3\alpha$ -KO. En ce qui concerne l'hypothèse du glycogène, le modèle contraire peut s'appliquer aux souris  $prpGSK3\beta$  chez qui une augmentation de  $GSK3\beta$  neuronale provoque une diminution de l'amplitude de l'onde b de l'ERG des bâtonnets. ....180



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

5HIAA	Acide 5-hydroxyindoléacétique
5-HT	Sérotonine ou 5-hydroxytryptamine
5HTP	5-hydroxytryptophane
6-OHDA	6-hydroxytryptamine
AA-NAT	Arylalkylamine-N-acétyltransférase
AC	Adénylate cyclase
AMPA	Acide $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoazotepropionique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
ATV	Aire tegmentale ventrale
$\beta$ Arr2	$\beta$ -arrestine 2
BP	Trouble bipolaire
COMT	Catéchol-O-méthyltransférase
CRY	Cryptochrome
DAT	Transporteur de la dopamine
DISC1	Disrupted in Schizophrenia-1
DOPA	Dihydroxyphénylalanine
DOPAL	3,4- dihydroxyphénylacétaldéhyde
DSM	Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux
DTL	Dawson-Trick-Litzkov
EOG	Électrooculogramme
EPR	Épithélium pigmentaire rétinien
ERG	Électrorétinogramme ou électrorétinographie
GABA	Acide $\gamma$ -aminobutyrique
GAD	Glutamate décarboxylase
GAT	Transporteur du GABA
GCAP	Guanylate Cyclase Activating Proteins
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GSK3	Glycogène synthase kinase-3
HIOMT	Hydroxyindole-O-méthyltransférase
HO	Homozygote
HR	Enfant à haut risque génétique de développer la schizophrénie ou le trouble bipolaire
HVA	Acide homovanillique
ICD	Classification internationale des maladies
iPRGC	Cellule ganglionnaire intrinsèquement photosensible
K+	Potassium
KI	Knockin
KO	Knockout
MAO	Monoamine oxydase
MAP kinases	Mitogen-activated protein kinase
mGluR	Récepteur métabotropique du glutamate
Na+	Sodium

NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NRG1	Neuréguline-1
OP	Potentiel oscillatoire
PANSS	Positive and Negative Syndrome Scale
PER	Period
pERG	Pattern ERG
PI3K	Phosphoinositide 3-kinases
PKB	Protéine kinase B
PLC	Phospholipase C
NCS	Noyau suprachiasmatique
SER9	Sérine 9
SERT	Transporteur de la sérotonine
SZ	Schizophrénie
TAS	Trouble affectif saisonnier
TAS-S	Trouble affectif saisonnier subsyndromal
TDAH	Trouble du déficit de l'attention et de l'hyperactivité
Tph	Tryptophane hydroxylase
TSA	Trouble du spectre autistique
VMAT	Transporteur vésiculaire des monoamines
WT	Wildtype

# REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Marc Hébert et Martin Beaulieu qui ont été mes Maîtres Jedi tout au long de l'épopée de mes études graduées. Merci de votre confiance et de vos judicieux conseils, et de m'avoir donné l'opportunité de voyager pour élargir mon réseau de contacts et pour discuter de science avec un martini sous les palmiers.

Je veux aussi remercier mes collaborateurs et co-auteurs qui ont amené la pièce manquante au casse-tête, que ce soit par la réalisation d'une expérience ou pour avoir fourni un modèle animal.

Je ne peux passer sous silence l'aide de mes collègues de laboratoire et la bienveillance du personnel du Centre de recherche. Merci! Vous m'avez tous été d'un appui précieux pour réaliser mes projets et répondre à mes interrogations, mais une question reste toujours sans réponse... What does the double rainbow mean?

Je remercie les organismes qui ont octroyé des subventions et des bourses pour réaliser mes projets de recherche, nommément les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC); le Centre de recherche sur le cerveau, le comportement et la neuropsychiatrie (CRCN); les Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS); le Réseau de recherche en santé de la vision du FRQS; la Canadian Federation of University Women; l'Association des femmes d'affaires, professionnelles et de carrière de la grande région de Rimouski; l'Association for Research in Vision and Ophthalmology; le Centre de recherche de l'Institut universitaire en santé mentale de Québec; l'Institut des neurosciences, de la santé mentale et des toxicomanies des IRSC; l'Association des étudiantes et étudiants de Laval inscrits aux études supérieures et, enfin, l'Université Laval.

Je souhaite aussi dire un gros merci à tous mes amis en dehors de mon milieu de travail qui ensoleillent mes journées et qui savent comment me changer les idées... Miaou!

Enfin, toute ma gratitude va à ma mère qui a toujours cru en moi et qui a su me guider dans la réalisation de mes rêves. Merci infiniment!



# AVANT-PROPOS

Les travaux effectués dans le cadre de mon doctorat en neurobiologie ont été effectués au Centre de recherche de l'Institut universitaire en santé mentale de Québec (CRIUSMQ). La réalisation de mes projets de recherche a été rendue possible grâce à des subventions des Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) et des Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS). De plus, j'ai été récipiendaire de bourses de formation au doctorat du Centre de recherche sur le cerveau, le comportement et la neuropsychiatrie (CRCN) et du FRQS.

La présente thèse est écrite sous forme d'insertion d'articles. Les chapitres 2 à 5 regroupent des résultats présentés dans des articles scientifiques qui sont tous publiés ou sous-pressé. La contribution des auteurs pour chacun de ces articles va comme suit :

Chapitre 2 : *Negative Impact of Melatonin Ingestion on the Photopic Electroretinogram of Dogs* par **Joëlle Lavoie**, Serge G. Rosolen, Catherine Chalier et Marc Hébert.

- Les résultats électrorétinographiques présentés dans cette étude ont été récoltés par Serge G. Rosolen et Catherine Chalier. Mon rôle a été de créer la banque de données et de procéder à l'analyse statistique des résultats. Finalement, j'ai monté les figures et j'ai rédigé le manuscrit avec l'aide de mon directeur Marc Hébert et de mes co-auteurs.

Chapitre 3 : *The Electroretinogram as a Biomarker of Central Dopamine and Serotonin : Potential Relevance to Psychiatric Disorders* par **Joëlle Lavoie**, Placido Illiano, Tatyana D. Sotnikova, Raul R. Gainetdinov, Jean-Martin Beaulieu et Marc Hébert.

- Cette étude constitue le premier projet auquel j'ai pris part en débutant mes études graduées. Pour ce faire, j'ai élaboré le protocole d'électrorétinographie (ERG), peaufiné la technique d'ERG et effectué tous les enregistrements des ERGs sur les souris, ainsi que l'ensemble des analyses statistiques. Puisque nous n'avions pas la technologie nécessaire, les analyses biochimiques ont été effectuées dans le laboratoire de Raul R. Gainetdinov par Placido Illiano (HPLC) et Tatyana D. Sotnikova (microdialyse). Enfin, j'ai monté toutes les figures de la publication et j'ai rédigé l'article sous la supervision de mes directeurs Marc Hébert et Jean-Martin Beaulieu et avec l'aide de mes co-auteurs.

Chapitre 4 : *Glycogen Synthase Kinase-3 Overexpression Replicates Electroretinogram Anomalies of Offspring at High Genetic Risk for Schizophrenia and Bipolar Disorder* par **Joëlle Lavoie**, Marc Hébert et Jean-Martin Beaulieu.

- Pour cette étude, j'ai effectué tous les enregistrements des ERGs sur les souris, les expériences de biochimie (Western blot) ainsi que l'ensemble des analyses statistiques. J'ai aussi monté toutes les figures de l'article et j'ai rédigé le manuscrit qui a été révisé par mes directeurs Marc Hébert et Jean-Martin Beaulieu.

Chapitre 5 : *Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  Haploinsufficiency Lengthens the Circadian Locomotor Activity Period in Mice* par **Joëlle Lavoie**, Marc Hébert et Jean-Martin Beaulieu.

- Pour la réalisation de cette étude, j'ai mis en place le laboratoire de chronobiologie de la plateforme comportementale du Centre de recherche de l'Institut universitaire en santé mentale de Québec. Pour ce faire, je me suis familiarisée avec le logiciel Clocklab et le matériel Actimetric pour l'étude de l'activité locomotrice circadienne des souris. J'ai élaboré le protocole, fait les visites quotidiennes pour s'assurer du suivi de santé des animaux et du bon déroulement de l'expérience et j'ai effectué toutes les analyses statistiques. Enfin, j'ai monté les figures de la publication et j'ai rédigé le manuscrit en collaboration avec mes directeurs Marc Hébert et Jean-Martin Beaulieu.

Finalement, il importe de spécifier que la section 1.3.2. *Anomalies de l'ERG chez les patients atteints de maladies psychiatriques* retrouvée dans le chapitre 1 a été rédigée en me basant sur une revue de littérature publiée que j'ai écrite au cours de mon doctorat. (**Joëlle Lavoie**, Michel Maziade, Marc Hébert. *The brain through the retina: The flash electroretinogram as a tool to investigate psychiatric disorders*. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 48 (2014) 129-134).

Cette thèse est le fruit de plusieurs années de travail que j'ai eu beaucoup de plaisir à réaliser. En espérant que celle-ci reflète à sa juste valeur ma passion pour la recherche, je vous souhaite une bonne lecture! ☺

# CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE

## 1.1. Biomarqueurs et facteurs de risque des maladies psychiatriques

### 1.1.1. La psychiatrie et ses défis

Aussi appelée « médecine de l'âme », la psychiatrie est la spécialité médicale qui traite les maladies mentales. Avec une histoire riche, ponctuée de pratiques et de théories controversées, ce n'est que suite à la Révolution française à la fin du XVIII<sup>e</sup> siècle que le statut de « fou » fut remplacé par le statut de *malade*, ce qui a conféré à la psychiatrie son titre de discipline médicale ainsi que son nom au début du XIX<sup>e</sup> siècle [1]. Depuis, les connaissances sur les maladies mentales ont beaucoup évolué et l'incorporation des traitements pharmacologiques et psychothérapeutiques ont changé l'image de la psychiatrie et en ont fait une discipline plus *humaine*.

Afin de mieux définir les maladies mentales et de classifier celles-ci, certains outils ont été mis au point comme le *Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux* (DSM) de l'Association américaine de psychiatrie ainsi que la *Classification internationale des maladies* (ICD) de l'Organisation mondiale de la santé. Puisque l'expérience clinique représente la méthode utilisée pour définir une maladie mentale, ces outils de classification se basent sur une approche symptomatologique et sont constamment mis à jour grâce à l'évolution continue des connaissances sur les fondements théoriques des maladies psychiatriques par la recherche [2]. Dans la dernière version du DSM, soit le DSM-5 paru en mai 2013, les maladies mentales sont classées selon 22 catégories qui contiennent plusieurs sous-types permettant de préciser le diagnostic. La neurobiologie de certaines de ces maladies sera discutée plus en profondeur dans la section 1.1.5.

D'après Santé Canada [3], la majorité des Canadiens sont touchés, de près ou de loin, par la maladie mentale. De plus, 20 % de la population canadienne souffrira d'une maladie mentale au cours de sa vie. Il va sans dire que, depuis plusieurs décennies, le domaine des neurosciences est en pleine ébullition et, peu à peu, les nouvelles notions sur les maladies du cerveau deviennent cruciales pour une meilleure compréhension de ces troubles. Cependant, on ne peut cacher le fait

que la psychiatrie accuse un léger retard par rapport aux autres spécialités médicales [4]. L'un des problèmes actuels de la psychiatrie est que la médication utilisée n'est que palliative en plus de provoquer des effets secondaires indésirables qui perturbent le mode de vie des patients. De plus, les effets de certains médicaments peuvent être ressentis seulement après de nombreuses semaines et plusieurs patients sont résistants à certains traitements. Cela dit, la thérapie pharmacologique comporte souvent un cocktail de plusieurs médicaments qui doit être pris régulièrement afin d'en ressentir les effets positifs [5]. Finalement, il existe malheureusement encore à ce jour une forte stigmatisation des personnes atteintes de maladies mentales et cette mise au ban de la société n'a sans doute pas contribué à l'essor de la psychiatrie [6].

L'espoir de la recherche psychiatrique réside dans la prévention de l'apparition des maladies mentales ainsi que dans la découverte de nouvelles cibles moléculaires thérapeutiques servant à développer des agents pharmacologiques pour un traitement optimal [7]. Ce qui rend la recherche si délicate est le fait que les maladies psychiatriques sont le fruit d'une interaction complexe entre divers facteurs génétiques, biologiques et environnementaux [8, 9]. De ce fait, la pathophysiologie exacte des maladies mentales reste toujours inconnue. De plus, on ne peut passer sous silence que le cerveau est de loin l'organe le plus complexe du corps humain et qu'il demeure encore mystérieux sur de nombreux aspects. D'ailleurs, les récentes percées sur le sujet démontrent que plusieurs circuits neuronaux situés dans différentes aires cérébrales et maintes cascades de signalisation moléculaires seraient impliqués dans la pathobiologie des maladies psychiatriques [10, 11]. Enfin, puisqu'il est difficile d'avoir accès directement au cerveau humain pour l'étudier, les chercheurs sont confrontés à un obstacle de taille et l'un des défis actuels de la recherche en psychiatrie est de développer des nouvelles approches pour analyser les fonctions du cerveau indirectement.

Au cours des dernières années, la recherche médicale s'est rapidement transformée en une quête pour découvrir des indicateurs biologiques qui prédisent et raffinent le diagnostic des maladies. Certaines spécialités médicales, comme l'oncologie, utilisent déjà ces signatures biologiques pour prévenir la maladie, poser un diagnostic précoce ainsi que pour cibler des stratégies thérapeutiques [12]. L'un des problèmes en psychiatrie est qu'il existe une grande hétérogénéité entre les symptômes des patients et qu'aucun corrélat moléculaire robuste n'a encore été décrit comme caractéristique des maladies mentales. De plus, il peut souvent s'écouler plusieurs mois, voire même

des années, avant que le spécialiste soit en mesure de poser le bon diagnostic puisque plusieurs maladies psychiatriques partagent les mêmes signes cliniques et le diagnostic ne peut être confirmé avec aucune mesure moléculaire [5]. Il va de soi que l'incorporation de l'utilisation d'indicateurs physiologiques serait de mise dans le cadre de la pratique d'une spécialité basée sur des témoignages et des signes cliniques, comme la psychiatrie, et que cela pourrait grandement faciliter la stratification des patients, en plus d'appuyer les diagnostics et le choix de la thérapie. Ceci dit, un vif intérêt est porté à l'un des défis de la recherche moderne en psychiatrie, soit la découverte de biomarqueurs des maladies mentales.

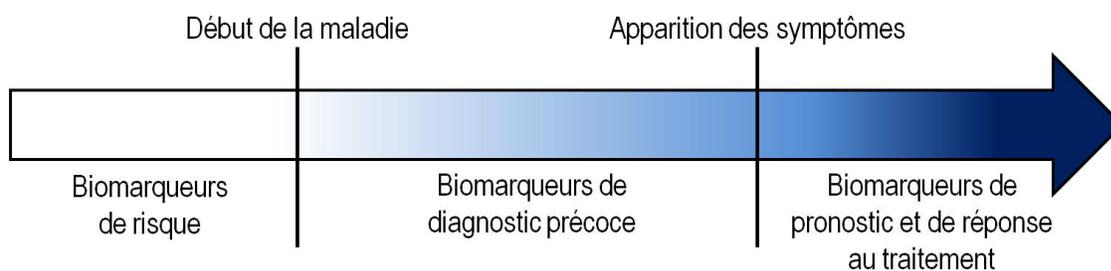
### **1.1.2. Les biomarqueurs en psychiatrie**

#### **Qu'est-ce qu'un biomarqueur?**

Un biomarqueur est une caractéristique biologique ou physiologique objectivement mesurable ayant le potentiel d'indiquer la présence d'un aspect pathologique ou non ou d'évaluer la réponse à une intervention thérapeutique quelconque [13]. Ces mesures biologiques se doivent d'être fiables, spécifiques, reproductibles et validées sur plusieurs populations afin d'être utilisées dans un contexte clinique. Bien que la notion de biomarqueur semble relativement moderne, les documents historiques relatent des expérimentations sur le sang des patients au milieu du XIX<sup>e</sup> siècle [14]. De plus, en 1899, Emil Kraepelin, aussi reconnu comme le fondateur de la psychiatrie scientifique moderne, a établi une échelle pour stratifier ses patients atteints de maladies psychiatriques selon la pression qu'ils exercent en écrivant [15]. De nos jours, la recherche sur les biomarqueurs psychiatriques a littéralement explosé vu le nombre d'articles scientifiques publiés sur le sujet au cours de la dernière décennie [5]. Cet essor est sans doute relié à l'utilisation d'outils sophistiqués ayant une sensibilité accrue ainsi qu'au développement des approches de modélisation informatique qui permettent des analyses plus poussées à partir de bases de données plus volumineuses.

Généralement, un biomarqueur peut être développé pour trois raisons [13]. Premièrement, il peut servir à établir un pronostic, c'est-à-dire à déterminer qui est à risque de développer une maladie. Deuxièmement, il peut faciliter et compléter le diagnostic de la maladie et aider à la

classification de celle-ci. Troisièmement, il peut aider à prédire la réponse à une thérapie spécifique et à ainsi mieux orienter le choix du traitement. Cela dit, un biomarqueur psychiatrique peut servir d'outil pour informer du type, ainsi que de l'évolution des maladies et de leurs interventions, en plus de représenter un critère physiologique sur lequel les spécialistes de la santé pourront se baser afin de créer une approche plus personnalisée pour élaborer des traitements psychiatriques. Les stades potentiels de l'utilisation d'un biomarqueur sont illustrés dans la figure 1.1. Il faut préciser qu'un biomarqueur peut être approprié pour l'une ou l'autre de ces raisons (par exemple, le diagnostic), sans toutefois pouvoir être utilisé pour les autres raisons (par exemple, l'orientation de la thérapie). Par contre, il existe de nombreux obstacles dans le développement d'un biomarqueur et plusieurs défis restent à surmonter pour que ceux-ci puissent être utilisés dans un contexte clinique. La preuve à cela demeure dans le fait que ceux-ci ne figurent toujours pas dans le DSM-5 et que cet ouvrage ne contient aucune information sur les origines moléculaires des maladies mentales.



**Figure 1.1.** Stades potentiels de l'utilisation des biomarqueurs (inspiré de la référence 14).

### **La problématique des biomarqueurs**

Afin d'être optimale, l'utilisation d'un biomarqueur dans un contexte clinique serait rapide, peu coûteuse et peu invasive. Le point de départ pour la découverte de biomarqueurs est la recherche d'endophénotypes chez les patients, les personnes à risque ainsi que chez les modèles animaux de maladies psychiatriques. Cependant, bien qu'il existe un intérêt marqué de la communauté scientifique et médicale pour la découverte de nouveaux biomarqueurs des maladies mentales, plusieurs contraintes doivent être résolues pour que ceux-ci soient incorporés dans une pratique clinique. D'une part, il importe de spécifier qu'un biomarqueur ne reflète pas nécessairement la cause d'une maladie. À titre d'exemple, des anomalies dans les mouvements oculaires peuvent permettre

de différencier les patients schizophrènes des sujets contrôles avec une précision de 98,3 %, mais ce phénotype représente une conséquence de la maladie et non son origine [16].

D'autre part, l'utilisation d'un seul biomarqueur ne peut pas toujours prédire la présence ou l'absence d'une condition pathologique, mais sa précision peut significativement augmenter lorsque des informations additionnelles, comme la présence d'autres biomarqueurs, sont prises en considération [13]. Par exemple, les études génomiques ont mené à la description de gènes de susceptibilité pour les troubles psychiatriques ainsi qu'à la découverte de gènes associés avec l'efficacité ou la résistance au traitement [17, 18]. Par contre, sachant que les maladies mentales sont le résultat d'une multitude de facteurs, il devient donc difficile de prédire une association entre la présence d'un gène de susceptibilité et le développement d'une maladie psychiatrique. En revanche, les signatures protéomiques et métabolomiques sont dynamiques et peuvent refléter les stades de la maladie en plus de donner de l'information sur les mécanismes des drogues psychiatriques [19, 20]. Somme toute, l'utilisation de l'une de ces techniques seule ne pourrait pas nécessairement servir de biomarqueur, mais une combinaison de ces approches moléculaires pourrait sans doute aider à décrire des signatures biologiques des maladies mentales.

L'utilisation des modèles animaux pour développer un biomarqueur sert principalement à caractériser les altérations comportementales et/ou moléculaires suite à un changement génétique ou à un traitement pharmacologique [15]. Les données sont souvent extrapolées chez l'humain, mais cette approche translationnelle doit tenir compte de plusieurs contraintes et aspects biologiques puisqu'il s'agit de deux systèmes différents avec des facteurs environnementaux, sociaux et génétiques divergents [21]. Malgré tout, les études sur les modèles animaux représentent un complément indispensable à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les maladies psychiatriques et un outil permettant de tester les biomarqueurs sur un système autre que l'humain.

Enfin, il faut considérer la question éthique de l'utilisation des biomarqueurs en psychiatrie [5]. Ceux-ci doivent être utilisés à bon escient, c'est-à-dire pour remplir l'une ou l'autre des fonctions pour lesquelles ils ont été développés, particulièrement en ce qui concerne les banques de données génétiques. Par exemple, la présence d'un facteur de risque chez un enfant ne doit pas

nécessairement engendrer une stigmatisation ou un changement du mode de vie. Cela dit, les signatures biologiques utilisées en psychiatrie, ainsi que dans tous les autres domaines médicaux, devraient apporter des bénéfices pour le patient et non mener à des situations de confusion, de discrimination ou de stigmatisation.

### **Exemples d'approches pour développer des biomarqueurs psychiatriques**

L'évolution des technologies scientifiques a permis d'investiguer plus en profondeur la pathophysiologie des maladies mentales, mais puisque le cerveau humain vivant reste toujours difficile d'accès, les outils utilisés pour développer des nouveaux biomarqueurs demeurent restreints. Il existe deux types de biomarqueurs, soit les biomarqueurs « humides » comme l'expression de certains gènes, de protéines et de métabolites mesurée à partir de fluides corporels tels que le sang et le liquide céphalo-rachidien, et les biomarqueurs « secs » comme l'imagerie cérébrale et l'électrophysiologie [15]. Cette section relate quelques exemples de ces types de biomarqueurs.

Tout d'abord, l'aspect génétique des maladies psychiatriques est étudié depuis longtemps et plusieurs gènes associés à la pathophysiologie des maladies mentales ont été décrits. En fait, de nombreuses altérations dans l'expression de gènes impliqués dans les fonctions et la myélinisation des oligodendrocytes, dans la physiologie des mitochondries, dans le métabolisme de l'énergie ainsi que dans les structures et la transmission synaptique ont été observées dans des études sur les cerveaux post-mortem des patients atteints de troubles psychiatriques majeurs [13, 18]. À titre d'exemple, une étude qui compara les différences de 250 groupes de gènes fonctionnels dans les tissus post-mortem de patients schizophrènes a rapporté une diminution de la régulation de certains de ces groupes de gènes fonctionnels en comparaison avec le groupe contrôle, et ce, particulièrement chez ceux qui codent pour des protéines présynaptiques [22]. Également, l'un des aspects majeurs de la recherche génétique sur les maladies mentales concerne l'étude des changements de la transcription d'ARN messagers dans les cellules sanguines des patients et l'extrapolation des résultats pour décrire ce qui se passe dans leur cerveau [18, 23]. Au fil des années, de nombreuses expérimentations ont démontré des altérations dans l'expression de plusieurs gènes associés aux maladies psychiatriques, mais il reste que ces résultats peuvent être altérés par divers facteurs, dont la variabilité inter-patients élevée causée par la grande diversité

généétique, l'impact des traitements pharmacologiques sur l'expression des gènes, les diagnostics différentiels, la comorbidité avec d'autres maladies, les différences de l'âge, du pH et de la consommation de drogues dans les cohortes de sujets, le nombre limité de participants à l'étude et, finalement, la diversité des méthodes et des types de plateformes utilisées pour l'expérimentation et l'analyse des résultats [18]. Somme toute, ces études génomiques démontrent clairement qu'une combinaison de plusieurs gènes est associée avec la pathophysiologie des maladies mentales et que l'expression de ces gènes est influencée par de nombreux facteurs.

Une autre approche moléculaire pour le développement de nouveaux biomarqueurs en psychiatrie concerne les études protéomiques dans les tissus des patients [24]. L'information recueillie dans ces expérimentations permet de caractériser des phénotypes reliés à l'expression de certaines protéines et à décrire les voies de signalisation affectées dans les maladies mentales. De plus, l'incorporation de la métabolomique dans ces analyses prend tout son sens puisque des perturbations dans le métabolisme de certaines molécules impliquées dans les maladies mentales, comme des neurotransmetteurs, des enzymes et des lipides, ont été décrites [25]. Cela dit, l'étude globale de l'expression des protéines et des signatures métaboliques dans les tissus périphériques, comme le sang et le liquide céphalo-rachidien, permettra de confirmer si les changements périphériques s'apparentent autant qu'on le suggère aux changements centraux.

Également, le développement des techniques d'imagerie cérébrale, comme l'imagerie par résonance magnétique et la tomographie par émission de positons, a révolutionné la caractérisation des mécanismes moléculaires et des changements physiques impliqués dans les maladies psychiatriques. Grâce à ces méthodes, des altérations neuroanatomiques et des changements histopathologiques ont été décrits chez les patients atteints de troubles mentaux [26, 27]. Aussi, de plus en plus d'équipes de recherche utilisent les techniques d'imagerie en combinaison avec des analyses de mutations génétiques pour décrire l'aspect phénotypique d'une variante génétique [28]. Cette approche « d'imagerie génétique » permet d'associer les mécanismes génétiques et moléculaires avec les aspects cliniques des maladies psychiatriques, ce qui représente un outil important pour valider certains effets des gènes de susceptibilité des troubles mentaux.

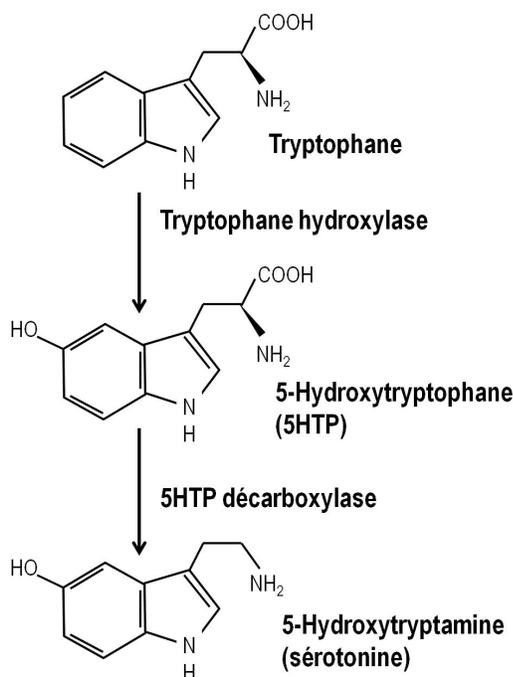
Enfin, des techniques électrophysiologiques peuvent être utilisées pour décrire des altérations dans la réponse électrique de certains systèmes. En effet, des études sur l'électroencéphalographie (EEG) ont démontré la présence de plusieurs anomalies des ondes cérébrales dans diverses maladies psychiatriques, dont la schizophrénie et le trouble bipolaire [29]. À titre d'exemple, il a été démontré que les patients atteints de schizophrénie présentent une diminution de l'inhibition des oscillations gamma dans le cortex préfrontal dorsolatéral [30] et que les patients atteints du trouble bipolaire ont une réduction de la synchronisation globale des oscillations alpha de l'EEG au repos avec les yeux fermés [31]. Dans un même ordre d'idées, des études ont aussi rapporté la présence de déficits dans les potentiels évoqués visuels et/ou auditifs dans certains troubles mentaux [32-34]. Par exemple, une diminution de l'amplitude de la composante P1 des potentiels évoqués visuels a été observée à maintes reprises chez des patients atteints de schizophrénie [35-37] de même que chez les personnes avec trouble bipolaire [32]. Enfin, de par son origine embryonnaire, la rétine fait partie du système nerveux central et la mesure des fonctions rétiniennes par l'électrorétinographie (ERG) chez différentes populations de patients atteints de troubles psychiatriques a révélé la présence de plusieurs anomalies caractéristiques qui pourraient éventuellement servir de biomarqueurs pour ces maladies mentales [38]. Le détail de ces anomalies de l'ERG est décrit dans la section 1.3.2.

### **1.1.3. La neurobiologie des monoamines**

Plusieurs études ont mis en évidence qu'une altération de la régulation de certains neurotransmetteurs serait impliquée dans les maladies psychiatriques [39, 40]. Parmi ces molécules, on retrouve les monoamines qui comprennent la dopamine, la sérotonine et la noradrénaline qui sont reconnues pour jouer un rôle dans le comportement, et plus précisément dans de nombreuses fonctions cognitives, émotives et motrices. De plus, il va sans dire que la plupart des agents pharmacologiques utilisés en psychiatrie exercent leur mode d'action en agissant sur l'une ou l'autre des étapes de la synthèse, du transport ou de la dégradation de ces monoamines. Dans cette section, l'emphase est mise principalement sur la neurobiologie de la sérotonine et de la dopamine puisque ces monoamines sont étudiées plus en profondeur dans cette thèse.

## La sérotonine

La sérotonine, aussi appelée 5-hydroxytryptamine (5-HT), est synthétisée à partir de l'acide aminé tryptophane qui est absorbé durant la digestion des aliments et qui traverse la barrière hématoencéphalique grâce à un transporteur de la membrane plasmique. Le tryptophane est transformé en 5-hydroxytryptophane (5HTP) par la tryptophane hydroxylase 1 (Tph1) ou 2 (Tph2) qui sont les enzymes limitantes de la synthèse de la sérotonine qu'on retrouve respectivement dans le système nerveux périphérique et central. Par la suite, la 5HTP décarboxylase convertit le 5HTP en sérotonine qui est stockée dans les vésicules synaptiques via le transporteur vésiculaire des monoamines (VMAT). La synthèse de la sérotonine est résumée dans la figure 1.2. Une fois libérée dans la fente synaptique, la sérotonine peut être captée par les récepteurs sérotoninergiques, être dégradée en acide 5-hydroxyindoléacétique (5HIAA) par la monoamine oxydase (MAO) ou être recapturée par le neurone présynaptique grâce au transporteur de la sérotonine (SERT) [41].



**Figure 1.2.** Représentation de la synthèse de sérotonine (inspiré de la référence 41).

Dans la glande pinéale, à la tombée de la nuit, il se produit la synthèse de l'hormone mélatonine, dont la sérotonine est le précurseur. En effet, l'enzyme photosensible arylalkylamine-N-acétyltransférase (AA-NAT) convertit la sérotonine en N-acétylsérotonine qui est par la suite transformée en mélatonine grâce à l'enzyme hydroxyindole-O-méthyltransférase (HIOMT) [42]. La

mélatonine est reconnue comme étant l'hormone centrale de régulation de l'horloge biologique et sa physiologie sera discutée plus en profondeur dans la section 1.2.2.

On retrouve la sérotonine dans plusieurs structures nerveuses dont la moelle épinière, le système nerveux périphérique ainsi que dans certains organes, mais seulement une petite fraction de la sérotonine synthétisée demeure présente dans le cerveau. Celle-ci est retrouvée principalement dans le tronc cérébral, et plus précisément dans les noyaux du raphé et dans le pont. Ces structures comportent certains noyaux neuronaux qui forment le point de départ de nombreuses projections sérotoninergiques vers le système limbique, le diencephale, le cervelet, le cortex et la moelle épinière [43].

De par sa localisation répandue dans plusieurs organes, la sérotonine joue un rôle dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que le cycle veille-sommeil, les comportements sexuels, la thermorégulation, l'alimentation, la mémoire, la douleur et la motricité, pour n'en nommer que quelques-unes [41]. En ce qui concerne la santé mentale, une implication de la sérotonine a été décrite dans la régulation de l'humeur, et plus particulièrement dans certaines formes de dépression et de comportements agressifs. Cela dit, le système sérotoninergique est ciblé par de nombreux agents pharmacologiques utilisés en psychiatrie, dont les antidépresseurs, les hallucinogènes et les antipsychotiques [39].

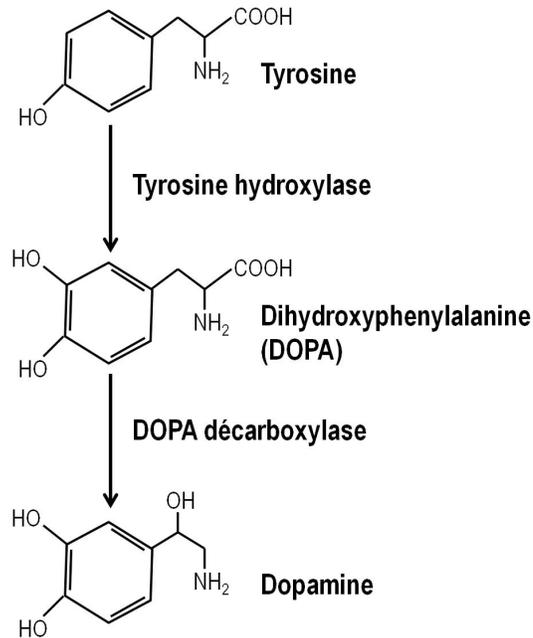
La sérotonine exerce son mode d'action via de nombreux récepteurs sérotoninergiques localisés dans diverses structures de l'organisme, dont le système nerveux central et périphérique, le système vasculaire, le système digestif et le système musculaire. Ceux-ci sont classés selon différentes familles et sous-types comme les récepteurs 5HT1 (5HT<sub>1A</sub>, 5HT<sub>1B</sub>, 5HT<sub>1D</sub>, 5HT<sub>1E</sub>, 5HT<sub>1F</sub>), 5HT2 (5HT<sub>2A</sub>, 5HT<sub>2B</sub>, 5HT<sub>2C</sub>), 5HT3, 5HT4, 5HT5 (5HT<sub>5A</sub>, 5HT<sub>5B</sub>), 5HT6 et 5HT7. Ces récepteurs sont tous couplés à des protéines G sauf le récepteur 5HT3 qui est un récepteur ionotrope. De plus, chacun de ces récepteurs a un potentiel excitateur à l'exception des récepteurs 5HT1 et 5HT5 qui ont un potentiel inhibiteur [44]. Les voies régulées par la sérotonine via ces récepteurs comprennent les voies de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), de la phospholipase C (PLC) et des « *mitogen-activated protein kinases* » (MAP kinases) [44-46].

### *Exemple de modèle animal : la souris Tph2-KI*

Tel que mentionné précédemment, des dysfonctions de la neurotransmission sérotoninergique seraient à l'origine de plusieurs troubles mentaux, dont la dépression majeure. Il y a quelques années de cela, un polymorphisme (R441H) de la Tph2 a été identifié chez une cohorte de patients souffrant de dépression majeure [47]. Suite à cette découverte, les souris Tph2-KI qui portent la mutation équivalente (R439H) ont été générées afin d'étudier les effets de ce polymorphisme *in vivo*. Il a été rapporté que les souris Tph2-KI homozygotes ont une diminution marquée d'environ 80 % du contenu tissulaire en sérotonine dans le striatum, le cortex frontal et l'hippocampe. Il a aussi été démontré que cette mutation génétique engendre des désordres comportementaux qui s'apparentent à la dépression en plus de provoquer un niveau d'agressivité accru [48]. En ce qui concerne les capacités cognitives, il a été observé que les souris Tph2-KI ont des déficits de l'apprentissage renversé en plus de présenter des comportements de persévération [49]. Ce modèle animal a été utilisé pour la réalisation de l'étude présentée dans le chapitre 3.

### **La dopamine**

La dopamine fait partie de la famille des catécholamines. Elle est synthétisée à partir de l'acide aminé tyrosine. La tyrosine hydroxylase catalyse la tyrosine pour qu'elle devienne de la dihydroxyphénylalanine (DOPA) qui est ensuite convertie en dopamine grâce à la DOPA décarboxylase. La synthèse de la dopamine est résumée dans la figure 1.3. Une fois synthétisée, la dopamine est stockée dans des vésicules via le VMAT. Lorsqu'elle est relâchée dans la fente synaptique par exocytose, la dopamine qui n'est pas captée par le neurone postsynaptique peut être soit dégradée en acide homovanillique (HVA) par la catéchol-O-méthyltransférase (COMT) ou en 3,4-dihydroxyphénylacétaldéhyde (DOPAL) par la MAO, ou soit être recapturée dans le neurone présynaptique par le transporteur de la dopamine (DAT) [41].



**Figure 1.3.** Représentation de la synthèse de dopamine (inspiré de la référence 41).

Bien qu'elle soit retrouvée dans plusieurs régions cérébrales, c'est dans l'aire tegmentale ventrale (ATV) et dans la substance noire que la dopamine est principalement synthétisée pour ensuite se projeter dans diverses structures via différentes voies. En effet, la voie nigrostriatale prend naissance dans la substance noire *pars compacta* et se projette vers les ganglions de la base. Les voies mésocorticale et mésolimbique partent de l'ATV et se projettent respectivement dans le cortex (temporal et frontal) et dans le système limbique (striatum ventral, amygdale, hippocampe, septum et noyau accumbens). Enfin, l'hypothalamus est le point de départ de la voie tubéroinfundibulaire qui se projette jusque dans l'hypophyse et influence la sécrétion de certaines hormones comme la prolactine [50].

Avec ses nombreuses afférences dans différentes structures cérébrales, il va de soi que la dopamine joue un rôle dans la régulation du comportement et des fonctions physiologiques, comme la coordination des mouvements, l'appétit, la motivation, la dépendance, le renforcement, le sommeil, l'attention, la mémoire, l'apprentissage, les fonctions cardiovasculaires, la régulation hormonale et le système immunitaire, pour n'en nommer que quelques-uns [41]. Dans le cas des maladies psychiatriques, des dysfonctionnements dans la neurotransmission dopaminergique ont déjà été

décrits comme étant impliqués dans la pathophysiologie de ces troubles [51], et il va sans dire que la plupart des agents pharmacologiques en psychiatrie agissent via les récepteurs de la dopamine [52].

La dopamine exerce son mode d'action via cinq types de récepteurs dopaminergiques qui sont des récepteurs couplés aux protéines G et qui sont divisés en deux familles selon l'homologie dans leur structure ainsi que leur effet sur l'activité de l'adénylate cyclase (AC) [52]. La famille des récepteurs D1 regroupe les récepteurs de type D1R et D5R et ceux-ci sont retrouvés principalement sur les neurones postsynaptiques. Les récepteurs de la famille D1 stimulent l'activité de l'AC et, par le fait même, la formation d'AMPc. Quant à la famille des récepteurs D2, elle comprend les récepteurs de type D2R courts (D2S), D2R longs (D2L), D3R et D4R qui inhibent l'AC et diminuent ainsi la production d'AMPc. Les récepteurs de type D2R et D3R sont retrouvés à la fois sur les neurones présynaptiques et postsynaptiques. Tous les types de récepteurs de la dopamine sont exprimés dans plusieurs structures cérébrales ainsi qu'en périphérie, mais leur distribution diffère d'un type de récepteur à l'autre. Les cascades moléculaires qui découlent de la signalisation dopaminergique par les récepteurs D1R et D2R régulent respectivement la voie des MAP kinases et d'Akt/GSK3. La description de la voie de signalisation Akt/GSK3 fait l'objet de la section 1.1.4.

#### *Exemples de modèles animaux de dysfonction dopaminergique*

Afin d'identifier individuellement les rôles précis des différents récepteurs dopaminergiques, des souris knockout (KO) pour chacun des cinq types de récepteurs (D1R-KO, D2R-KO, D3R-KO, D4R-KO et D5R-KO) ont été générées et leurs phénotypes comportementaux et moteurs ont été décrits [53]. Plus précisément, des symptômes de psychose ont pu être associés avec la voie de signalisation dopaminergique grâce, entre autres, aux souris D1R-KO et D2R-KO [52, 54, 55].

Comme autre exemple de modèle animal, les souris qui n'expriment pas le DAT (DAT-KO) sont couramment utilisées pour étudier les dysfonctions dopaminergiques retrouvées dans certaines maladies mentales, dont le trouble du déficit de l'attention et de l'hyperactivité (TDAH) [56]. En fait, chez ces souris, l'absence du DAT empêche la recapture de la dopamine dans les neurones présynaptiques, donc la dopamine s'accumule dans la fente synaptique et les niveaux extracellulaires de dopamine sont augmentés de cinq fois, et ce, de façon permanente [57, 58]. Au niveau

comportemental, il a été rapporté que les souris DAT-KO présentent des troubles de l'attention et d'hyperactivité [57], des désordres cognitifs [59, 60] ainsi que des déficits d'intégrations sensori-motrices [61]. Les souris DAT-KO, D1R-KO et D2R-KO ont été utilisées pour la réalisation de l'étude présentée dans le chapitre 3.

#### **1.1.4. La voie de signalisation Akt/GSK3**

Bien que les psychotropes soient utilisés dans un contexte clinique depuis les années 1950, les mécanismes moléculaires par lesquels ils exercent leur mode d'action demeurent encore mal compris. Or, il est admis que ces agents pharmacologiques agissent sur la neurotransmission monoaminergique, puisque, à titre d'exemple, les antipsychotiques typiques et atypiques sont des antagonistes des récepteurs D2R [62], tandis que la plupart des antidépresseurs bloquent les transporteurs de la sérotonine [63] et de la noradrénaline [64]. L'identification de ces cibles pharmacologiques primaires s'avère un premier pas dans la compréhension des mécanismes d'action des médicaments utilisés en psychiatrie, mais les cascades moléculaires qui découlent de la signalisation monoaminergique et qui modulent les fonctions cérébrales, comme l'humeur et la cognition, restent à être élucidées. Les études récentes démontrent l'implication des molécules Akt et glycogène synthase kinase-3 (GSK3) dans la modulation des comportements qui découlent de la signalisation dopaminergique et sérotoninergique ainsi que dans le mode d'action de certaines drogues utilisées en psychiatrie [65].

Chez les mammifères, le génome code pour trois protéines Akt (Akt1, Akt2 et Akt3) ainsi que pour deux isozymes de GSK3 (GSK3 $\alpha$  et GSK3 $\beta$ ). La protéine Akt, aussi appelée protéine kinase B (PKB), est une sérine/thréonine kinase activée par phosphorylation en réponse à la signalisation des phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks). Cette protéine est impliquée dans plusieurs processus cellulaires dont la transcription, le métabolisme du glucose, la prolifération et la migration des cellules [66]. Lorsqu'elle est activée, Akt régule plusieurs cibles moléculaires dont GSK3 $\alpha$  et GSK3 $\beta$  qui sont inhibées respectivement par phosphorylation à la sérine 21 et 9. Ces deux protéines qui sont constamment activées font aussi partie de la famille des sérine/thréonine kinases et partagent une grande homologie. Au départ, GSK3 était associée seulement avec la régulation de la synthèse du glycogène en réponse à l'insuline [67], mais de plus en plus d'études ont démontré son implication

dans la neurogenèse, la plasticité synaptique, l'expression génique et la régulation du comportement [68].

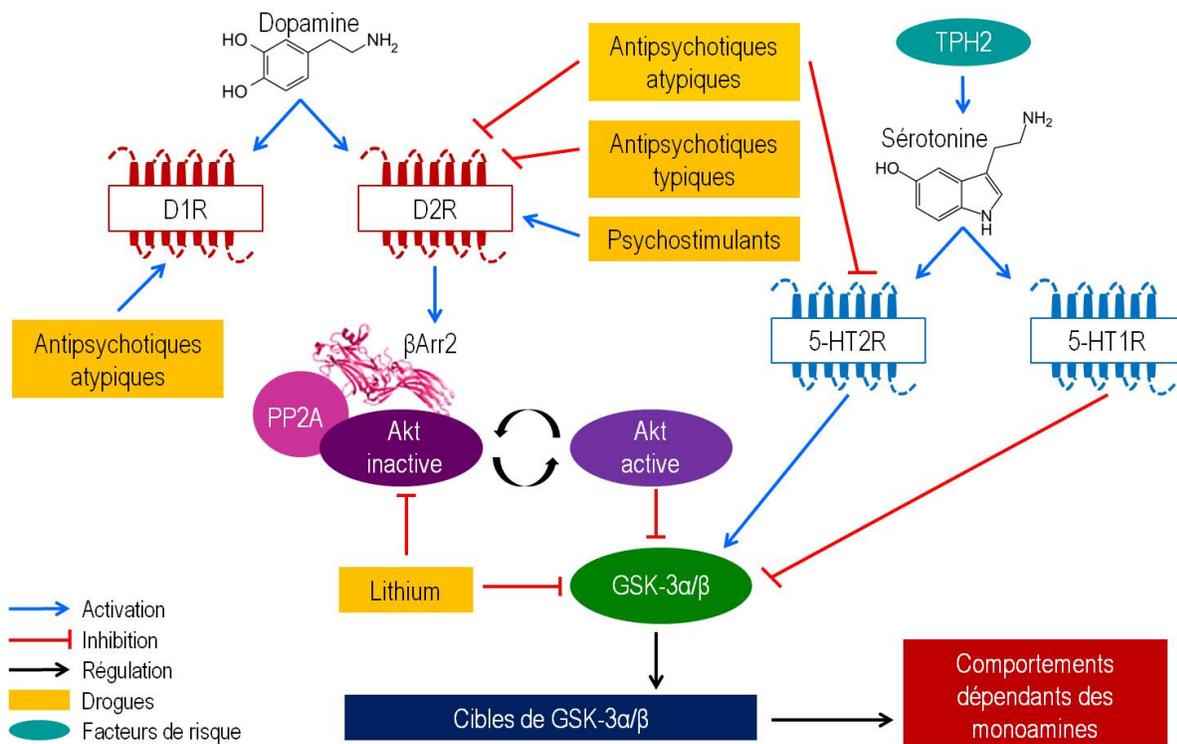
Grâce à des études sur des modèles animaux, il a été démontré que la voie Akt/GSK3 est régulée par l'action de la dopamine, mais plus précisément par le récepteur D2R. Par exemple, une diminution de la phosphorylation et de l'activité de Akt menant à l'activation de GSK3 a été observée dans le striatum des souris DAT-KO [69, 70]. De plus, une inhibition de l'activité de Akt a aussi été rapportée suite à l'administration d'amphétamine, de méthamphétamine ou d'apomorphine chez des souris wildtype (WT) [69, 71], tandis que l'effet opposé a été observé suite à une déplétion de la dopamine striatale [72]. Enfin, grâce aux souris D2R-KO, il a été démontré que le récepteur D2R est essentiel pour l'inhibition de Akt par les agents pharmacologiques comme les antipsychotiques [73].

Tel que mentionné précédemment, les récepteurs dopaminergiques de la famille D2 inhibent la production d'AMPC [52]. Cependant, chez les modèles animaux, il a été démontré que les niveaux de Akt et GSK3 dans le striatum ne sont pas affectés par des changements d'AMPC, ce qui suggère que ce second messager ne contrôle pas cette voie de signalisation [69]. Or, cette régulation serait plutôt modulée par la  $\beta$ -arrestine 2 ( $\beta$ Arr2) qui est une protéine d'échafaudage multifonctionnelle. En fait, il a été rapporté que la stimulation du récepteur D2R induit la formation d'un complexe protéique qui se compose de Akt, de la protéine phosphatase PP2A et de  $\beta$ Arr2. La formation de ce complexe mène à la désactivation de Akt par PP2A et à une stimulation subséquente de la signalisation par GSK3 [74]. À son tour, il a été démontré que GSK3 contrôle l'expression de plusieurs substrats dont la  $\beta$ -caténine et certaines composantes de l'horloge biologique interne, ce qui mène à la régulation de divers comportements qui sont associés à la signalisation monoaminergique [65].

En plus de sa signalisation qui découle du récepteur dopaminergique D2R, GSK3 $\beta$  est aussi régulée par la neurotransmission sérotoninergique. À titre d'exemple, il a été démontré que les souris Tph2-KI présentent une augmentation de l'activité de GSK3 dans le cortex frontal [48]. Aussi, des études ont rapporté que la phosphorylation de GSK3 $\beta$  est augmentée dans plusieurs structures cérébrales en réponse à différentes drogues, comme les inhibiteurs sélectifs de la recapture de sérotonine, les inhibiteurs de la monoamine oxydase et les antidépresseurs tricycliques [75, 76]. Plus précisément, deux récepteurs sérotoninergiques seraient impliqués dans ce mode d'action. En fait, il

a été observé que les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> et 5-HT<sub>2A</sub> régulent différemment l'activité de GSK3 $\beta$ , c'est-à-dire en l'inhibant ou en l'activant, respectivement [75]. Ces mécanismes seraient indépendants de l'activité de Akt [70, 75].

Finalement, en plus des antipsychotiques et des antidépresseurs qui agissent directement sur la transmission monoaminergique, les mécanismes d'action du stabilisateur d'humeur lithium passeraient par la voie Akt/GSK3. À vrai dire, dans les neurones, il a été démontré que le lithium peut inhiber directement les deux isozymes de GSK3 ou indirectement en activant Akt, ce qui mène à la dégradation du complexe  $\beta$ Arr2/Akt/PP2A [77]. De plus, la présence de  $\beta$ Arr2 semble essentielle à l'action du lithium puisque, chez les souris knockout pour  $\beta$ Arr2 ( $\beta$ Arr2-KO), il a été rapporté que la signalisation par Akt/GSK3 par ce stabilisateur d'humeur est altérée. De plus, il a été observé que, chez ces mêmes souris, les effets comportementaux causés par le lithium sont inhibés [74]. Somme toute, l'un des effets du lithium sur le comportement pourrait s'expliquer par la destruction du complexe  $\beta$ Arr2/Akt/PP2A qui résulte en une augmentation de l'activité de Akt et ainsi en une phosphorylation/inhibition accrue de GSK3. Les mécanismes de cette voie de signalisation sont représentés et résumés dans la figure 1.4.



**Figure 1.4.** Résumé de la voie de signalisation Akt/GSK3.

## Exemples de modèles animaux pour GSK3

Plusieurs modèles animaux ont été générés pour l'étude des deux isozymes de GSK3 dans la physiologie et dans le comportement. Par exemple, il a été démontré que les souris haploinsuffisantes pour GSK3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup>) présentent les mêmes effets comportementaux associés à l'administration de lithium [78]. De plus, il a été observé que ces souris présentent une diminution de l'anxiété, une réduction de l'immobilité dans le test de la nage forcée et de la suspension par la queue, une résilience au stress social ainsi qu'une réponse réduite aux amphétamines [69, 78-80]. Il importe de spécifier que l'inactivation complète du gène codant pour GSK3 $\beta$  est une mutation létale qui cause une dégénération rénale de l'embryon durant la gestation, donc seulement des souris adultes haploinsuffisantes pour GSK3 $\beta$  peuvent être étudiées [81]. De plus, il a été rapporté que les souris knockout pour GSK3 $\alpha$  présentent aussi des phénotypes comportementaux contraires à la dépression [79]. Enfin, une étude a démontré que la surexpression de GSK3 $\beta$  chez la souris (souris prpGSK3 $\beta$ ) renverse les effets comportementaux du lithium comme une diminution de l'immobilité dans le test de nage forcée et une réduction des comportements exploratoires [82]. Cette dernière étude supporte l'hypothèse que GSK3 est une cible moléculaire de ce stabilisateur d'humeur. Bref, les différents modèles animaux pour GSK3 confirment l'implication de cette protéine dans la régulation du comportement et une association potentielle dans l'étiologie des maladies mentales. Tous ces modèles animaux ont été utilisés pour la réalisation des travaux présentés dans le chapitre 4 et les souris GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> font l'objet de l'étude présentée dans le chapitre 5.

### 1.1.5. La neurobiologie des maladies psychiatriques

Bien que l'étiologie exacte des troubles psychiatriques ne soit pas encore connue, il est admis que des dysfonctions au niveau de certaines molécules sont impliquées dans la pathobiologie de ces maladies. Cette section traite plus spécifiquement de la neurobiologie de trois maladies qui sont d'intérêt pour cette thèse, c'est-à-dire le trouble affectif saisonnier, avec l'emphase sur l'implication des amines, ainsi que la schizophrénie et le trouble bipolaire, en lien avec les composantes de la voie Akt/GSK3.

## **Le trouble affectif saisonnier**

### *Caractéristiques et critères diagnostiques du trouble affectif saisonnier*

Le trouble affectif saisonnier (TAS) se caractérise par l'apparition d'une baisse d'énergie et de l'humeur à l'automne et à l'hiver suivie d'une rémission naturelle des symptômes au printemps et à l'été, et ce, selon une récurrence annuelle [83]. Bien que le TAS partage certaines caractéristiques de la dépression majeure telles que la léthargie et l'anhédonie, il peut être distingué par son caractère saisonnier ainsi que par la présence de symptômes atypiques comme l'hypermétrie, l'hyperphagie et une plus grande envie de consommer des hydrates de carbone résultant en un gain de poids [84]. Le traitement de choix pour contrer les symptômes dépressifs du TAS est la lumbinothérapie qui consiste à s'exposer quotidiennement à une lumière d'une intensité de 10 000 lux pour environ 30 minutes, et ce, préférablement le matin. Cette thérapie a un taux de succès similaire à certains antidépresseurs [85, 86].

Dans le DSM-5, on ne retrouve pas encore l'appellation « trouble affectif saisonnier », mais celui-ci peut être identifié comme un trouble de dépression majeure récurrent avec un caractère saisonnier. Les critères diagnostiques du TAS comprennent : i) une association entre l'apparition des symptômes dépressifs et le moment de l'année, ii) une rémission complète saisonnière entre les épisodes dépressifs, iii) la présence d'au moins deux épisodes dépressifs majeurs durant les deux dernières années et iv) aucune association entre des stress saisonniers annuels et les épisodes dépressifs [2].

### *Les hypothèses de l'étiologie du TAS*

La première hypothèse émise pour expliquer l'étiologie du TAS était que les personnes atteintes s'exposaient moins à la lumière lors de l'arrivée de la saison froide. Or, il a été démontré que les personnes atteintes du TAS ou du TAS subsyndromal (TAS-S) – un trouble caractérisé par des symptômes de dépression saisonnière sans pour autant atteindre une considération clinique – sont autant exposés à la lumière que les sujets sains en hiver [87-89], et ce, même si l'exposition lumineuse hivernale est 4 à 6 fois plus faible qu'en été [90]. Il a donc été proposé que les personnes

atteintes du TAS seraient plus sensibles au manque de lumière engendré par le raccourcissement de la photopériode à l'hiver [88, 91]. Ceci dit, bien que l'étiologie exacte du TAS demeure toujours inconnue, de nombreuses hypothèses concernant des dérèglements au niveau des hormones et des neurotransmetteurs ont été élaborées.

Tout d'abord, avec son implication indéniable dans les troubles de l'humeur, dont la dépression [92], la présence de dysfonctions de la neurotransmission sérotoninergique centrale demeure l'une des hypothèses les plus étudiées pour expliquer l'apparition des symptômes dépressifs dans le TAS. De plus, des études suggèrent qu'un changement dans l'expression de la sérotonine pourrait aussi expliquer certaines caractéristiques du TAS comme l'hyperphagie. En fait, il a été démontré que l'augmentation de la synthèse de la sérotonine suivant l'ingestion des aliments riches en hydrates de carbone pourrait justifier que les personnes atteintes du TAS tendent à favoriser ces aliments au détriment des protéines [93]. D'ailleurs, il a été observé que cette consommation d'hydrates de carbone tend à donner de l'énergie temporairement aux personnes atteintes du TAS, alors qu'elle provoque souvent de la somnolence chez les gens non atteints [94].

Les études pharmacologiques supportent aussi l'hypothèse de la présence d'un dysfonctionnement sérotoninergique dans le TAS. À titre d'exemple, il a été démontré que des antidépresseurs qui agissent sur la neurotransmission de la sérotonine comme la fluoxétine [85, 86], la sertaline [95], l'escitalopram [96] et la fenfluramine [97] sont efficaces pour contrer les symptômes dépressifs du TAS. Aussi, chez les femmes atteintes du trouble, il a été observé que l'administration intraveineuse de m-chlorophénylpiperazine, un agoniste des récepteurs de la sérotonine 5-HT<sub>2c</sub> provoque une diminution de la tristesse [98]. Dans le même ordre d'idées, des études portant sur la manipulation des niveaux de tryptophane, le précurseur de la synthèse de la sérotonine, ont rapporté que l'administration orale de tryptophane mène à un effet antidépresseur similaire à celui de la luminothérapie chez les personnes atteintes du TAS [99, 100], tandis qu'une déplétion de cet acide aminé peut provoquer une rechute plus rapide vers l'état dépressif [101-103].

Également, il a été démontré qu'il existe une association entre les changements de luminosité et le niveau de sérotonine dans le cerveau. En fait, il a été observé que, lors des journées ensoleillées, la production de sérotonine centrale est augmentée, alors qu'elle est diminuée lors des

jours plus sombres [104]. D'ailleurs, une étude chez le rat a rapporté la présence de dommages significatifs aux neurones sérotoninergiques suite à une privation de lumière d'une durée de six semaines [105]. De plus, une étude a démontré, chez des participants sains, la présence d'une corrélation négative entre le potentiel de liaison de la sérotonine à ses transporteurs dans le cerveau et le nombre moyen d'heures d'ensoleillement quotidien [106]. Tout compte fait, il semble que la diminution de la photopériode à l'arrivée de la saison froide pourrait provoquer une diminution de la neurotransmission sérotoninergique centrale et être à l'origine de l'apparition des symptômes dépressifs caractéristiques du TAS chez des individus vulnérables qui auraient un système sérotoninergique déficient. L'effet thérapeutique de la luminothérapie pourrait être le résultat d'une augmentation des niveaux de sérotonine dans le cerveau.

Aussi, de par le caractère cyclique du TAS, il a été suggéré qu'une perturbation des rythmes circadiens pourrait être à l'origine de ce trouble. En fait, la mélatonine, dont la sérotonine est le précurseur, est sécrétée selon un cycle circadien bien caractérisé, où la production est augmentée durant la nuit et diminuée durant le jour [107]. De plus, chez l'animal, il a été observé que la sécrétion de cette hormone a aussi un caractère saisonnier, où la période sécrétoire de mélatonine est plus longue en hiver qu'en été [108, 109]. Avec son effet hypnotique sur l'organisme [110], il a donc été suggéré qu'une sécrétion accrue de cette hormone en hiver pourrait favoriser l'apparition des symptômes dépressifs du TAS et que, sachant que la lumière supprime directement la production de la mélatonine [111], l'action thérapeutique de la luminothérapie pourrait être expliquée par l'inhibition de cette hormone par la lumière [112]. À vrai dire, il a été rapporté que la période de sécrétion de mélatonine est plus longue de 26 minutes en hiver qu'en été chez les personnes atteintes du TAS en comparaison avec les sujets contrôles, mais seulement chez les hommes [113]. De plus, des études pharmacologiques suggèrent une association entre la sécrétion de mélatonine et les symptômes du TAS. Par exemple, il a été observé que la prise matinale du bêta-bloquant propranolol, qui inhibe la production de la mélatonine, produit un effet antidépresseur chez les sujets atteints du TAS [114]. Aussi, sachant que la mélatonine est en vente libre dans les pharmacies, une étude a rapporté que la prise de celle-ci à des moments stratégiques pour réajuster la phase circadienne diminue les symptômes dépressifs caractéristiques du TAS [115]. Cependant, il importe de spécifier que l'hypothèse d'un dérèglement de la mélatonine dans le TAS demeure controversée puisque certaines

études n'ont pas été en mesure de confirmer la présence d'un délai de phase [116, 117] ou de dysfonctions dans la sécrétion de la mélatonine dans le TAS [118].

Finalement, des études suggèrent aussi un rôle de la dopamine centrale dans l'étiologie du TAS. À titre d'exemple, une diminution de la disponibilité du transporteur de la dopamine a été observée chez les patients atteints du TAS en comparaison aux sujets sains, mais seulement dans le striatum gauche [119]. De plus, une hausse de l'activité dopaminergique centrale a été suspectée chez les personnes avec TAS de par leur plus grande fréquence de clignements oculaires [120, 121] qui s'avère un indice d'une augmentation de l'activité dopaminergique centrale [122]. Aussi, il est connu que la dopamine centrale régule négativement la sécrétion de prolactine [123] et il a été démontré que les personnes atteintes du TAS présentent une production diminuée de cette hormone [124, 125]. Cette observation pourrait traduire une augmentation de l'activité dopaminergique centrale.

En somme, bien que l'étiologie exacte du TAS demeure toujours inconnue, on retrouve de nombreuses hypothèses qui pourraient expliquer les origines de ce trouble dont l'hyposérotoninergie centrale, l'hyperdopaminergie centrale ainsi que des désordres circadiens possiblement associés avec la sécrétion de la mélatonine. En plus des hypothèses qui concernent les neurotransmetteurs et les hormones, la sensibilité à la lumière a aussi été mise de l'avant pour expliquer le TAS. De ce fait, des anomalies des fonctions rétiniennes mesurées par l'ERG, dont une diminution de la sensibilité des bâtonnets, ont été observées chez les patients atteints du TAS lors de la phase dépressive [91, 126-128]. Or, cette anomalie du système des bâtonnets semble être spécifique à ce trouble et pourrait représenter ainsi un marqueur d'état du TAS. Cet aspect sera discuté plus en profondeur dans la section 1.3.2.

## **La schizophrénie**

### *Caractéristiques cliniques de la schizophrénie*

La schizophrénie est un trouble psychotique qui se caractérise par un large éventail de dysfonctionnements émotionnels et cognitifs comprenant, entre autres, des hallucinations, des

délires, des comportements et des discours désorganisés ainsi que des émotions inappropriées. Ceux-ci apparaissent habituellement à la fin de l'adolescence ou au début de l'âge adulte. La schizophrénie est particulièrement marquée par une grande hétérogénéité des symptômes, c'est-à-dire qu'un symptôme quelconque n'est pas nécessairement commun à tous les patients ayant reçu un diagnostic de schizophrénie. Afin de caractériser ce trouble, il existe généralement trois catégories de symptômes soit : i) les symptômes positifs comme les hallucinations et les délires, ii) les symptômes négatifs comme l'apathie, l'anhédonie et l'émoussement affectif et iii) les symptômes désorganisés comme un discours et un affect inappropriés. En plus de la présence des symptômes psychiatriques, plusieurs déficits cognitifs menant à des désordres sociaux ainsi que des difficultés dans la résolution de problèmes ont été observés chez les personnes avec un premier épisode psychotique [129].

#### *Facteurs de risque génétiques liés à la schizophrénie*

Les hypothèses actuelles pour expliquer la physiopathologie de la schizophrénie convergent vers un modèle qui regroupe des interactions entre des facteurs génétiques et environnementaux qui affecteraient le développement du système nerveux central et la plasticité synaptique menant ainsi à l'apparition de la maladie [130]. Des études génétiques suggèrent aussi un mode de transmission génétique intergénérationnel puisqu'il a été rapporté que le risque de développer la schizophrénie augmente d'environ 10 % chez les apparentés de premier degré de personnes atteintes par la maladie [131]. De plus, les études sur les jumeaux ont démontré que les facteurs génétiques sont fortement impliqués dans l'apparition de la schizophrénie, mais non suffisants pour expliquer le développement de cette maladie puisqu'un jumeau dizygote d'un schizophrène a 10 % de probabilité de développer la maladie, tandis qu'un jumeau monozygote d'un schizophrène a, pour sa part, 50 % de risque d'être atteint par la maladie [129].

D'un point de vue moléculaire, de nombreux gènes de susceptibilité et des dysfonctions dans l'expression de certaines protéines ont été associés à la schizophrénie. La plupart de ces gènes jouent un rôle dans le développement du système nerveux ainsi que dans la formation et la plasticité synaptique, et certains d'entre eux interagissent directement ou indirectement avec des composantes de la voie Akt/GSK3. Par exemple, plusieurs études d'associations génétiques ont démontré une

implication potentielle de la neuréguline1 (NRG1) dans la pathogenèse de la schizophrénie. NRG1 interagit avec Akt1 et les récepteurs tyrosine kinase ErbB afin de jouer un rôle dans la régulation de certains récepteurs de neurotransmetteurs comme l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) et l'acétylcholine, dans la plasticité synaptique, ainsi que dans la migration et la différenciation de certains précurseurs neuronaux et gliaux lors du développement cérébral [132]. En fait, des études post-mortem ont rapporté la présence d'une augmentation de l'expression de NRG1 de 23 % dans le cortex préfrontal [133] et de 34 % dans l'hippocampe [134] chez des patients atteints de schizophrénie. Il a aussi été observé que l'expression de l'isoforme SMDF de type III de NRG1 est augmentée de 3,8 fois dans les lymphocytes frais de patients atteints de schizophrénie [135]. Dans un même ordre d'idées, une diminution de l'expression de l'isoforme GGF2 de NRG1 a été rapportée dans les lymphocytes immortalisés de patients atteints de schizophrénie [132].

La protéine Akt s'avère aussi impliquée dans la pathophysiologie de la schizophrénie. En fait, une diminution de 68 % du niveau de Akt1 a été observée dans des lignées cellulaires dérivées de lymphocytes ainsi que dans le cortex préfrontal et l'hippocampe de tissus post-mortem de patients schizophrènes [17]. Or, aucune différence n'a été rapportée concernant l'expression des deux autres isoformes de Akt, soit Akt2 et Akt3, qui sont codés par des gènes différents. Tel que mentionné précédemment, NRG1 interagit avec Akt et il a été démontré que la stimulation de lymphocytes par NRG1 provoque une augmentation de la phosphorylation de Akt chez les sujets sains ou atteints d'un trouble psychotique autre que la schizophrénie, alors qu'aucune différence n'est observée dans les lymphocytes de patients schizophrènes [136]. Cela suggère la présence d'une diminution de la phosphorylation de Akt par NRG1 dans les cellules sanguines périphériques de patients atteints de schizophrénie [137], ce qui pourrait permettre de différencier la schizophrénie des autres psychoses.

Le déficit de Akt1 observé chez les patients atteints de schizophrénie pourrait être en relation avec la diminution de la phosphorylation de GSK3 $\beta$  à la sérine 9 (Ser9). En fait, dans le cortex frontal de patients schizophrènes, une diminution de 63 % du niveau de la protéine phospho-Ser9-GSK3 $\beta$  a été rapportée [138]. De plus, il a été démontré que des polymorphismes [139] et des génotypes [140] de GSK3 $\beta$  pourraient être impliqués dans la schizophrénie. L'autre isozyme de GSK3, soit GSK3 $\alpha$ , serait aussi associé à la schizophrénie puisque une surexpression de l'ARNm de GSK3 $\alpha$  a été observée dans les cellules sanguines périphériques de patients schizophrènes [141]. Bref,

l'expression de GSK3 semble impliquée dans la neuropathologie de la schizophrénie et pourrait devenir une cible d'intérêt pour le traitement pharmacologique des troubles psychotiques [142].

Des variations génétiques de la protéine Disrupted in Schizophrenia-1 (DISC1) ont aussi été associées à certaines maladies psychiatriques, dont la schizophrénie [143]. Bien que quelques études n'aient pas été en mesure de démontrer une association entre l'expression du gène codant pour DISC1 et la schizophrénie [144, 145], des expérimentations ont tout de même rapporté que les variations génétiques de DISC1 affectent l'épaisseur corticale, le volume de la matière grise et de l'hippocampe, l'intégrité de la matière blanche ainsi que les fonctions cognitives [146-150]. Cela s'explique par le fait que DISC1 est une protéine multifonctionnelle qui est impliquée dans les fonctions neurodéveloppementales à long terme [151]. De plus, il a été démontré que DISC1 régule directement GSK3 en inhibant son activité [152].

### *L'implication des neurotransmetteurs*

Au niveau des neurotransmetteurs, une forte implication du système de la dopamine a d'abord été décrite dans la pathophysiologie de la schizophrénie. En fait, l'hypothèse hyperdopaminergique de la schizophrénie a été émise suite à l'observation des effets psychomimétiques des drogues stimulantes et des effets antipsychotiques des antagonistes du récepteur D2 [62]. Au fil du temps, l'hypothèse dopaminergique a été reformulée passant d'une hyperfonction de la dopamine généralisée dans tout le cerveau [153, 154] à un déséquilibre de la neurotransmission dopaminergique qui diffère selon les régions cérébrales [155-157]. Il a d'ailleurs été suggéré que l'hyperactivité dopaminergique dans les structures sous-corticales, comme le striatum, serait à l'origine des symptômes positifs de la schizophrénie, tandis que les symptômes négatifs seraient associés à l'hypoactivité de la dopamine dans le cortex et plus précisément dans le cortex préfrontal [158].

En plus de l'implication de la dopamine, l'hypothèse glutamatergique de la schizophrénie suggère, entre autres, une diminution des fonctions du récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA) dans la maladie [159, 160] puisqu'il a été démontré qu'un blocage pharmacologique de ce récepteur provoque des désordres cognitifs et psychotiques [161, 162]. Étant donné qu'il existe des interactions

entre les systèmes dopaminergique et glutamatergique, il a été suggéré que la pathophysiologie de la schizophrénie serait associée à des anomalies interconnectées de la neurotransmission de la dopamine et du glutamate [163]. De plus, l'implication du GABA a aussi été rapportée dans la schizophrénie. En fait, des études post-mortem ont démontré une diminution de la présence du transporteur du GABA (GAT1) ainsi que de la glutamate décarboxylase (GAD67) chez les patients schizophrènes, ce qui mènerait à une augmentation compensatoire de l'expression des récepteurs postsynaptiques GABA<sub>A</sub> dans le cortex préfrontal dorsolatéral et le cortex cingulaire antérieur [164]. Enfin, l'acétylcholine serait aussi impliquée dans la pathophysiologie de la schizophrénie de par une diminution de l'expression de son récepteur neuronal nicotinique alpha7 (CHRNA7) [165].

### *Les facteurs environnementaux*

En plus des facteurs de prédisposition génétique et les influences neurobiologiques, de nombreux facteurs environnementaux et sociaux seraient associés à la pathobiologie de la schizophrénie [166, 167]. Parmi ceux-ci, on retrouve des déficits *in-utéro* comme la malnutrition maternelle [168], la contraction d'une infection durant la grossesse [169] ainsi que des complications obstétricales [170]. De plus, une corrélation a été démontrée entre la saison de la naissance (hiver et printemps) et le développement de la schizophrénie [171]. Enfin, on compte aussi parmi les facteurs de risque environnementaux l'urbanisme [172, 173], la consommation de drogues comme le cannabis [174] ainsi que les traumatismes durant l'enfance [175], pour n'en nommer que quelques-uns.

Tout compte fait, chacun des facteurs de risque génétiques et environnementaux peuvent jouer un rôle dans la pathophysiologie de la schizophrénie. Il va de soi qu'avec un nombre élevé de facteurs de susceptibilité qui sont tous caractérisés par une grande variété d'expression, la schizophrénie est une maladie hétérogène et sa pathobiologie demeure difficile à caractériser.

## **Le trouble bipolaire**

### *Caractéristiques cliniques du trouble bipolaire*

Le trouble bipolaire est un problème de santé mentale chronique qui se caractérise par des fluctuations de l'humeur récurrentes. Il existe deux formes classiques de la maladie, soit le trouble bipolaire de type I qui se caractérise par des épisodes de dépression majeure accompagné par au moins un épisode de manie, et le trouble bipolaire de type II où des épisodes de dépression majeure alternent avec des moments d'hypomanie. Les périodes euthymiques sont les périodes neutres qui entrecoupent les états d'humeur. Un épisode de manie se caractérise par la présence d'une humeur euphorique ou irritable où le patient peut démontrer, entre autres, des idées de grandeur, une augmentation de l'estime de soi, de la distraction, en plus de s'engager dans des activités qui pourraient avoir des conséquences dommageables. Ces symptômes sont suffisamment sévères pour altérer le fonctionnement de l'individu et sont parfois accompagnés de symptômes psychotiques, ce qui nécessite souvent une hospitalisation. Pour sa part, l'hypomanie se définit comme une forme atténuée de manie où l'intensité des symptômes n'est pas suffisante pour altérer le fonctionnement de la personne et ne nécessite pas d'hospitalisation [2, 129].

### *Neurobiologie et cibles thérapeutiques du trouble bipolaire*

Tout comme la schizophrénie, le développement du trouble bipolaire peut être expliqué par un large éventail de facteurs environnementaux, génétiques et développementaux. Bien que la physiopathologie du trouble demeure encore mal comprise, les cibles thérapeutiques des agents pharmacologiques utilisés pour le traitement des symptômes peuvent donner une piste sur les mécanismes physiologiques sous-jacents du trouble bipolaire [176]. Par exemple, des dysfonctions de certains systèmes de neurotransmetteurs pourraient être en jeu dans cette maladie puisque les médicaments prescrits dans le trouble bipolaire agissent sur ces systèmes. En fait, il a été démontré que les antipsychotiques utilisés pour contrer les symptômes maniaques bloquent les récepteurs dopaminergiques D2R [177]. Aussi, il a été rapporté que les antipsychotiques atypiques sont reconnus pour augmenter l'activité sérotoninergique [178]. Enfin, il a été observé que la kétamine, qui est un antagoniste des récepteurs NMDA, peut rapidement contrer les symptômes dépressifs [179],

tandis que la transmission glutamatergique peut être modulée par certains antidépresseurs de même que par le valproate et la lamotrigine [180].

Le stabilisateur d'humeur lithium est grandement utilisé pour contrer les symptômes du trouble bipolaire et il est connu que l'une de ses actions thérapeutiques est l'inhibition de GSK3 [77]. Dans cet ordre d'idées, il a été rapporté que plusieurs facteurs de risque génétiques pour le trouble bipolaire et/ou la schizophrénie peuvent activer directement ou indirectement GSK3. Parmi ceux-ci, on retrouve, entre autres, Tph2 [47, 48], DISC1 [181, 182] et NRG1 [183]. De plus, des études génomiques ont démontré que le trouble bipolaire partage plusieurs régions de susceptibilité avec la schizophrénie, tandis que certaines régions de susceptibilité sont spécifiques à chacune des maladies [184-187]. Les convergences génétiques entre ces maladies suggèrent qu'un mécanisme commun pourrait expliquer leurs origines.

Aussi, les personnes atteintes de troubles de l'humeur, dont le trouble bipolaire et la dépression majeure, présentent des problèmes de sommeil et de régulation des rythmes circadiens [188, 189]. En fait, il a été rapporté que 70 % à 80 % des patients dépressifs se réveillent trop tôt le matin ou présentent de la difficulté à s'endormir ou à garder le sommeil [189]. De plus, il a été démontré que leur température corporelle moyenne est plus élevée par rapport aux sujets sains [188]. Également, il a été observé que certains patients présentent un décalage dans la sécrétion de mélatonine, ce qui pourrait suggérer un délai de phase dans leurs rythmes circadiens [188]. L'étude de l'humeur des patients dépressifs peut aussi s'avérer pertinente, puisqu'il a été démontré que celle-ci varie selon un cycle circadien, c'est-à-dire que les patients présentent des symptômes sévères de dépression tôt le matin qui se dissipent graduellement au fil de la journée. D'ailleurs, une expérimentation a rapporté que la privation de sommeil semble donner des résultats intéressants lorsqu'elle est combinée à une prise d'antidépresseurs ou de stabilisateurs d'humeur [190]. Des études ont aussi démontré que le lithium peut influencer les rythmes circadiens [191-194] et il a été suggéré que sa cible moléculaire GSK3 serait impliquée dans cette réponse physiologique puisqu'elle interagit avec certaines molécules de l'horloge biologique [195]. Bref, il semble que les composantes de l'horloge biologique pourraient aussi être impliquées dans la physiopathologie du trouble bipolaire et plus particulièrement des symptômes dépressifs [189].

À l'échelle neuroanatomique, des altérations dans le circuit corticolimbique qui contrôle les émotions ont aussi été décrites [196]. En résumé, durant les épisodes maniaques, il a été démontré que l'amygdale devient hyperactive [197] et que l'activité du cortex cingulaire antérieur est réduite [198]. De plus, une diminution de l'activité du cortex préfrontal ventrolatéral [199] accompagnée d'une hyperactivation des ganglions de la base a été rapportée [200]. Enfin, une diminution de la connectivité entre les régions préfrontales et les structures limbiques a été observée [201].

En général, les études suggèrent que le trouble bipolaire et la schizophrénie partagent des aspects génétiques, des endophénotypes, des caractéristiques comportementales et certaines anomalies neurobiologiques. Or, une étude électrorétinographique a permis de distinguer ces deux pathologies sur la base de la mesure des fonctions rétinienne chez les patients [202]. La physiologie rétinienne et la description de cette technique font l'objet de la partie suivante.

## **1.2. La rétine comme partie du système nerveux central**

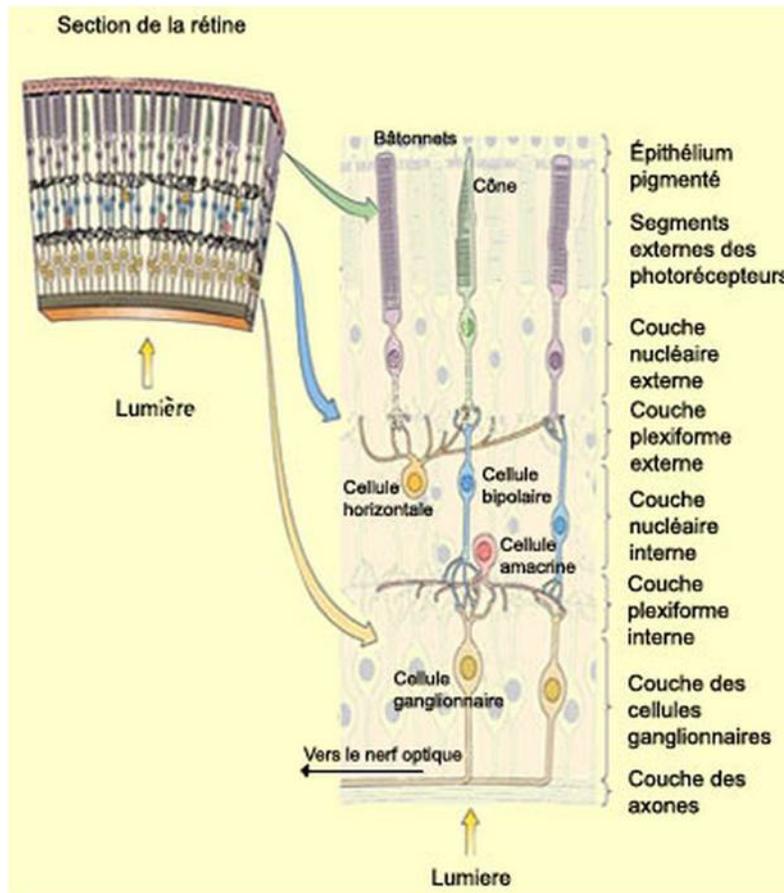
Malgré sa position en périphérie, la rétine fait partie du système nerveux central. En fait, durant le développement embryonnaire, la rétine se forme à partir d'une excroissance du diencephale appelée vésicule optique. Celle-ci s'invagine afin de former la cupule optique dont la partie interne deviendra la rétine et la partie externe, l'épithélium pigmentaire [203]. La rétine représente la partie neurale de l'œil qui est constituée de circuits nerveux complexes qui ont pour principale fonction de transformer le signal lumineux capté par l'œil en signal électrique qui gagne le cerveau via le nerf optique. En plus d'être une structure essentielle à la perception des images, la rétine est aussi le point de départ d'une voie dite « non visuelle » qui permet de réguler les rythmes circadiens [41]. Cette section discute de la physiologie rétinienne ainsi que du fonctionnement de l'horloge biologique.

### **1.2.1. La physiologie de la rétine**

Lorsque la lumière pénètre dans l'œil, celle-ci traverse plusieurs structures oculaires dont la cornée, l'humeur aqueuse, le cristallin, l'humeur vitrée ainsi que toutes les couches rétinienne avant

d'atteindre les photorécepteurs qui initient la cascade de phototransduction. La formation d'images nettes sur la rétine nécessite la focalisation de la lumière grâce à la réfraction de celle-ci par la cornée et le cristallin. On retrouve cinq types de neurones rétiniens qui sont les photorécepteurs, les cellules bipolaires, les cellules ganglionnaires, les cellules horizontales et les cellules amacrines. La rétine se caractérise par une organisation remarquable en cinq couches alternées telle que représentée dans la figure 1.5 : i) la couche nucléaire externe qui comprend les corps cellulaires des photorécepteurs, ii) la couche plexiforme externe où sont situés les prolongements et les contacts synaptiques des photorécepteurs, des cellules bipolaires et des cellules horizontales, iii) la couche nucléaire interne qui comporte les corps cellulaires des cellules bipolaires, horizontales et amacrines, iv) la couche plexiforme interne qui regroupe les prolongements et les contacts synaptiques des cellules bipolaires, des cellules ganglionnaires ainsi que des cellules amacrines et, finalement, v) la couche des cellules ganglionnaires qui comprend les corps cellulaires de celles-ci. La voie verticale est la plus directe pour transmettre les informations visuelles au cerveau et passe par les photorécepteurs, les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires. Les cellules horizontales et amacrines interviennent dans les interactions latérales afin d'amplifier le signal entre les photorécepteurs, les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires [41, 204].

Enfin, il ne faut pas omettre la présence de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) qui joue un rôle capital dans la physiologie rétinienne. En effet, cette structure contient la mélanine qui permet de réduire la réflexion parasite de la lumière qui pénètre dans l'œil [205]. De plus, le transport épithélial de l'EPR permet de fournir les nutriments nécessaires aux photorécepteurs, de contrôler l'homéostasie ionique dans l'espace subrétinal et d'éliminer l'eau et les métabolites des tissus de la rétine [206]. L'EPR s'avère aussi essentiel au cycle visuel du rétinol puisque la re-isomérisation du tout-trans rétinol se fait dans cette structure [207]. Également, l'EPR sécrète divers facteurs et molécules de signalisation pour assurer la communication avec les tissus adjacents à la rétine [206]. Finalement, cette structure joue un rôle dans le renouvellement des disques du segment externe des photorécepteurs qui sont constamment endommagés par des réactions photo-oxydatives. À vrai dire, l'EPR est responsable du processus de dégradation et de régénération appelé *disc shedding*, où il phagocyte les disques endommagés [208]. En somme, l'EPR est une structure fondamentale pour assurer le bon fonctionnement de la phototransduction et de la physiologie rétinienne.



**Figure 1.5.** Représentation des différentes couches de la rétine ainsi que des types de cellules rétiniennes (tiré de la référence 243 [copyleft]).

## Les photorécepteurs

Les cônes et les bâtonnets sont les deux types de photorécepteurs rétiniens. Ceux-ci sont composés d'un segment externe qui comporte des disques membraneux chargés de pigments photosensibles, ainsi que d'un segment interne qui contient le noyau cellulaire et qui forme les prolongements synaptiques qui interagissent avec les cellules bipolaires ou horizontales. Les deux types de photorécepteurs se distinguent particulièrement par le type de pigments photosensibles qu'ils contiennent, par leur distribution rétinienne et par l'organisation de leurs connexions synaptiques. Par exemple, il est connu que les bâtonnets sont spécialisés pour la sensibilité à la lumière aux dépens de la résolution spatiale, tandis que les cônes sont spécialisés pour l'acuité visuelle aux dépens de la sensibilité à la lumière [209].

Le type de photorécepteur activé est associé au niveau d'éclairement de l'environnement. La vision scotopique représente la perception qui n'est due qu'à l'activité des bâtonnets et se fait aux niveaux d'éclairement les plus bas, c'est-à-dire à des luminances inférieures à  $10^{-3}$  cd/m<sup>2</sup> [210]. À mesure que l'éclairement augmente, les cônes commencent à contribuer à la perception visuelle. Le type de vision qui met en jeu à la fois le système des bâtonnets et le système des cônes est la vision mésopique. Lorsque l'intensité lumineuse est plus élevée que 3 cd/m<sup>2</sup>, le système des bâtonnets se sature et la perception visuelle se fait ainsi exclusivement grâce aux cônes et s'appelle vision photopique [210].

Il existe trois types de cônes selon l'opsine qu'ils contiennent, ce qui leur permet de réagir préférentiellement à certaines longueurs d'ondes. Ces types sont : i) les cônes S qui sont activés par des courtes longueurs d'ondes avec un pic de sensibilité autour de 420 nm, ii) les cônes M qui sont activés par des longueurs d'ondes moyennes avec un pic de sensibilité autour de 530 nm et iii) les cônes L qui répondent aux longues longueurs d'ondes avec un pic de sensibilité autour de 560 nm. Avec cette caractéristique spectrale, les cônes sont respectivement nommés bleus, verts ou rouges [211].

Le fait que les cônes et les bâtonnets réagissent à des gammes différentes d'intensités lumineuses s'explique par les mécanismes de transduction de ces deux types de photorécepteurs [209]. En fait, les cônes ont besoin d'environ 10 à 100 photons pour déclencher une réponse, tandis qu'il n'en faut qu'un seul dans le cas des bâtonnets [212]. De plus, à des niveaux d'éclairement plus élevés, le système des cônes ne se sature pas comme c'est le cas pour le système des bâtonnets. Il importe de spécifier que les cônes ont des mécanismes d'adaptation à la lumière plus efficaces, c'est-à-dire qu'un cône peut récupérer suite à un changement intense de courant dans la cellule en à peu près 200 millisecondes, ce qui est quatre fois plus rapide que le temps de récupération d'un bâtonnet [213].

Les systèmes des cônes et des bâtonnets se différencient aussi par l'organisation de leur connexions synaptiques dans la rétine. À vrai dire, les cellules ganglionnaires transmettent l'information provenant à la fois des cônes ou des bâtonnets selon le niveau d'éclairement puisque les signaux qui émanent des cônes et des bâtonnets convergent sur les mêmes cellules

ganglionnaires [204]. Or, les circuits synaptiques qui relient les cônes et les bâtonnets aux cellules ganglionnaires sont différents. Par exemple, dans la zone fovéolaire, les cônes sont en contact avec une seule cellule bipolaire qui est elle-même reliée à une seule cellule ganglionnaire. En ce qui concerne le système des bâtonnets, il y a convergence de plusieurs bâtonnets vers une cellule bipolaire de bâtonnets et ces cellules bipolaires de bâtonnets sont reliées aux prolongements d'une classe spécialisée de cellules amacrines, soit les cellules amacrines AII. Ces dernières font synapse avec les terminaisons des cellules bipolaires de cônes qui, à leur tour, forment le contact synaptique avec les dendrites des cellules ganglionnaires [214].

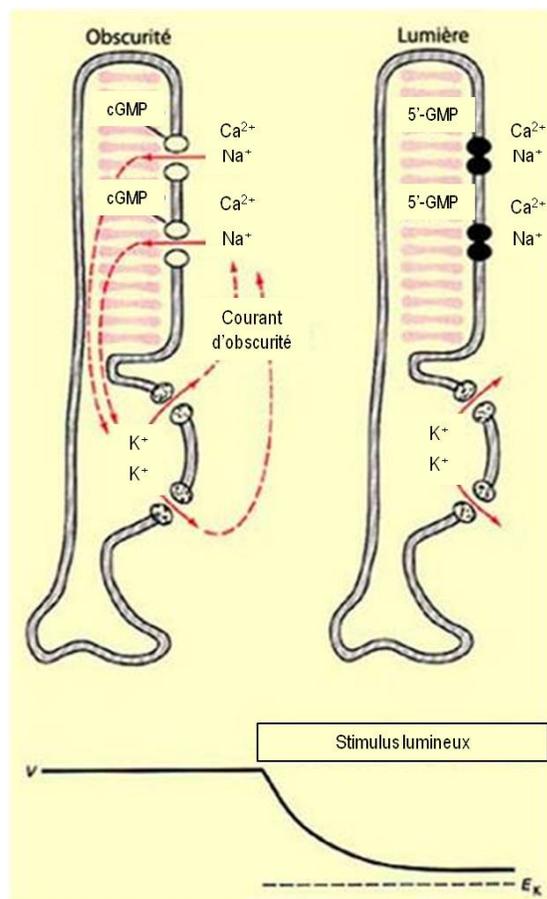
En plus de leurs caractéristiques physiologiques distinctes, les cônes et les bâtonnets sont distribués différemment dans la rétine. En fait, dans la rétine humaine, on compte entre 4 et 6 millions de cônes, tandis que le nombre de bâtonnets est largement supérieur et varie entre 78 et 110 millions [215]. Cela dit, la densité des bâtonnets est beaucoup plus grande que celle des cônes dans toute la rétine sauf dans une partie centrale nommée fovéa. Dans cette région spécialisée qui a un diamètre d'environ 1,2 millimètre, la densité des cônes est de presque 200 fois plus élevée et celle des bâtonnets grandement diminuée au point où ceux-ci sont totalement absents dans les 300  $\mu\text{m}$  qui forment le centre de la fovéa et qui se nomme la fovéola [209].

### *La phototransduction*

Dans la majorité des systèmes sensoriels, lorsqu'un récepteur est activé par un stimulus, il s'ensuit une dépolarisation de la membrane cellulaire du neurone. Cela provoque l'émission d'un potentiel d'action menant à la libération de transmetteurs sur les neurones postsynaptiques [41]. Or, les photorécepteurs de la rétine n'émettent pas de potentiels d'action, mais l'activation de la cellule par la lumière permet un changement graduel du potentiel de membrane et ainsi une libération altérée du glutamate vers les neurones postsynaptiques. Cela dit, la transduction du signal dans la rétine ne se fait qu'avec des potentiels gradués qui prennent naissance dans le segment externe des photorécepteurs [212].

Dans la noirceur, les photorécepteurs sont dépolarisés et plusieurs canaux ioniques situés sur le segment externe des cellules sont ouverts. Cela mène à une libération rapide du glutamate en

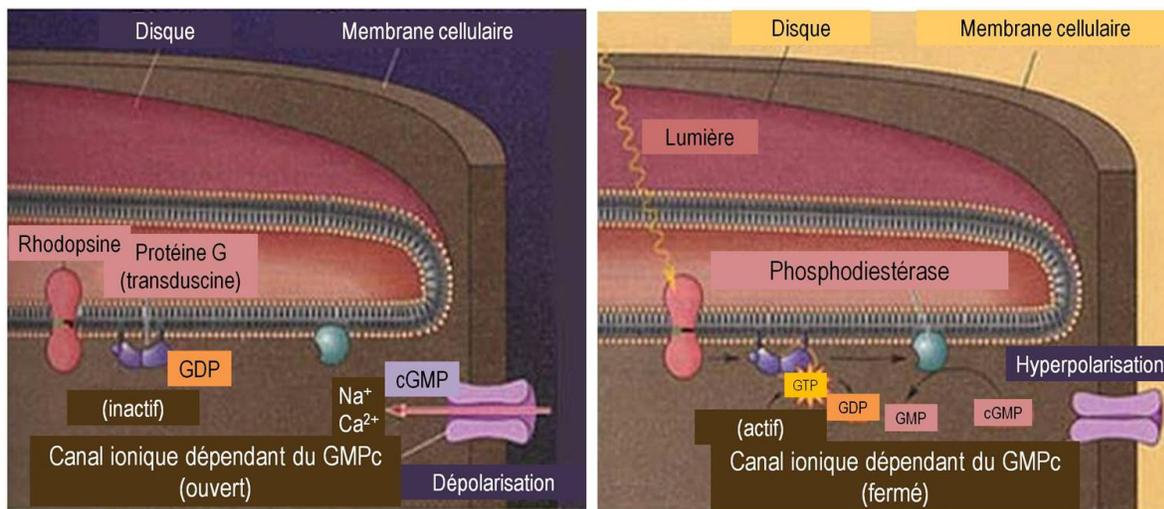
raison de la concentration intracellulaire de calcium élevée [216, 217]. En fait, l'état de dépolarisation relative des photorécepteurs dépend de l'ouverture des canaux ioniques dans la membrane qui réduisent le niveau de négativité interne de la cellule grâce à l'entrée d'ions sodium et calcium. Cet influx d'ions se compose de 20 % et 35 % d'ions calcium respectivement dans les bâtonnets et dans les cônes [218]. L'ouverture et la fermeture de ces canaux ioniques sont régulées par le guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Tel que représenté dans la figure 1.6, le niveau de GMPc dans le segment externe est élevé dans la noirceur, ce qui maintient les canaux ioniques GMPc-dépendants ouverts, tandis que dans la lumière, ce niveau diminue et entraîne la fermeture des canaux ioniques GMPc-dépendants. Cela mène à l'hyperpolarisation de la membrane de la cellule et ainsi à la diminution de la libération de glutamate au niveau de la synapse du photorécepteur [219].



**Figure 1.6.** Représentation de l'effet des changements des niveaux de GMPc dans les bâtonnets (tiré et modifié de la référence 243 [copyleft]).

Les événements biochimiques qui précèdent les changements des niveaux du GMPc débutent par l'absorption d'un photon par le pigment photosensible des disques du photorécepteur.

Ce photopigment contient le rétinale qui est un chromophore absorbant la lumière et qui est couplé à une protéine de la famille des opsines qui ajuste l'absorption de la lumière par la molécule à une région particulière du spectre lumineux. Par exemple, dans les bâtonnets, le photopigment est la rhodopsine et lorsque son rétinale absorbe un photon, sa configuration passe de la forme *11-cis* à la forme *tout-trans*. Cela mène à l'activation de la transducine qui est une protéine G qui, à son tour, active une phosphodiésterase. Celle-ci hydrolyse le GMPc ce qui engendre une diminution de sa concentration dans le segment externe et entraîne ainsi la fermeture des canaux ioniques de la membrane tel que représenté dans la figure 1.7 [212].



**Figure 1.7.** Détails de la phototransduction dans les bâtonnets (tiré et modifié de la référence 243 [copyleft]).

Cette cascade biochimique complexe est caractérisée par la grande amplification du signal qui en résulte. En fait, l'activation d'une molécule de rhodopsine par la lumière peut activer 1000 molécules de transducine. À son tour, une molécule de transducine ne peut activer qu'une molécule de phosphodiésterase, mais cette dernière peut hydrolyser rapidement le GMPc, ce qui provoque la fermeture de quelques centaines de canaux ioniques GMPc-dépendants sur un bâtonnet [219]. L'adaptation à la lumière permet aussi de réguler la grandeur de l'amplification selon le niveau d'éclairement. À titre d'exemple, la sensibilité des photorécepteurs est à son maximum à un faible niveau d'éclairement et, à mesure que la luminosité augmente, la sensibilité des photorécepteurs diminue afin de les empêcher d'être saturés et ainsi d'opérer sur une plus grande gamme d'intensités lumineuses. Ce phénomène est grandement régulé par la concentration de calcium dans le segment

externe des photorécepteurs [220]. En fait, lors de la fermeture des canaux ioniques du segment externe engendrée par la lumière, l'entrée de calcium dans la cellule est bloquée et les échangeurs ioniques de la membrane plasmique font sortir le calcium du photorécepteur. La diminution du calcium intracellulaire active les *Guanylate Cyclase Activating Proteins* (GCAP) qui, à leur tour, activent la guanylate cyclase qui favorise la production du GMPc et provoque l'ouverture des canaux GMPc-dépendants [221]. De plus, la réduction du calcium intracellulaire mène à la dissociation de la calmoduline avec les canaux GMPc-dépendants ce qui augmente l'affinité des canaux pour le GMPc [222]. Enfin, la baisse du calcium intracellulaire va aussi provoquer la dissociation de la recoverine et de la rhodopsine kinase, permettant ainsi la phosphorylation de la rhodopsine et l'inhibition de son interaction avec la transducine [223].

### **Les cellules bipolaires**

Tel que mentionné précédemment, les cellules bipolaires peuvent recevoir directement le signal provenant des photorécepteurs. En raison de la convergence différente des systèmes des cônes et des bâtonnets, les cellules bipolaires sont connectées à plusieurs bâtonnets alors qu'elles ne forment qu'une seule synapse avec un cône, mais dans la région fovéale seulement. Cette organisation synaptique est responsable de la présence de champs récepteurs, c'est-à-dire un champ récepteur central qui est créé par le contact synaptique avec les photorécepteurs et un champ récepteur périphérique qui provient des afférences des cellules horizontales. Les centres de ces champs récepteurs sont de nature ON ou OFF où l'illumination sur un centre ON a un effet excitateur sur la cellule bipolaire, tandis qu'une stimulation lumineuse du champ périphérique inhibe la cellule. L'effet contraire est observé sur les cellules avec un champ à centre OFF [209].

Tout comme les photorécepteurs, les cellules bipolaires répondent à des potentiels gradués. Les cellules bipolaires à centres ON et OFF expriment différents types de récepteurs glutamatergiques, ce qui cause une réponse différente à des changements de luminance. En fait, les cellules à centre OFF expriment les récepteurs AMPA et kaïnate qui, lorsque liés au glutamate, provoquent une dépolarisation des cellules. Ainsi, à la noirceur, le relâchement du glutamate est élevé et les cellules bipolaires OFF des cônes sont dépolarisées. Pour leur part, les cellules bipolaires à centre ON ont des récepteurs métabotropiques du glutamate couplés à une protéine G (mGluR6) qui, lorsque liés au

glutamate, provoquent la fermeture des canaux sodiques. Ainsi, en présence de lumière, le relâchement du glutamate est réduit et les cellules bipolaires ON sont dépolarisées [224].

## **Les cellules ganglionnaires**

Contrairement aux autres cellules rétiniennes qui émettent des potentiels gradués, les cellules ganglionnaires sont les seules à produire un potentiel d'action. Cette caractéristique est due au fait que les axones des cellules ganglionnaires forment le nerf optique qui transmet l'information électrique sur une grande distance qui peut s'étendre jusque dans le cortex visuel. Bien que ces potentiels d'action soient générés spontanément, la fréquence de leur décharge dépend du stimulus appliqué à leur champ récepteur. En fait, la plupart des cellules ganglionnaires sont à centres ON ou OFF et cette caractéristique est transmise par la cellule bipolaire à laquelle la cellule ganglionnaire est connectée. Cela dit, chez les cellules ganglionnaires à centre ON, la fréquence de décharge est augmentée en réponse à une hausse de luminance au centre de leur champ récepteur, alors que les cellules ganglionnaires à centre OFF voient leur fréquence de décharge augmenter suite à une diminution de la luminance au centre de leur champ récepteur [225].

On retrouve plusieurs types de cellules ganglionnaires qui se différencient selon leurs fonctions et leurs projections [226]. Premièrement, il y a les petites cellules ganglionnaires de type P qui projettent vers les couches parvocellulaires du noyau géniculé latéral et qui représentent la majorité de la population totale des cellules ganglionnaires. Ces cellules exercent une réponse tonique qui est maintenue aussi longtemps que le stimulus agit. Deuxièmement, une petite fraction des cellules ganglionnaires sont les grandes cellules de type M qui forment des projections jusque dans la couche magnocellulaire du noyau géniculé latéral. Les cellules de type M ont un grand champ récepteur et sont plus sensibles aux stimuli à faible contraste, ce qui leur permet de propager des potentiels d'action plus rapidement dans le nerf optique. Troisièmement, on retrouve un petit nombre de cellules ganglionnaires bistratifiées qui projettent jusque dans les couches koniocellulaires du noyau géniculé latéral. Ces cellules pourraient être impliquées dans la vision des couleurs puisque celles-ci ont un champ récepteur large qui ne comporte que la partie centrale qui est ON pour les cônes bleus et OFF pour les cônes rouges et verts. Finalement, les cellules ganglionnaires intrinsèquement photosensibles (iPRGCs) contiennent un photopigment qui leur est propre, soit la

mélanopsine. Ces cellules projettent particulièrement dans le noyau suprachiasmatique (NSC) via la voie rétino-hypothalamique et sont impliquées dans la régulation des rythmes circadiens. Ces cellules font l'objet d'une partie de la section 1.2.2.

## **Les neurotransmetteurs de la rétine**

La rétine comporte de nombreux neurotransmetteurs qui jouent un rôle dans sa physiologie. Parmi ces molécules, on retrouve le glutamate qui est le neurotransmetteur principal de la voie directe de la rétine, le GABA, la glycine, l'acétylcholine et l'adénosine. Or, cette section décrit l'implication rétinienne de deux neurotransmetteurs d'intérêt pour cette thèse, soit la dopamine et la sérotonine.

### *La dopamine*

Dans la rétine, la dopamine est la principale catécholamine qui y est exprimée et elle joue un rôle dans l'adaptation à la lumière ainsi que dans différentes fonctions trophiques. Elle est sécrétée par les cellules amacrines et exerce son mode d'action par les récepteurs dopaminergiques qui sont répartis dans les différents types de cellules rétinienne. À titre d'exemple, les récepteurs D1R sont exprimés dans les cellules bipolaires, ganglionnaires et horizontales [227], tandis que les récepteurs D2R sont retrouvés dans les synapses entre les cellules horizontales, bipolaires et les photorécepteurs [228].

Son principal rôle dans la rétine est de découpler les jonctions entre les cellules horizontales [229] et cette fonction pourrait expliquer les différents résultats qui ont été observés à l'ERG dans certaines études pharmacologiques. Par exemple, chez le chat, il a été démontré que l'application dans des yeux perfusés de l'antagoniste dopaminergique fluphenazine mène à une augmentation de la sensibilité des bâtonnets [230]. Aussi, toujours chez le chat, une étude a rapporté que la destruction des cellules dopaminergiques rétinienne par la neurotoxine 6-hydroxydopamine (6-OHDA) provoque l'augmentation de l'amplitude de l'onde b dans les conditions scotopique, mésopique et photopique [231]. De plus, certaines études ont démontré l'implication des différents récepteurs dopaminergiques dans l'ERG. À titre d'exemple, il a été observé, chez le lapin, que

l'injection intravitréale d'un agoniste de la famille des récepteurs dopaminergiques D1 provoque une diminution de l'amplitude des ondes de l'ERG, tandis qu'un agoniste de la famille des récepteurs de la dopamine D2 n'a aucun effet [232]. Or, il a aussi été observé que des drogues qui agissent comme antagonistes du récepteur D2R diminuent l'amplitude de l'onde b des cônes et des bâtonnets [233-235]. Cependant, la fonction précise d'un récepteur dopaminergique spécifique dans les fonctions rétiniennes demeure difficile à caractériser puisque des agents pharmacologiques ayant une affinité pour plus d'un récepteur ont été utilisés dans les études ci-dessus.

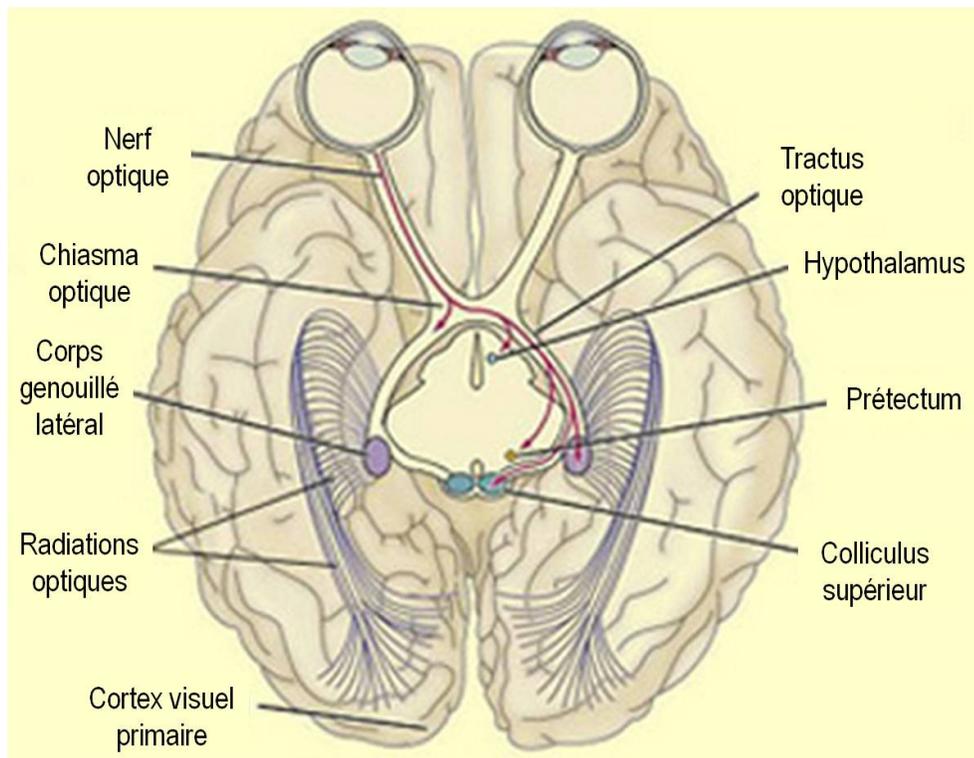
### *La sérotonine*

Dans la rétine, le niveau de sérotonine endogène est relativement bas chez les mammifères, soit environ 10 % du niveau de dopamine rétinienne [236]. La majeure partie de la sérotonine rétinienne provient du cerveau grâce aux afférences du noyau dorsal du raphé qui émergent du nerf optique que l'on appelle les axones rétino-pétals. On dénombre plusieurs types d'axones rétino-pétals selon les espèces, tous provenant de diverses structures cérébrales et projetant différentes molécules dans la rétine comme de l'histamine et de la sérotonine [236, 237]. Dans la rétine, des études ont démontré que la sérotonine joue un rôle possible dans la vasoconstriction des vaisseaux sanguins et pourrait provoquer de l'ischémie [238-240]. De plus, il a été rapporté qu'elle pourrait être impliquée dans les fonctions rétiniennes puisqu'elle augmente la décharge des cellules ganglionnaires à centre OFF et diminue la décharge des cellules ganglionnaires à centre ON chez le chat, ce qui mènerait à une meilleure adaptation à la lumière [241]. Enfin, toujours chez le chat, il a été démontré que l'injection intravitréale de sérotonine provoque une augmentation de l'amplitude de l'onde b de l'ERG en condition scotopique, et ce, sans affecter la latence des ondes [231]. Or, la situation contraire a été observée chez le pigeon puisque la déplétion de sérotonine mène à une augmentation de l'amplitude de l'onde b ainsi qu'à une diminution de la latence de l'onde b des cônes et des bâtonnets [242].

### **De la rétine au cortex visuel**

Les axones des populations distinctes de cellules ganglionnaires parcourent le nerf optique, le chiasma optique et le tractus optique avant de se projeter vers diverses structures centrales pour y

assurer différentes fonctions. Parmi ces projections, les plus importantes vont vers le prétectum pour contrôler le réflexe pupillaire, vers le noyau suprachiasmatique pour réguler les rythmes circadiens ou vers le colliculus supérieur pour contrôler les mouvements de la tête et des yeux. Or, les projections les plus importantes vont vers le corps genouillé latéral qui représente la cible majeure de chaque tractus optique et qui permet le traitement des informations visuelles. Les projections rétino-géniculostriées, qui constituent la voie visuelle primaire, se continuent en radiations optiques et se terminent dans le cortex visuel primaire ou cortex strié [41] tel que représenté dans la figure 1.8.



**Figure 1.8.** Représentation des projections centrales des cellules ganglionnaires de la rétine (tiré et modifié de la référence 243 [copyleft]).

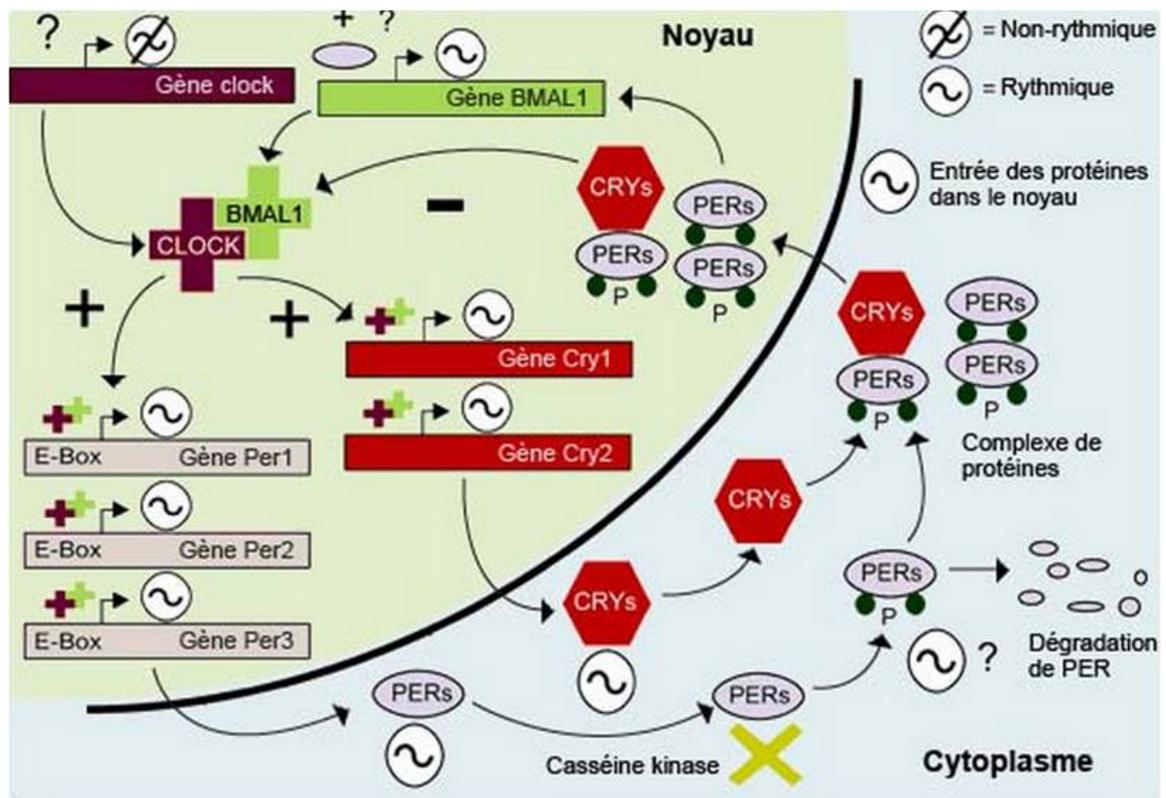
En résumé, la lumière captée par les photorécepteurs de la rétine est transformée en signal électrique qui voyage dans plusieurs structures cérébrales, dont le cortex visuel pour l'élaboration de la perception visuelle consciente. Les signaux lumineux activent aussi d'autres projections dont la voie rétino-hypothalamique qui permet la régulation de l'horloge biologique et qui constitue la voie dite « non visuelle » de la rétine.

## 1.2.2. La voie « non visuelle » de la rétine et la régulation des rythmes circadiens

Tel que mentionné précédemment, la rétine est le point de départ d'une voie dite « non visuelle » qui permet de réguler les rythmes circadiens. En effet, l'environnement naturel est caractérisé par des changements cycliques, dont l'alternance entre la lumière et l'obscurité. Ce signal capté par l'œil s'avère le principal *Zeitgeber*, ou indice temporel de synchronisation de l'horloge biologique. Chez l'humain, l'horloge biologique permet la régulation adéquate des différents rythmes circadiens de l'organisme dont le cycle veille/sommeil, la température corporelle ainsi que la sécrétion de plusieurs hormones qui se distinguent par leur durée d'environ 24 heures [42, 243].

### L'horloge biologique endogène

Les rythmes endogènes de l'horloge biologique sont régulés à l'échelle moléculaire dans chacune des cellules de l'organisme selon une boucle de rétroaction négative d'une durée de 24 heures. C'est la lumière qui influence cette boucle de rétroaction complexe et qui permet sa synchronisation avec le cycle jour/nuit. Brièvement, le cycle débute le matin par la transcription des gènes *Bmal1* et *Clock* suivie de l'hétérodimérisation des protéines BMAL1 et CLOCK. Ce complexe active la transcription des gènes *Period* (*Per1*, *Per2* et *Per3*) ainsi que *Cryptochrome* (*Cry1* et *Cry2*) en se liant à leur « *E-box* » qui est une région promotrice de ces gènes. Les protéines PER et CRY s'accumulent dans le cytoplasme avant de former un complexe PER-CRY ou PER-PER et d'entrer dans le noyau cellulaire pour inhiber leur propre transcription en interagissant avec le dimère BMAL1-CLOCK et en le séparant du « *E-box* ». Vers la fin de la nuit, PER et CRY sont dégradés, ce qui permet la reprise de leur transcription activée grâce au complexe BMAL1-CLOCK [244]. La figure 1.9 schématise cette boucle de rétroaction. La synchronisation de cette boucle circadienne est orchestrée par les décharges des neurones du noyau suprachiasmatique (NSC) de l'hypothalamus antérieur qui représente le *pacemaker* de l'horloge biologique [245].



**Figure 1.9.** Schématisation de la boucle de rétroaction négative qui régule l'horloge biologique dans chacune des cellules de l'organisme (tiré de la référence 243 [copyleft]).

### *Études comportementales circadiennes chez l'animal*

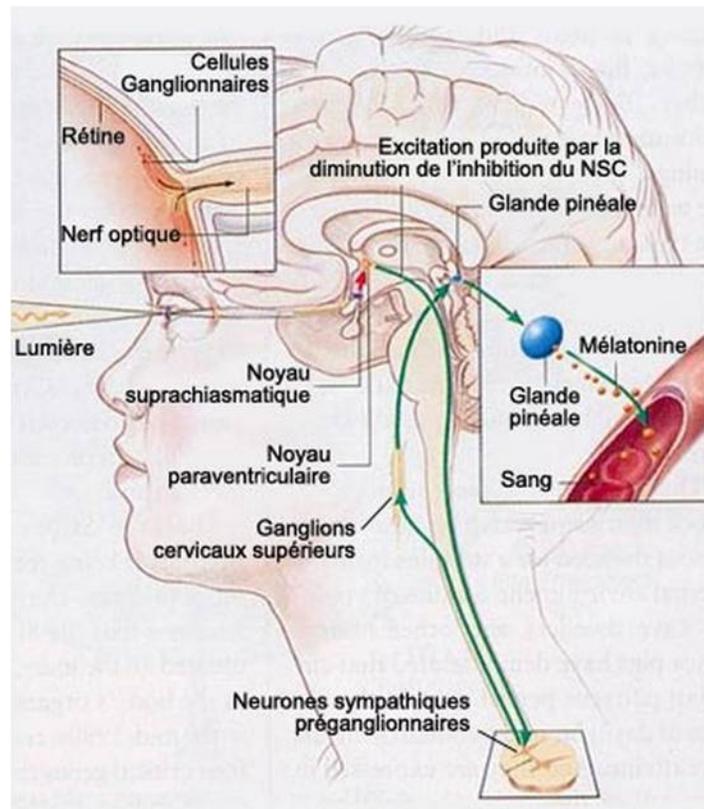
L'une des approches utilisées pour l'étude de la régulation de l'horloge biologique interne est la mesure de l'activité locomotrice circadienne chez les souris. Pour ce faire, les animaux sont placés individuellement dans des cages munies d'une roue dans une salle avec un cycle lumière/noirceur précis. Le protocole d'illumination standard comporte 12 heures de lumière et 12 heures de noirceur, mais leur durée peut varier selon les objectifs et hypothèses de l'expérience. Pour étudier l'horloge biologique interne des souris, celles-ci sont placées sous noirceur constante afin d'évaluer la durée de leur période intrinsèque. Puisque les souris sont des animaux nocturnes, elles sont éveillées et utilisent leur roue durant la nuit subjective, tandis qu'elles dorment durant la majeure partie de la journée subjective. Le temps passé par les souris à courir dans leur roue est enregistré afin de créer un actogramme qui permet d'analyser leur période d'activité locomotrice circadienne ainsi que d'autres paramètres, comme le niveau d'activité locomotrice. À titre d'exemple de l'utilisation de cette méthode, il a été rapporté que des souris mutantes pour le gène *Clock* perdent leur rythmicité

circadienne lorsqu'elles sont placées sous noirceur constante, ce qui démontre que *Clock* est une composante essentielle à l'horloge biologique [246].

### **La voie rétino-hypothalamique**

Les cônes et les bâtonnets ont pour principale fonction d'assurer la photoréception *traditionnelle*, mais ils ne sont pas essentiels à la régulation des rythmes circadiens. En fait, les rythmes circadiens demeurent préservés chez des modèles animaux atteints de dégénérescence du segment externe de la rétine [247, 248] ainsi que chez des personnes avec une perte de vision fonctionnelle [249, 250]. L'opsine responsable de ce phénomène est la mélanopsine qui est présente dans une petite fraction des cellules ganglionnaires de la rétine que l'on appelle les cellules ganglionnaires intrinsèquement photosensibles (ipRGC) qui sont dépolarisées par la lumière. Les axones de ces cellules sont la principale composante de la voie rétino-hypothalamique et projettent vers les NSCs [251].

Tel que mentionné précédemment, le NSC est le *pacemaker* de l'horloge biologique qui régule les fonctions homéostatiques. De nombreuses structures centrales sont sous l'influence du NSC comme le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus dont les neurones projettent sur les cellules sympathiques préganglionnaires de la zone intermedio-latérale de la moelle thoracique. Ces cellules modulent l'excitabilité des neurones des ganglions cervicaux supérieurs dont les axones projettent sur la glande pinéale tel que représenté dans la figure 1.10. Cette glande, aussi appelée épiphyse, est le site de synthèse de la mélatonine, dont la sérotonine est le précurseur [252].



**Figure 1.10.** Schéma résumant les cibles influencées par les ipRGC suite à la stimulation lumineuse jusqu'à la sécrétion de la mélatonine par la glande pinéale (tiré de la référence 243 [copyleft]).

## La mélatonine

Aussi appelée hormone du sommeil, la mélatonine est libérée dans le sang afin de transmettre l'information circadienne provenant des NSCs vers les organes qui présentent des rythmes physiologiques [253]. La mélatonine se distingue par son cycle de sécrétion qui s'avère un marqueur de l'horloge biologique et qui agit comme indicateur quotidien de la période d'obscurité pour l'organisme [41]. En fait, chez les organismes diurnes, la mélatonine commence à être sécrétée vers 20 h et sa concentration augmente graduellement jusqu'aux environs de 3 h où elle atteint son maximum pour ensuite diminuer et atteindre son niveau basal diurne vers 8 h [254]. Cela dit, la mélatonine n'est présente dans l'organisme que durant la nuit et sa sécrétion est inhibée durant le jour ainsi que par une exposition à la lumière [111]. De plus, il est connu que la production de cette hormone est régulée par un rythme circadien généré par l'horloge biologique centrale, donc, même en condition de noirceur constante, la sécrétion de mélatonine est inhibée durant le jour subjectif [255].

En plus d'être principalement sécrétée par la glande pinéale, la mélatonine est aussi produite par différentes structures oculaires comme le cristallin [256], l'iris, le corps ciliaire [257], les glandes lacrymales [258] ainsi que les photorécepteurs de la rétine [259]. De ce fait, il a été suggéré que l'œil comporte aussi sa propre horloge biologique. En effet, il a été démontré que, dans la rétine, la mélatonine et la dopamine agissent comme antagonistes mutuels [260]. Ce phénomène serait d'ailleurs à l'origine de l'alternance entre la vision de jour et la vision de nuit [261]. À vrai dire, durant le jour, il y a une augmentation de la production de dopamine dans la rétine [229], ce qui favoriserait le système des cônes pour la vision de jour [262]. En fait, la dopamine découple les jonctions électriques entre les photorécepteurs et les cellules horizontales, ce qui réduit les champs récepteurs [229]. Durant la nuit, l'élévation de la sécrétion de mélatonine inhibe la dopamine rétinienne, ce qui stimule le couplage des jonctions électriques entre les cellules horizontales et augmente ainsi les champs récepteurs [263]. Cela favoriserait le système des bâtonnets pour la vision de nuit. D'ailleurs, de nombreuses études ont démontré la présence de changements circadiens dans les fonctions rétinienne mesurées par l'ERG [264-269] et il a été suggéré que celles-ci pourraient être le résultat de l'antagonisme mélatonine/dopamine dans la rétine.

### **1.3. Mesure des fonctions rétinienne par l'électrorétinogramme**

Il existe plusieurs techniques électrophysiologiques qui permettent de mesurer les fonctions de certaines structures ou types de cellules qui composent le système visuel. Parmi celles-ci, on retrouve, entre autres, le pattern électrorétinogramme (pERG) qui permet l'évaluation des fonctions des cellules ganglionnaires [270], l'ERG multifocal qui enregistre la réponse locale des cônes de la rétine centrale [271] et l'électrooculogramme (EOG) qui mesure le potentiel de repos de la rétine et l'interaction entre l'épithélium pigmentaire et les photorécepteurs suite à un changement d'état d'adaptation lumineuse de la rétine [272]. Or, cette thèse se concentre sur la technique d'ERG au flash puisque, selon la littérature, les données recueillies avec cette technique semblent les mieux étayées, les plus reproductibles et sont représentées par des échantillons de grande taille. Enfin, l'utilisation de l'ERG mesure plusieurs types de cellules de la rétine, ce qui permet une analyse plus globale des fonctions rétinienne.

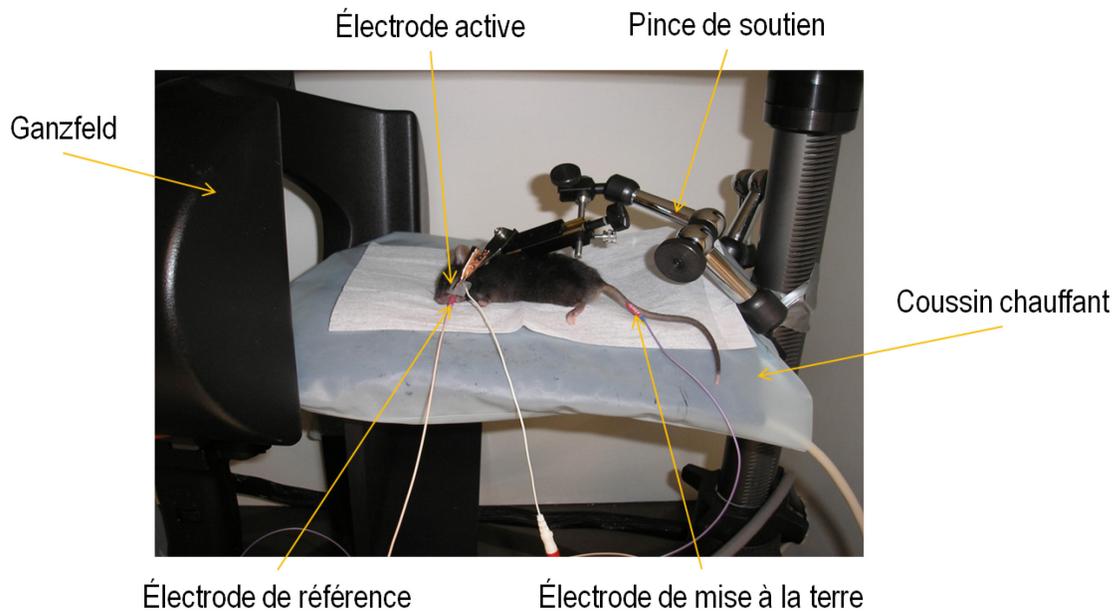
### 1.3.1. L'électrorétinogramme (ERG)

L'électrorétinogramme (ERG) a pour principale fonction de mesurer objectivement le biopotentiel électrique généré par la rétine suite à une stimulation lumineuse. Plus précisément, l'ERG mesure le potentiel extracellulaire qui résulte des changements de courants qui parcourent les cellules rétinienne et qui sont essentiels pour la signalisation neuronale. Le principal avantage de cette technique est qu'elle est non invasive et que le biopotentiel peut être mesuré à même la surface de l'oeil [204]. L'ERG peut être enregistré sur plusieurs espèces, dont l'humain et la souris. Cette section méthodologique se concentre particulièrement sur l'ERG de la souris puisqu'il s'agit de l'espèce la plus utilisée pour la réalisation de cette thèse.

#### L'enregistrement de l'ERG

Pour enregistrer un ERG sur la souris, l'animal doit être anesthésié. Pour ce faire, un mélange de kétamine (80 mg/kg) et xylazine (10 mg/kg) est injecté intrapéritonéalement et la température corporelle est maintenue entre 36 °C et 38 °C grâce à un coussin chauffant tout au long de l'enregistrement. La pupille est dilatée avec une goutte de tropicamide 1 % et la cornée est anesthésiée avec une goutte de proparacaine hydrochloride 0,5 % [273]. Par la suite, plusieurs électrodes sont mises en place sur l'animal. Premièrement, il y a l'électrode dite « active » qui capte le signal électrique de la rétine. Dans le cadre de cette thèse, cette électrode est de type Dawson-Trick-Litzkow (DTL) et est constituée de fibres de nylon imprégnées d'argent [274]. Afin que celle-ci épouse bien la forme de l'œil de l'animal, elle est placée en forme de loupe et déposée sur la surface de l'œil. Selon le montage expérimental utilisé, il peut être possible d'enregistrer un ERG sur les deux yeux, mais dans le cas de cette thèse, seulement l'ERG de l'œil gauche a été enregistré. Deuxièmement, il y a l'électrode de référence de type « *grass gold cup electrode* » qui est en forme de coupole et qui est placée dans la bouche de l'animal. Enfin, il y a l'électrode de mise à la terre qui est une aiguille insérée dans la queue de la souris [273]. L'ERG mesure la différence de potentiel entre l'électrode de référence et l'électrode active. Le signal est ensuite amplifié et filtré selon une bande passante de 0,15 à 300 hertz [204]. Les flashes lumineux sont délivrés par un dôme appelé Ganzfeld qui est placé presque au dessus de l'animal afin d'assurer une stimulation optimale. La figure

1.11 représente le montage expérimental utilisé dans le cadre des expériences qui figurent dans cette thèse.

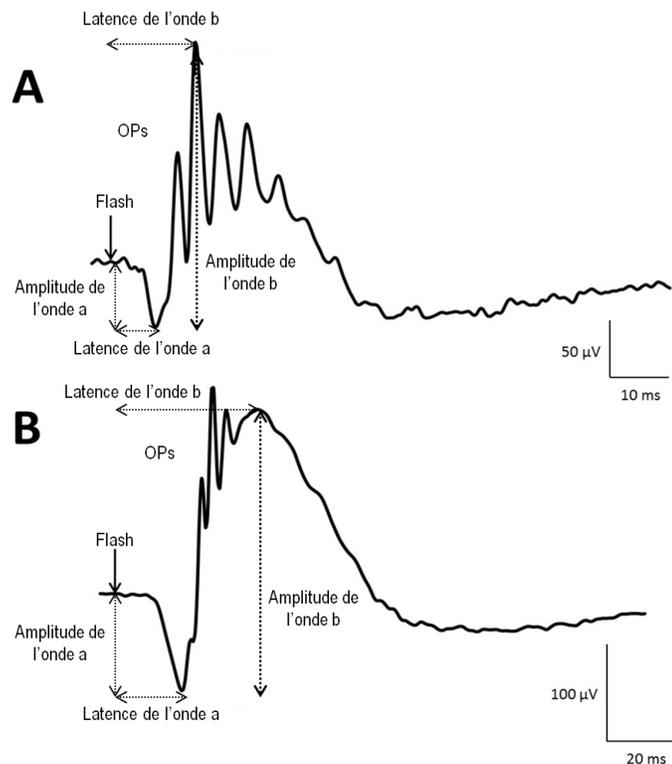


**Figure 1.11.** Montage expérimental pour l'enregistrement de l'ERG chez la souris. Pour le besoin de la photo, le Ganzfeld a été reculé, mais il est placé presque au-dessus de l'animal lors d'un enregistrement réel.

Le protocole d'ERG débute par une adaptation à la noirceur qui dure toute la nuit précédant l'enregistrement. L'animal est ensuite préparé pour l'ERG sous une faible lumière rouge. La séance d'enregistrement débute par l'ERG scotopique qui mesure la fonction du système des bâtonnets. Pour ce faire, des flashes de 10 intensités lumineuses allant de  $-3,62$  à  $0,46 \log \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  sont délivrés grâce au Ganzfeld. Des intervalles de 15 secondes (pour les 4 premières intensités) ou de 30 secondes (pour les 6 dernières intensités) entrecoupent chacun des stimuli lumineux. Par la suite, l'animal est adapté à la lumière pendant 10 minutes avec une intensité de  $30 \text{ cd}/\text{m}^2$  afin de procéder à l'enregistrement de l'ERG photopique qui mesure la fonction du système des cônes. Cette fois, des flashes de 9 intensités lumineuses allant de  $-0,81$  à  $2,86 \log \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  stimulent la rétine avec des intervalles de 15 secondes (pour les 3 premières intensités) et de 30 secondes (pour les 6 dernières intensités) entre chacun des flashes. Dans les deux conditions d'enregistrement, soit photopique et scotopique, au moins quatre réponses ont été moyennées pour chacune des intensités lumineuses utilisées afin de minimiser le bruit de fond et d'assurer la reproductibilité de la réponse [273].

## Les paramètres de l'ERG

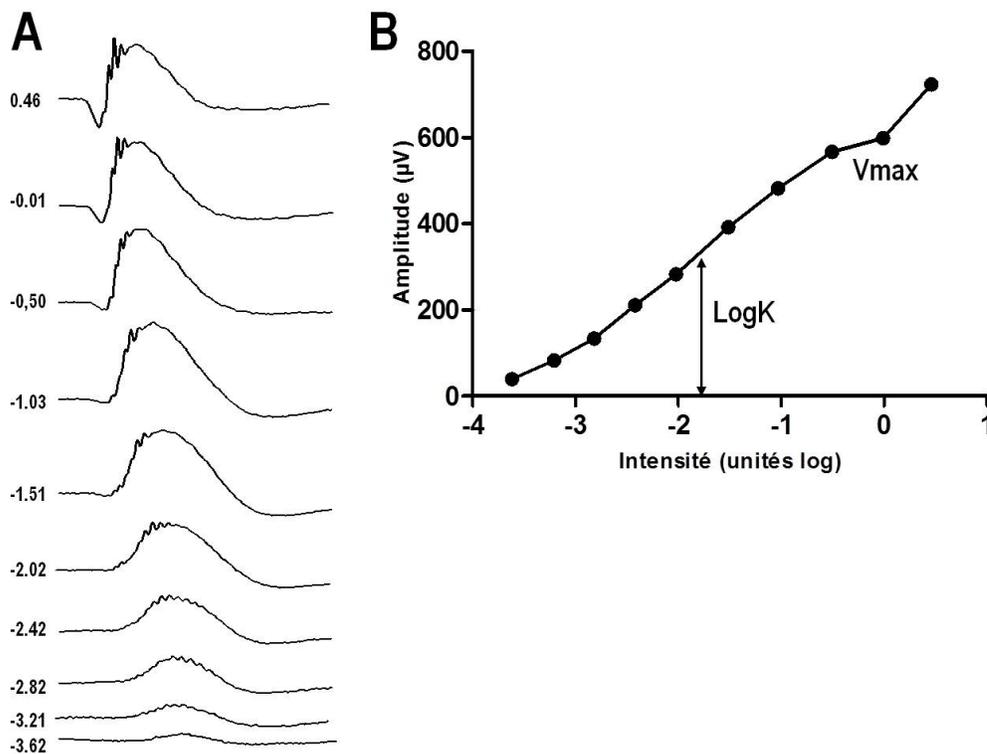
Sur un tracé d'ERG, on retrouve deux principales composantes. La première est une onde négative appelée onde a qui est générée par l'hyperpolarisation des photorécepteurs cônes et/ou bâtonnets selon la luminance utilisée pour stimuler la rétine. L'onde a est suivie d'une onde positive appelée onde b qui représente principalement la dépolarisation des cellules bipolaires ON avec une contribution des cellules de Müller [275, 276]. Sur la partie ascendante de l'onde b, on peut observer les potentiels oscillatoires (OPs) qui sont une série d'ondulations de haute fréquence, mais leur origine exacte demeure encore mal connue bien qu'ils pourraient être générés par les cellules amacrines et les cellules bipolaires [277]. La figure 1.12 montre un exemple de tracé d'ERG chez les souris en condition photopique et scotopique. Par convention, l'amplitude ( $\mu\text{V}$ ) de l'onde a est mesurée à partir du zéro (qui réfère au début du flash) jusqu'à son point le plus bas, tandis que l'amplitude de l'onde b se mesure à partir de l'amplitude maximale de l'onde a jusqu'au point le plus élevé de l'onde b. La latence des ondes mesurée en millisecondes (ms) représente le temps nécessaire pour que les ondes atteignent leur amplitude maximale à partir du zéro.



**Figure 1.12.** Exemple d'un tracé d'ERG de souris en condition photopique (A) et scotopique (B) ainsi que la façon dont les principaux paramètres sont mesurés.

## Analyse de l'ERG

L'utilisation de plusieurs intensités lumineuses croissantes permet d'analyser la dynamique de la réponse de l'ERG, laquelle augmente proportionnellement avec l'intensité lumineuse (figure 1.13.A). Afin d'analyser cette dynamique, on peut tracer une courbe intensité/réponse pour chacun des paramètres où les intensités lumineuses sont représentées sur l'axe des X et les valeurs des paramètres de l'ERG sur l'axe des Y [278]. Dans le cas de l'onde b, une courbe sigmoïdale peut être générée avec les valeurs obtenues à chacune des intensités et deux autres paramètres peuvent y être dérivés, soit le  $V_{max}$  et le  $\log K$ . Le  $V_{max}$  représente l'amplitude où il y a saturation du système. Dans le cas du système des bâtonnets, le  $V_{max}$  se traduit par la formation d'un premier plateau, tel que représenté dans la figure 1.13.B, suivi d'un second plateau formé suite à l'intrusion des cônes avec l'accroissement de l'intensité lumineuse. Pour sa part, le  $\log K$  représente l'amplitude nécessaire pour atteindre la moitié du  $V_{max}$  et réfère ainsi à la sensibilité rétinienne [279].



**Figure 1.13.** Représentation d'un tracé d'ERG scotopique chez la souris à chacune des intensités lumineuses utilisées pour générer la courbe intensité/réponse (A). Courbe intensité/réponse de l'onde b avec la représentation des paramètres du  $V_{max}$  et du  $\log K$  (B).

Au départ, l'ERG a été développé pour être utilisé particulièrement dans le domaine de l'ophtalmologie pour investiguer l'origine d'une perte de vision causée par une maladie ou un traumatisme. Or, des études ont démontré la présence d'anomalies de l'ERG chez des patients atteints de maladies psychiatriques [38], ce qui ouvre les portes à l'utilisation de l'ERG dans un tout nouveau domaine.

### **1.3.2. Anomalies de l'ERG chez les patients atteints de maladies psychiatriques**

Depuis plusieurs décennies, de nombreuses équipes de recherche ont décrit des anomalies de la fonction rétinienne mesurées par l'ERG chez des patients atteints de différentes maladies psychiatriques comme le trouble affectif saisonnier, la schizophrénie, l'autisme et la dépendance aux drogues [38]. Ces anomalies pourraient désormais servir de biomarqueurs pour ces troubles et permettre d'investiguer et de mieux comprendre ces maladies du cerveau. Cette section fait un résumé des anomalies qui ont été observées chez les patients atteints de maladies psychiatriques et discute des facteurs biologiques et méthodologiques qui doivent être pris en considération afin de valider ces résultats et d'utiliser les anomalies de l'ERG comme biomarqueurs de ces maladies.

#### **Le trouble affectif saisonnier**

Une première étude analysant la réponse mixte des cônes et des bâtonnets avec un protocole d'ERG utilisant une adaptation à la noirceur suivie d'une stimulation avec des flashes blancs de forte intensité a démontré la présence d'une diminution de l'amplitude de l'onde b à l'automne et à l'hiver chez les patients avec TAS [126]. Cependant, en analysant séparément les hommes et les femmes, des résultats contradictoires ont été constatés. En fait, chez les femmes atteintes du TAS, une diminution de l'amplitude de l'onde b a été observée par rapport aux femmes du groupe contrôle, alors que chez les hommes, une augmentation de l'amplitude de l'onde b a été rapportée chez ceux atteints du TAS en comparaison aux hommes du groupe contrôle. Une diminution de la latence de l'onde b a aussi été observée chez les hommes avec TAS par rapport aux hommes du groupe contrôle, mais cette anomalie n'a pas été retrouvée chez les femmes. Selon les auteurs de cette étude, ces différences pourraient être expliquées par le petit nombre de sujets

retrouvés dans chacun des groupes ainsi que par la grande variabilité observée entre les résultats individuels des participants, particulièrement dans le groupe des hommes.

La première expérimentation à comparer la fonction rétinienne selon les saisons a été effectuée chez des patients atteints du TAS-S. Avec un protocole conçu pour mesurer la sensibilité du système des bâtonnets grâce à une courbe intensité/réponse, une variation saisonnière de l'ERG a été observée chez les personnes atteintes du TAS-S, mais pas chez les personnes du groupe contrôle [127]. En fait, une translation de la courbe intensité/réponse vers la droite a été démontrée chez les personnes atteintes du TAS-S par rapport au groupe contrôle, ce qui représente une diminution de la sensibilité des bâtonnets en hiver, soit durant la phase dépressive. Cette anomalie de l'ERG a ensuite été observée chez des patients atteints du TAS dans une étude subséquente [128]. Dans cette dernière étude, une normalisation de la sensibilité des bâtonnets a été observée durant l'été chez les patients avec TAS, alors que, encore une fois, aucune variation saisonnière des paramètres de l'ERG n'a été rapportée chez les personnes du groupe contrôle. De plus, la sévérité des symptômes dépressifs a été corrélée avec la magnitude des variations saisonnières de la sensibilité des bâtonnets. Grâce à une autre méthode utilisée pour mesurer la sensibilité rétinienne, soit le critère de seuil d'intensité ( $T_{50\mu V}$ ) qui réfère à l'intensité nécessaire pour atteindre une amplitude de l'onde b de  $50 \mu V$ , une autre observation supportant une diminution de la sensibilité des bâtonnets chez les patients avec TAS a été rapportée [91]. En fait, il a été démontré que le groupe des patients avec TAS présente une diminution de la valeur du  $T_{50\mu V}$  par rapport au groupe contrôle, et ce, sans distinction du sexe. Aussi, dans cette étude, 40 % des patients avec TAS ont pu être différenciés du groupe contrôle en analysant seulement leur valeur de  $T_{50\mu V}$  qui se trouvait à plus de 1 écart-type de la valeur moyenne du  $T_{50\mu V}$  du groupe contrôle.

Le système photopique s'avère lui aussi affecté durant la phase dépressive chez les patients avec TAS [128]. En fait, une diminution de 13 % du  $V_{max}$  de l'onde b des cônes a été observée chez les patients avec TAS durant l'hiver, mais aucune différence n'a été rapportée durant l'été, soit durant la phase de rémission, et ce, par rapport au groupe contrôle. De plus, un prolongement de la latence de l'onde b des cônes de 7 % par rapport au groupe contrôle a aussi été démontré chez les patients avec TAS, mais seulement durant la période hivernale avec une normalisation de cette valeur durant l'été.

La luminothérapie est reconnue pour contrer les symptômes dépressifs du TAS et une première évidence thérapeutique biologique de ce traitement a été démontrée par l'ERG [128]. En fait, il a été rapporté que, suite à un traitement de luminothérapie de 4 semaines, le Vmax des cônes des patients avec TAS se normalise par rapport au groupe contrôle. En ce qui concerne le système scotopique, il a été observé que ce traitement mène à une normalisation de la sensibilité rétinienne à une valeur semblable à celle rapportée dans le groupe contrôle ainsi qu'à un prolongement de la latence de l'onde b mesurée au Vmax.

Somme toute, ces résultats suggèrent que trois anomalies de l'ERG sont présentes chez les patients avec TAS, soit une diminution de la sensibilité des bâtonnets, une augmentation de la latence des cônes ainsi qu'une baisse de l'amplitude du Vmax des cônes. La majorité des patients avec TAS peuvent être distingués des sujets sains grâce à la mesure de leur sensibilité rétinienne des bâtonnets en hiver. Cette anomalie du système des bâtonnets, de même que la diminution du Vmax des cônes, représentent des marqueurs d'état de la maladie puisqu'elles sont présentes seulement durant la phase dépressive et qu'elles peuvent être normalisées avec un traitement approprié.

### **La schizophrénie et le trouble bipolaire**

Tel que mentionné précédemment, selon des études récentes sur les facteurs de risque génétiques et les endophénotypes des maladies psychiatriques, de plus en plus d'observations qui supportent que la schizophrénie et le trouble bipolaire partagent plusieurs mécanismes moléculaires ont été rapportées, et ce, même si des anomalies neurobiologiques et cognitives distinctes représentent des caractéristiques spécifiques à chacune de ces maladies [184-187]. D'ailleurs, les expérimentations utilisant l'ERG pour étudier la schizophrénie et le trouble bipolaire ont démontré des phénotypes différents qui permettent de distinguer ces maladies.

Une première étude a rapporté une baisse de l'amplitude de l'onde b des cônes durant l'adaptation à la lumière chez des patients atteints de schizophrénie non médicamenteux en comparaison avec le groupe contrôle [280]. Cependant, six de ces neuf patients avaient déjà pratiqué de la « guérison solaire » qui consiste à fixer le soleil, ce qui pourrait avoir influencé les résultats

compte tenu de la phototoxicité rétinienne reliée à cette pratique. Une deuxième étude avec, encore une fois, un petit nombre de sujets (n = 9), a rapporté que l'amplitude de l'onde a des cônes ainsi que l'amplitude de l'onde b des bâtonnets étaient réduites chez des patients atteints de schizophrénie médicamenteux en comparaison avec le groupe contrôle [281]. Il importe de spécifier qu'aucun effet significatif de la dose de la médication (en équivalence-chlorpromazine) n'a été observé dans cette expérimentation. De plus, cette étude relate que seulement une diminution de l'amplitude de l'onde a des cônes a été observée chez le seul patient schizophrène non médicamenteux depuis les six mois précédant l'enregistrement de l'ERG.

Dans une autre étude où seulement l'ERG des cônes a été évalué chez les patients avec schizophrénie (n = 26) et trouble bipolaire (n = 17), une diminution de l'amplitude de l'onde a a été observée chez les patients avec schizophrénie, mais pas chez ceux atteints du trouble bipolaire ni chez les sujets contrôles [202]. Cette dysfonction de l'ERG chez les patients avec schizophrénie a été observée seulement durant la phase aiguë de la maladie et non plus suite à un suivi clinique de huit semaines. De plus, l'amplitude de l'onde a a été négativement corrélée avec les symptômes positifs (selon le score du *Positive and Negative Syndrome Scale* (PANSS)) chez ces patients schizophrènes. Encore une fois, même si ces patients étaient médicamenteux, aucune des mesures d'ERG n'a été corrélée avec la dose d'antipsychotiques (en équivalence-chlorpromazine). Finalement, une autre étude [282] n'a rapporté aucune anomalie de la fonction rétinienne chez 12 patients avec schizophrénie qui n'avaient pas pris de médication pendant les deux semaines précédant l'ERG (sans test statistique à l'appui). Dans cette étude, il a été observé que les potentiels oscillatoires (OPs) étaient normaux chez les patients avec schizophrénie tant à l'ERG adapté à la lumière qu'à celui adapté à la noirceur. Par contre, les auteurs de cette étude sont demeurés prudents dans l'interprétation de leurs résultats relatant une grande variabilité entre les sujets dans la réponse à l'ERG.

Pour la première fois, il a été démontré que des anomalies de l'ERG peuvent être présentes avant même l'apparition de la maladie chez des enfants à haut risque génétique (HR) de développer la schizophrénie ou le trouble bipolaire [283]. En fait, un ERG a été mesuré chez 29 enfants non médicamenteux et non atteints par ces maladies qui descendent de familles multi-générationnelles grandement affectées par l'une ou l'autre de ces maladies. Dans cette étude, il a été rapporté que, en

comparaison avec le groupe contrôle, les HRs présentent une diminution marquée de 23 % de l'amplitude de l'onde b des bâtonnets et des tendances pour une diminution de l'amplitude de l'onde a des cônes ainsi que pour un prolongement de la latence de l'onde b des bâtonnets. Il est d'intérêt de spécifier que ces anomalies de l'ERG ont été retrouvées chez les HRs indépendamment du diagnostic des parents, soit la schizophrénie ou le trouble bipolaire, ce qui porte les auteurs de cette étude à suggérer la présence d'une origine neurodéveloppementale commune à ces troubles psychiatriques.

En somme, les résultats de ces études semblent montrer certaines inconsistances. En effet, une étude [202] a démontré la présence d'une diminution de l'onde a des cônes seulement durant la phase aiguë (non stabilisée) de la schizophrénie, tandis qu'une autre [281] a rapporté cette même diminution chez les patients stabilisés, alors qu'une dernière étude [282] n'a observé aucune anomalie de l'ERG chez les patients avec schizophrénie lorsque ceux-ci ne prennent pas de médication depuis deux semaines. Ces différences peuvent être dues aux petits nombres (9 à 26) de sujets retrouvés dans les groupes de ces études. Somme toute, l'observation d'une baisse de l'amplitude de l'onde a des cônes revient dans deux études différentes, suggérant ainsi un déficit au niveau des photorécepteurs chez les patients avec schizophrénie. Il est intéressant de constater que la seule étude ayant mesuré l'onde b des bâtonnets chez les patients atteints de schizophrénie a aussi rapporté la présence d'une diminution de l'amplitude de l'onde b de l'ERG [281], comme celle qui a été observée chez les HRs. De plus, les patients schizophrènes présentent des anomalies de l'ERG qui sont complètement différentes de celles retrouvées chez les patients avec TAS. Aussi, à ce moment, il n'y a qu'une seule étude qui a évalué l'ERG des cônes seulement chez les patients avec trouble bipolaire [202] et elle n'a rapporté aucune anomalie chez cette population. Cela dit, de plus amples études avec des protocoles d'enregistrement différents, incluant la mesure de l'ERG des bâtonnets, sont de mise pour confirmer la présence ou non d'anomalies de l'ERG chez les patients atteints de trouble bipolaire ou de schizophrénie.

### **Les troubles du spectre autistique**

Les troubles du spectre autistique (TSA) sont caractérisés par un groupe de maladies neurodéveloppementales marquées par des déficiences dans les capacités communicationnelles et

les interactions sociales ainsi que par des intérêts restreints, répétitifs et stéréotypés [284]. À ce jour, quelques études seulement ont été effectuées pour investiguer les anomalies de l'ERG chez les enfants atteints de TSA. La première d'entre elles [285] a rapporté une réduction de l'amplitude de l'onde b suite à une stimulation scotopique par une faible lumière bleue ou rouge chez un patient autistique âgé de 10 ans. Ce résultat a été reproduit par une autre équipe de recherche, et ce, sur le même patient. Par la suite, l'expérimentation a été étendue sur une population de patients autistiques chez qui une diminution de l'amplitude de l'onde b des bâtonnets a été observée chez 48 % (13/27) des sujets en comparaison au groupe contrôle. Dans une autre étude pilote [286], il a été démontré que deux des quatre patients autistes étudiés présentaient des anomalies de l'ERG des bâtonnets. De plus, ce résultat a aussi été observé chez deux des quatre membres de la famille ainsi que chez deux pères de patients. Cependant, comme le citent les auteurs de cette étude, l'échantillon de sujets pour cette expérimentation était beaucoup trop petit pour proposer et confirmer un mode de transmission génétique de ce déficit de l'ERG.

Bref, la présence d'une diminution de l'amplitude de l'onde b des bâtonnets chez un patient autiste et les membres de sa famille [285, 286], de même que chez les enfants à haut risque génétique de développer la schizophrénie ou le trouble bipolaire [283], ainsi que chez les patients atteints de schizophrénie [281] suggère que cette anomalie pourrait représenter un biomarqueur de risque pour certaines maladies psychiatriques distinctes.

### **La dépendance aux drogues**

La dépendance aux drogues et à l'alcool est fréquemment retrouvée chez les patients atteints de maladies psychiatriques [287]. L'abus de drogues est caractérisé par des symptômes oculaires comme la mydriase pupillaire, des hallucinations visuelles, de la diplopie, de l'excitation nerveuse et des problèmes d'accommodation visuelle [288]. Bien qu'elle soit fortement impliquée dans le système de récompense et de dépendance, la dopamine s'avère la catécholamine la plus exprimée dans la rétine [229, 289]. Dans le cas de la dépendance à la cocaïne, il a été démontré qu'il y a une inhibition de la recapture de la dopamine dans le neurone présynaptique, particulièrement dans le système de récompense du cerveau ainsi que dans le noyau accumbens [290], ce qui augmente l'effet de renforcement de cette drogue.

Une étude sur les sujets dépendants à la cocaïne en sevrage a démontré que 50 % des sujets dépendants présentent une diminution de l'amplitude de l'onde b des cônes bleus [291-293]. En fait, cette expérimentation a révélé que la moyenne des valeurs de l'amplitude de l'onde b des cônes bleus chez les patients dépendants est diminuée de moitié par rapport à la moyenne des valeurs du groupe contrôle. De plus, cette étude a rapporté que les patients dépendants avec un ERG plus bas présentent une plus grande envie de consommer de la cocaïne [294, 295]. Aussi, il a été démontré que, chez ce groupe de patients dépendants, un traitement avec de la rispéridone mène à une diminution significative du score total obtenu dans le « *Cocaine Craving Questionnaire* » sans toutefois provoquer un changement ou une normalisation de l'ERG [296]. Également, dans une série d'études longitudinales [291-293], l'ERG des patients dépendants à la cocaïne a été mesuré à toutes les deux semaines sur une durée totale de huit semaines et aucune différence n'a été observée au cours de cette période, suggérant ainsi que la réduction de l'amplitude de la réponse des cônes bleus demeure stable, et ce, même durant l'abstinence. Les auteurs de ces études ont aussi rapporté que l'amplitude de l'onde b des cônes bleus est presque doublée chez des participants exclus de l'expérimentation suite à la découverte de la présence de cocaïne dans leur urine. Enfin, la réduction de l'amplitude de l'onde b des cônes bleus a été significativement corrélée avec la concentration cérébrospinale de HVA qui est un métabolite de la dopamine [297]. En fait, la concentration de HVA était plus basse chez les patients dépendants qui présentaient une amplitude de l'onde b des cônes bleus plus basse. Somme toute, ces observations suggèrent que l'ERG des cônes bleus pourrait servir de biomarqueur potentiel pour l'étude des fonctions dopaminergiques ainsi qu'un outil permettant de différencier un sous-groupe de patients dépendants à la cocaïne présentant des signes physiologiques d'envie pour cette drogue [298].

Par ailleurs, dans une autre étude, des altérations non spécifiques du tracé d'ERG des cônes (acquis avec un fond lumineux qui ne sature pas le système des bâtonnets) et des bâtonnets ont été observées chez des sujets qui ont fait usage d'héroïne, de cannabis ou de cocaïne [299]. Malheureusement, puisque ces sujets consommaient deux ou plusieurs de ces drogues simultanément, aucune corrélation entre les résultats de l'ERG et le type de drogue utilisé ou la durée de la dépendance n'a pu être confirmée. Les auteurs de cette étude ont aussi relaté la piètre qualité des tracés d'ERG causée par le manque de coopération de la part des sujets participant à l'étude ainsi que par la présence élevée d'artéfacts dus aux mouvements excessifs des paupières. En tenant

compte de tous ces résultats et dépendamment du protocole d'enregistrement de l'ERG utilisé, un déficit au niveau du système des cônes bleus pourrait s'avérer un biomarqueur de la dépendance aux drogues, mais de plus amples études sur le sujet sont de mise pour faire la lumière sur cette signature biologique.

### **Considérations méthodologiques**

Au moment de l'enregistrement de l'ERG, plusieurs facteurs doivent être pris en considération. Par exemple, de nombreuses études suggèrent que les agents pharmacologiques peuvent moduler les paramètres de l'ERG [230-235, 242, 300-303]. Par exemple, il a été démontré que la déplétion de sérotonine par une injection intravitreuse de 5,7-dihydroxytryptamine chez le pigeon provoque une augmentation significative de l'amplitude de l'onde b des cônes et des bâtonnets [242]. Également, une autre étude sur le lapin a révélé que les paramètres de l'ERG peuvent être influencés par les drogues d'une manière dose-dépendante. En fait, il a été rapporté que l'amplitude de l'onde b de la réponse mixte des cônes et des bâtonnets est diminuée suite à l'injection intravitreuse de A77636 qui est un agoniste des récepteurs dopaminergiques de type D1 à une dose de 1 mg ou 0,5 mg, sans pour autant être changée à une dose de 0,2 mg [232]. De plus, dans des yeux perfusés de chat, il a été démontré que l'amplitude maximale de l'onde b est augmentée suite à des injections d'une petite dose de fluphenazine, mais diminuée avec des plus grandes doses de cette même drogue [230]. Par ailleurs, chez l'humain, il a été observé que la prise orale d'agents pharmacologiques qui bloquent les récepteurs dopaminergiques avec différentes affinités pour les récepteurs D1 ou D2, comme la chlorpromazine, la fluphenazine et la métoclopramide à différentes doses, provoque des effets divers sur les paramètres de l'ERG [233]. Plusieurs autres études ont aussi démontré que l'halopéridol, un antipsychotique atypique fréquemment utilisé, provoque une diminution de l'amplitude de l'onde b des cônes et des bâtonnets [234, 235, 301].

Dans le domaine de la psychiatrie, considérant qu'il s'avère pratiquement impossible de recruter des patients qui ne sont pas médicamenteux et que les patients prennent habituellement plusieurs drogues pour leur thérapie, l'effet des agents pharmacologiques sur les fonctions rétiniennes doit être pris en compte sérieusement dans l'analyse des résultats. À ce moment, il est

difficile de décrire précisément l'effet d'une drogue spécifique sur l'ERG avec la littérature scientifique seulement puisque les études pharmacologiques utilisent une grande variété de protocoles d'enregistrement de l'ERG ainsi que des doses de drogues différentes. La variabilité des résultats de ces études pharmacologiques pourrait être expliquée par la sélectivité ainsi que par la dynamique temporelle de l'effet des agonistes et des antagonistes pharmacologiques sur l'ERG [304].

Un survol de la littérature scientifique sur ce sujet révèle aussi une grande variété dans les protocoles d'enregistrement utilisés pour décrire les anomalies de l'ERG chez les patients atteints de maladies psychiatriques. En outre, plusieurs études ont été effectuées il y a plus de 20 ans de cela et il ne faut pas négliger le fait que la technologie utilisée dans le domaine de l'électrophysiologie visuelle a grandement évolué depuis. Aussi, la plupart des protocoles utilisés ne comportent qu'un seul flash pour stimuler la rétine, ce qui ne permet pas d'analyser et de caractériser la dynamique de la réponse rétinienne comme c'est le cas avec une courbe intensité/réponse. Cela dit, dans le cas de certaines expérimentations, d'autres résultats auraient pu être observés si un protocole de stimulation lumineuse différent avait été utilisé.

Enfin, dans le cas des projets de recherche clinique, le recrutement des participants requiert aussi une attention particulière. Par exemple, il importe de jumeler les sujets à l'étude avec un participant du groupe contrôle de même âge, sexe et race puisque ces facteurs peuvent avoir un impact sur les paramètres de l'ERG et ainsi entraîner un biais dans l'analyse des résultats [305]. Cela va de soi puisque la réponse de l'ERG diminue avec l'âge [306] et les facteurs hormonaux ainsi que la longueur axiale de l'œil plus courte chez les femmes que chez les hommes sont reconnus pour influencer les paramètres de l'ERG [307-309]. De plus, le type d'électrode utilisé peut influencer la réponse de l'ERG. À titre d'exemple, l'électrode de type « *gold foil* » a le désavantage de se déplacer facilement lors d'un clignement des yeux. De plus, il est crucial de toujours vérifier si l'électrode de type DTL est bien placée tout au long de l'enregistrement de l'ERG lorsque celui-ci est positionné dans le sac conjonctival étant donné qu'un déplacement pourrait augmenter la variabilité entre les individus et ainsi influencer les valeurs des paramètres mesurés. Finalement, dans certaines études la pupille des participants n'était pas dilatée et il est bien connu que la taille pupillaire peut avoir un impact sur l'ERG puisque moins de lumière peut pénétrer dans l'œil si la dilatation pupillaire est diminuée [310], donc il importe de prendre en considération la taille de la pupille dans l'analyse des résultats.

## Résumé des observations et conclusion

Somme toute, ces observations indiquent que des changements dans les fonctions rétiniennes peuvent être associés à plusieurs maladies du cerveau. Ces anomalies de l'ERG pourraient éventuellement servir de marqueurs ou d'indicateurs biologiques de certaines maladies psychiatriques, particulièrement du trouble affectif saisonnier, de la schizophrénie, de l'autisme et de la dépendance aux drogues puisque la majorité des patients atteints de ces troubles peuvent être différenciés des sujets contrôles grâce à la mesure de leurs fonctions rétiniennes. Un résumé de ces anomalies est présenté dans la table 1.1. À la lumière de ces résultats, il est possible de conclure que : i) certaines anomalies de l'ERG peuvent être spécifiques à certaines maladies psychiatriques, tandis que d'autres de ces anomalies peuvent être partagées par plusieurs maladies, ii) certaines anomalies de l'ERG pourraient avoir une origine neurodéveloppementale puisqu'elles sont observées durant l'enfance chez des individus à haut risque génétique de développer un trouble psychiatrique et iii) certaines anomalies de l'ERG pourraient en partie ou totalement être causées par la prise de médication psychotrope.

**Table 1.1.** Résumé des anomalies de l'ERG observées chez les patients atteints de maladies psychiatriques (tiré et traduit de la référence 38)

Trouble psychiatrique	Type d'ERG	Anomalies de l'ERG observées chez les patients	Références
Trouble affectif saisonnier (TAS)	Cônes et bâtonnets	↓ amplitude de l'onde b en hiver (hommes et femmes mélangés)	126
		↓ latence de l'onde b en hiver (seulement chez les hommes)	
	Bâtonnets	↓ sensibilité des bâtonnets en hiver et normalisation en été (chez les TAS-S)	127
	Bâtonnets	↓ T50 $\mu$ V (sensibilité des bâtonnets) en hiver	91
	Cônes	↓ amplitude de l'onde b en hiver	128
		↑ latence de l'onde b en hiver	
Bâtonnets	↓ sensibilité des bâtonnets en hiver		
Schizophrénie	Cônes	↓ amplitude de l'onde b (patients non médicamenteux)	280
	Cônes	↓ amplitude de l'onde a (patients médicamenteux)	281
		↓ amplitude onde a seulement (1 patient non médicamenteux depuis 6 mois)	
	Bâtonnets	↓ amplitude des ondes a et b (patients médicamenteux)	
	Cônes	↓ amplitude de l'onde a durant la phase aiguë de la maladie et non après un suivi clinique de 8 semaines (patients médicamenteux stables)	202
Cônes et bâtonnets	Aucune anomalie (patients non médicamenteux pendant 2 semaines)	282	
Trouble bipolaire	Cônes	Aucune anomalie (patients médicamenteux)	202
Enfants à haut risque génétique (HR)	Bâtonnets	↓ amplitude de l'onde b au Vmax	283
		Tendance pour ↑ latence de l'onde b au Vmax	
	Cônes	Tendance pour ↓ de l'amplitude de l'onde a	
Troubles à spectre autistique	Scotopique faible lumière bleue et rouge	↓ amplitude de l'onde b chez 48 % des patients	285
Dépendance aux drogues	Cônes bleus	↓ amplitude de l'onde b chez 50 % des sujets	291-298

Bien entendu, de plus amples études avec un plus grand nombre de sujets et utilisant des protocoles standardisés sont de mise pour mieux caractériser et valider les anomalies de l'ERG chez les patients atteints de maladies psychiatriques. De plus, il serait intéressant d'étendre ces expérimentations sur des populations qui n'ont pas encore été étudiées comme les patients atteints de dépression majeure. En terminant, puisque l'enregistrement de l'ERG est relativement non invasif, de courte durée et peu coûteux, celui-ci pourrait éventuellement servir d'outil pour l'investigation des maladies du cerveau.

## 1.4. Objectifs et hypothèses de la recherche

### 1.4.1. Objectif général

Puisqu'avoir accès directement au cerveau s'avère un véritable obstacle pour l'étude des maladies psychiatriques, il importe de développer des approches alternatives pour investiguer les fonctions du cerveau indirectement. La découverte de nouveaux biomarqueurs en psychiatrie permettra éventuellement de procéder à un dépistage précoce des maladies, de compléter le diagnostic et de mieux orienter la thérapie. De plus, il importe que ces nouvelles techniques d'investigation soient non invasives et relativement rapides afin d'assurer leur efficacité d'utilisation.

Comme la rétine fait partie du système nerveux central, il est suggéré qu'elle peut refléter les désordres neurochimiques retrouvés dans les troubles mentaux et ainsi devenir un site d'investigation de premier choix en psychiatrie. De plus, les nombreuses anomalies de l'ERG qui ont déjà été observées chez plusieurs populations de patients atteints de maladies du cerveau [38] suggèrent que celles-ci pourraient représenter des biomarqueurs de ces maladies. Cependant, l'origine de ces anomalies demeure inconnue et l'objectif principal de cette thèse est d'explorer les origines moléculaires potentielles de ces déficits, et ce, grâce à des modèles animaux de maladies psychiatriques ou à un agent pharmacologique.

Afin d'investiguer les origines de ces anomalies, les molécules ciblées dans cette thèse sont la mélatonine, la dopamine centrale, la sérotonine centrale et GSK3. Ces molécules ont été choisies, car de nombreuses études suggèrent un rôle de celles-ci dans la pathophysiologie de certaines maladies mentales. À cet effet, les trois premières expérimentations présentées dans cette thèse sont des études d'ERG utilisant un agent pharmacologique ou des souris génétiquement modifiées. Plus précisément, les deux premières expérimentations ont pour objectif d'investiguer l'implication des amines sur l'ERG et de vérifier si l'expression de celles-ci pourrait être associée aux anomalies de l'ERG qui ont été observées dans les maladies psychiatriques, dont le TAS. Pour leur part, les deux dernières expérimentations se penchent sur GSK3, qui est un facteur de risque pour la schizophrénie et le trouble bipolaire, et ont pour objectif d'investiguer l'implication de cette protéine

dans la modulation de l'ERG et dans la régulation des rythmes circadiens pour ainsi faire un parallèle avec la voie dite « non visuelle » de la rétine.

#### **1.4.2. Étude de l'impact de la prise de mélatonine orale sur l'ERG**

L'une des hypothèses émises pour expliquer l'étiologie du TAS est un débalancement de la production de la mélatonine. À vrai dire, certaines études suggèrent des anomalies dans la période de sécrétion de cette hormone chez les sujets atteints du TAS [113, 311] et une expérimentation a montré une association entre l'inhibition de la mélatonine et la rémission des symptômes dépressifs chez ces personnes [114]. Puisque la mélatonine est sécrétée, entre autres, par la rétine, nous émettons l'hypothèse que cette hormone pourrait jouer un rôle dans les anomalies de l'ERG qui ont été observées dans le TAS. L'objectif principal de cette étude était d'évaluer l'effet sur l'ERG de la prise d'une forte dose orale de mélatonine sur les systèmes des cônes et des bâtonnets et, dans le cadre de cette thèse qui traite des maladies psychiatriques, cette expérimentation nous informe sur comment la mélatonine pourrait affecter l'ERG dans le TAS.

Pour ce faire, un ERG en condition photopique et scotopique a été mesuré sur des chiens dans deux conditions : i) sans la prise de mélatonine qui correspond à la condition contrôle et ii) suite à l'ingestion de 90 mg de mélatonine. L'hypothèse émise était que la prise d'une forte dose de mélatonine orale durant le jour, soit lorsqu'elle n'est physiologiquement pas présente dans l'organisme, favoriserait le système des bâtonnets et diminuerait ainsi l'amplitude des ondes a et b du système des cônes. Or, cette hypothèse a été confirmée partiellement puisque les résultats de cette étude démontrent la présence d'une diminution de l'amplitude des ondes a et b des cônes et aussi des bâtonnets suite à l'ingestion de mélatonine. En somme, cette étude suggère qu'une augmentation de la sécrétion de la mélatonine pourrait expliquer en partie les anomalies de l'ERG qui ont été observées chez les patients atteints du TAS, comme une diminution de l'amplitude de l'onde b des cônes, et que d'autres mécanismes entrent inévitablement en jeu dans les changements des fonctions rétinienne qui ont été rapportés dans ce trouble.

### 1.4.3. Étude de l'implication de la sérotonine et de la dopamine centrale sur l'ERG

Plusieurs études suggèrent l'implication d'une diminution de la sérotonine centrale [85, 86, 95-98] et d'une augmentation de la dopamine centrale [119, 158] dans les maladies psychiatriques, dont le TAS. Il est aussi connu que plusieurs drogues utilisées en psychiatrie agissent directement sur la signalisation par les récepteurs dopaminergiques de type D1R et D2R [52, 62]. De plus, de nombreuses études ont démontré que les composés qui exercent leur mode d'action via les récepteurs D1R et D2R influencent les paramètres de l'ERG [230-235, 242, 300-303]. Cela dit, l'objectif de cette étude était d'évaluer si les anomalies de l'ERG observées chez les patients atteints de maladies psychiatriques peuvent être associées à des changements sérotoninergiques ou dopaminergiques centraux ou à des altérations de la neurotransmission rétinienne de ces monoamines. L'hypothèse émise était qu'une diminution de la sérotonine centrale et une augmentation de la dopamine centrale provoqueraient des anomalies de l'ERG semblables à ce qui a été retrouvé chez les personnes atteintes du TAS, sachant qu'un déséquilibre au niveau de la neurotransmission de ces monoamines centrales pourrait être potentiellement impliqué dans cette maladie.

Pour ce faire, un ERG en condition photopique et scotopique a été mesuré sur quatre modèles animaux différents. En premier lieu, deux modèles animaux qui présentent une dysfonction monoaminergique centrale ont été utilisés. Premièrement, il y a les souris Tph2-KI qui ont une diminution de ~80 % de l'expression de la sérotonine centrale avec aucun changement dans le contenu tissulaire en sérotonine dans la rétine. Puisque le polymorphisme de Tph2 retrouvé chez ces souris est associé à la dépression [48], l'hypothèse de départ était que les souris Tph2-KI présenteraient les mêmes anomalies de l'ERG que celles qui ont été rapportées chez les personnes atteintes du TAS, c'est-à-dire une diminution de la sensibilité du système des bâtonnets, une augmentation de la latence de l'onde b des cônes et une diminution de l'amplitude de l'onde b des cônes. Or, cette étude démontre plutôt la présence seulement d'une augmentation de la latence de l'onde b des cônes chez les souris Tph2-KI, ce qui corrobore partiellement les résultats de l'ERG qui ont été observés chez les sujets atteints du TAS. Deuxièmement, il y a les souris DAT-KO qui présentent une augmentation (5X) de la concentration de la dopamine extracellulaire centrale avec aucun changement dans le contenu tissulaire en dopamine dans la rétine. D'après l'étude chez le

chat sur l'effet positif d'un antagoniste dopaminergique sur la sensibilité rétinienne [230], l'hypothèse émise au départ était que les souris DAT-KO présenteraient une diminution de la sensibilité des bâtonnets et cette hypothèse a été confirmée.

En second lieu, pour investiguer le rôle des récepteurs dopaminergiques D1R et D2R dans l'ERG, des souris knockout pour l'un ou l'autre de ces récepteurs ont été utilisées. Des études pharmacologiques ont démontré que des antagonistes de D1R [232, 233, 312] et D2R [233-235] provoquent une diminution de l'amplitude de l'onde b de l'ERG des cônes et des bâtonnets et l'hypothèse de cette expérimentation était que les souris D1R-KO et D2R-KO présenteraient ces mêmes phénotypes. Or, cette hypothèse a été confirmée en partie puisque cette étude rapporte une diminution de l'amplitude de l'onde b des cônes et des bâtonnets, ainsi qu'une augmentation de la latence de l'onde b des cônes chez les souris D1R-KO, tandis que seule une plus grande contribution relative des OPs à l'amplitude de l'onde b des cônes est observée chez les souris D2R-KO.

En somme, les résultats rapportés avec les souris Tph2-KI et DAT-KO corroborent certaines anomalies de l'ERG qui ont été observées dans le TAS, ce qui suggère que des dysfonctions monoaminergiques centrales pourraient être partiellement impliquées dans ces anomalies de l'ERG. Les observations de la présente expérimentation ainsi que de l'étude précédente de cette thèse permettent de proposer un modèle multifactoriel qui regroupe à la fois la mélatonine, la sérotonine centrale et la dopamine centrale et qui pourrait expliquer les anomalies de l'ERG qui ont été retrouvées dans le TAS.

#### **1.4.4. Étude de l'implication de GSK3 sur l'ERG**

Au moment où les deux premières études étaient en cours, un article démontrant la présence d'une diminution de l'amplitude de l'onde b des bâtonnets chez des enfants à haut risque (HR) génétique de développer la schizophrénie ou le trouble bipolaire a été publié [283]. Par ailleurs, cette anomalie des bâtonnets a aussi été retrouvée chez les patients atteints de schizophrénie en plus d'une diminution de l'amplitude des ondes a et b des cônes [202, 281]. Sachant que GSK3 est un facteur de risque pour la schizophrénie et le trouble bipolaire [17, 138, 141], l'objectif de cette étude est de déterminer si ces anomalies de l'ERG peuvent être associées à l'expression de GSK3.

Pour la réalisation de cette étude, un ERG en condition photopique et scotopique a été mesuré sur les souris GSK3 $\alpha^{+/-}$ , GSK3 $\alpha^{-/-}$ , prpGSK3 $\beta$  et GSK3 $\beta^{+/-}$  qui présentent des changements dans l'expression de l'isozyme  $\alpha$  ou  $\beta$  de GSK3. Puisqu'il est suggéré que GSK3 est suractivée dans le cas de la schizophrénie [17, 138, 141], l'hypothèse émise au départ était qu'une surexpression de GSK3, telle qu'observée chez les souris prpGSK3 $\beta$ , provoquerait les mêmes anomalies de l'ERG qui ont été observées chez les patients atteints de schizophrénie. Or, cette étude démontre plutôt que les souris prpGSK3 $\beta$  présentent la même anomalie de l'ERG que les HRs, c'est-à-dire une diminution de l'amplitude de l'onde b des bâtonnets. D'ailleurs, ce phénotype est renversé par l'inhibition de GSK3 $\alpha$  ou  $\beta$  tel qu'observé respectivement chez les souris GSK3 $\alpha^{-/-}$  et GSK3 $\beta^{+/-}$ . En somme, ces résultats démontrent une association entre l'amplitude de l'onde b de l'ERG et l'expression de GSK3. De plus, cette étude suggère que GSK3 $\beta$  pourrait être surexprimée chez les HRs avant même le début de la maladie et être à l'origine de la diminution de l'amplitude de l'onde b qui a été observée chez ces personnes.

#### **1.4.5. Étude de l'implication de GSK3 dans l'horloge biologique**

En plus de présenter des anomalies de l'ERG, il a été rapporté que les patients atteints de maladies psychiatriques présentent aussi des dysfonctions circadiennes [188, 189]. D'ailleurs, il a été démontré que le stabilisateur d'humeur lithium, qui est couramment utilisé en psychiatrie, module l'horloge biologique [191-194]. De ce fait, l'inhibition directe qu'il exerce sur GSK3 [77] a été suggérée comme mécanisme pour expliquer son effet sur l'horloge biologique. L'objectif de cette dernière étude est d'investiguer si l'inhibition génétique de GSK3 $\beta$  reproduit le phénotype circadien observé suite à la prise de lithium chez les rongeurs, c'est-à-dire une augmentation de la période locomotrice circadienne.

Pour la réalisation de cette étude, l'activité locomotrice circadienne sous noirceur constante a été mesurée chez des souris haploinsuffisantes pour GSK3 $\beta$  (souris GSK3 $\beta^{+/-}$ ) afin d'évaluer la durée de leur période circadienne intrinsèque. Ce modèle animal a été choisi puisque leur mutation génétique reproduit l'effet direct du lithium, c'est-à-dire une diminution de l'expression de GSK3 $\beta$ . L'hypothèse émise au départ était donc que les souris GSK3 $\beta^{+/-}$  allaient présenter une période circadienne intrinsèque plus longue semblable à ce qui a été observé chez les rongeurs suite à la

prise de lithium. Somme toute, cette hypothèse a été confirmée, car une augmentation de la période locomotrice circadienne est rapportée chez les souris  $GSK3\beta^{+/-}$ , ce qui suggère un rôle de  $GSK3\beta$  dans la régulation de l'horloge biologique.

Les descriptions détaillées des protocoles, des analyses et des conclusions pour ces quatre expérimentations sont présentées dans les chapitres 2 à 5 qui suivent. La portée scientifique de ces études ainsi que les mécanismes potentiellement à l'origine des observations qui en découlent sont ensuite discutés dans le chapitre 6.



## **CHAPITRE 2 : NEGATIVE IMPACT OF MELATONIN INGESTION ON THE PHOTOPIC ELECTRORETINOGRAM OF DOGS**

### **Premier article**

Publié dans *Neuroscience Letters* (2013) 543:78-83

Utilisation de cette publication autorisée par Elsevier

## Résumé

La sécrétion de mélatonine suit un rythme circadien entraîné par le cycle lumière/noirceur et permet de promouvoir la sensibilité à la lumière durant la nuit. Il a été suggéré que la mélatonine et la dopamine présente une inhibition réciproque qui contribuerait à l'alternance entre la vision de jour et la vision de nuit. L'objectif de cette étude est d'investiguer l'impact de l'ingestion d'une dose élevée de mélatonine sur l'électrorétinogramme (ERG) des chiens mesuré en condition photopique et scotopique, et ce, durant le jour lorsque la mélatonine n'est pas naturellement présente dans l'organisme. La courbe intensité/réponse de l'ERG photopique et scotopique de sept chiens de race beagle anesthésiés (trois mâles et quatre femelles) a été obtenue dans deux conditions différentes : une sans mélatonine (contrôle) et une suite à l'administration orale de mélatonine (dose de 90 mg). Le  $V_{max}$  (qui représente l'amplitude maximale de l'onde b) et le  $\log K$  (qui représente la sensibilité rétinienne) ont été dérivés des courbes intensité/réponse obtenues. L'ERG flicker a aussi été enregistré. En condition photopique, l'amplitude de l'onde a (contrôle :  $-126,90 \mu V$ ; mélatonine :  $-49,64 \mu V$ ;  $p < 0,001$ ) et le  $V_{max}$  (contrôle :  $252,50 \mu V$ ; mélatonine :  $115,40 \mu V$ ;  $p < 0,001$ ) ont été diminués suite à l'ingestion de mélatonine. Une réduction significative de l'amplitude de l'ERG flicker a aussi été observée suite à l'ingestion de mélatonine. En condition scotopique, une différence globale a été démontrée avant et après l'ingestion de mélatonine pour les amplitudes des ondes a et b, mais aucun changement significatif n'a été observé pour le  $V_{max}$ . Somme toute, l'ingestion d'une dose élevée de mélatonine durant le jour diminue l'amplitude des ondes a et b du système photopique, mais n'a aucun impact sur la latence de ces ondes. Cet effet négatif de la mélatonine sur le système des cônes pourrait servir à promouvoir la vision de nuit.

# Negative Impact of Melatonin Ingestion on the Photopic Electroretinogram of Dogs

Joëlle Lavoie<sup>1,2,3</sup>, Serge G. Rosolen<sup>4,5,6</sup>, Catherine Chalier<sup>7</sup>, Marc Hébert<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Centre de recherche de l'Institut Universitaire en santé mentale de Québec, Quebec City, Canada; <sup>2</sup>Department of Neurosciences and Psychiatry; <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Université Laval, Quebec City, Canada; <sup>4</sup>Clinique vétérinaire Voltaire, Asnières, France; <sup>5</sup>INSERM, U968- Institut de la Vision, Paris, F-75012, France; <sup>6</sup>UPMC Univ Paris 06, UMR\_S968, Institut de la Vision, Paris, F-75012, France; <sup>7</sup>Sanofi Aventis Recherche & Développement, Centre de Recherche de Vitry-Alfortville, DSAR-Toxicology, Alfortville, France

## Corresponding Author:

Marc Hébert, Ph.D

Centre de recherche de l'Institut universitaire en santé mentale de Québec

2601, chemin de la Canardière, F-4500

Quebec City, Quebec, Canada G1J 2G3

Tel.: 1-418-663-5000 ext. 4765

Fax: 1-418-663-9540

marc.hebert@crulrg.ulaval.ca

## Abstract

Melatonin follows a circadian rhythm entrained by the light/dark cycle and plays a role in promoting light sensitivity at night. It has been suggested that melatonin and dopamine reciprocal inhibition may contribute to the switch between day and night vision. The purpose of this study was to investigate the impact of a high dose of melatonin administration on the photopic and scotopic electroretinogram (ERG) of dogs in the daytime, when it is not thought to be present. Photopic and scotopic ERG luminance response functions were obtained from 7 anaesthetized beagle dogs (3 males, 4 females), once without melatonin (control) and once after oral administration of melatonin (90mg/dog).  $V_{max}$  (maximal b-wave amplitude achieved) and  $\log K$  (retinal sensitivity) were calculated from the derived luminance response function. Photopic flicker ERG was also recorded. In photopic condition, a-wave amplitude (control:  $-126.90 \mu V$ ; with melatonin:  $-49.64 \mu V$ ;  $p < 0.001$ ) and  $V_{max}$  (control:  $252.50 \mu V$ ; with melatonin:  $115.40 \mu V$ ;  $p < 0.001$ ) were decreased. A significant reduction of the photopic flicker ERG amplitude was observed after melatonin ingestion. In scotopic condition, an overall difference was reported before and after melatonin ingestion for the a- and b-wave amplitude, but no change was significant for  $V_{max}$ . Melatonin ingestion at a high dose during the day decreases the photopic amplitude of a- and b-wave, but has no impact on implicit time. This negative impact of melatonin on photopic system may serve to promote night vision.

**Keywords:** Melatonin; Electroretinogram; Retina; Cones; Dog

## Introduction

The light/dark cycle is known as the most important environment synchronizer of the circadian pacemaker in mammals. Melatonin is a highly conserved molecule present in all studied species [1] and it is considered as an internal *zeitgeber* for the circadian system [2]. Its level is known to be high during the night and low during the day and its production can be suppressed by light exposure to the eyes [3]. This hormone is excreted for the most part by the pineal gland at night, but it is also produced in several structures of the eye such as the lens [4], the iris, the ciliary body [5], the lacrimal glands [6] and the photoreceptors of the retina [7]. Melatonin precursor, L-tryptophan, is also present in some foods [8] and it can be ingested, as in the present experiment. It is also commonly used as a chronic self-medication for sleep or circadian disorder treatment [9].

Many studies raised the possibility of the existence of a biological clock in the eye. It has been demonstrated that melatonin and dopamine production as well as their reciprocal inhibition follow a circadian rhythm that appears to be entrained by the light/dark cycle and may contribute to the switch between day and night vision [10]. In fact, in the retina, dopamine production has been shown to be triggered by light and produced during the daytime [11] whereas melatonin secretion increases during the night darkness. Therefore, as dopamine and melatonin act as mutual antagonists [12], the production of retinal dopamine during the day seems to promote the cone system, as measured in the iguana, [13] whereas the production of retinal melatonin during the night seems to favor the rod system, as measured in the chick [14].

The circadian changes in retinal function can be assessed using the electroretinogram (ERG) technique which allows direct assessment of cone and rod system by recording the light-evoked electric potential originating from the retina in response to standardized flash stimuli. It has been demonstrated that, in entrained eyes, the rod driven b-wave amplitude was lower in the morning [15, 16]. A shorter b-wave implicit time was observed during the day, with no change in ERG amplitude in photopic condition [17, 18]. A study also reported an increase of photopic b-wave amplitude at noon [19]. However, the origin of these changes is still unclear and it is suggested that dopamine and melatonin are implicated in these circadian changes [13, 20-24].

A study by Gagné et al. [21] investigated the impact of oral melatonin on the human ERG cone response. It was demonstrated that the cone maximal response was decreased by about 8% and the b-wave implicit time lengthened following the ingestion of 15 mg of melatonin. This result was consistent with the suggestion that when melatonin is taken during the daytime, when it is thought not to be present, it acts as inhibitor of retinal dopamine which is a promoter of day vision through the cone system. Rod function was however not assessed and therefore it is not known if it would be affected by the presence of melatonin. The goal of this experiment was to investigate the impact of oral melatonin administration at high dose on the photopic and scotopic ERG of beagle dogs.

## **Materials and Methods**

### **Animals**

All experiments were conducted in accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement for the use of animals in ophthalmic and vision research and were approved by our local animal care committee. 7 beagle dogs, 4 males (weight: 9-12 kg, age: 18-20 months) and 3 females (weight: 9-12 kg, age: 18-20 months) were used for this study. Every dog was healthy and had a complete physical examination, including an ophthalmological assessment 72 h prior to the recording of the ERG. Animals were housed individually on a 12-hours light/dark cycle with a constant luminance background of 30 cd/m<sup>2</sup> inside the cages.

### **ERG Recordings**

The method for ERG recordings was previously described [25]. Binocular, full field ERGs were recorded in photopic and scotopic conditions from dogs on two occasions: once without melatonin (control condition) and once 60 minutes following melatonin (Natrol®) administered orally at a dose of 90 mg/dog, per os. All animals were anaesthetized using a single intramuscular injection of a mixture of ketamine (5 mg/kg, Imalgene® 1000, Merial, France) and medetomidine (0.2 mg/kg, Domitor®, Pfizer, France) 5 minutes after melatonin ingestion. Corneal hydration was maintained throughout the entire procedure with the use of carbachol (Ocrygel®, TVM, France) applied over the entire cornea. Rectal temperature and heart rate were regularly monitored. All ERGs were recorded

between 8:30 and 12:30. The two conditions were tested with an interval of 8 days and at the same time than the previous recording to avoid circadian variability. The flash retinal responses were evoked at 15 different increasing intensities ranging from  $-3.39 \log \text{ cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$  to  $0.81 \log \text{ cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$  (difference of  $0.3 \log \text{ cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$  between each intensity) presented first in scotopic condition, following a 32 minutes dark-adaptation period, and then in photopic condition (luminance background of  $30 \text{ cd}/\text{m}^2$ ) following a 16 minutes light adaptation process. The photopic flicker retinal responses were evoked at 4 different temporal frequencies (6 Hz, 12 Hz, 20 Hz and 30 Hz) delivered for 16 seconds. Flicker ERG was assessed at the end of the flash photopic ERG recording.

## Data Analysis

The ERG response is composed of a negative component called the a-wave, followed by a large positive component, called the b-wave. The a-wave is generated mainly by the photoreceptors, whereas the b-wave originated mostly from the ON-bipolar cells. By convention, a-wave amplitude is measured from the baseline to trough, and the b-wave from the trough of the a-wave to the peak of the b-wave. Implicit times were measured from flash onset. As per Hébert et al. [26], the amplitudes of the b-waves were plotted against flash luminance in order to generate the photopic and scotopic luminance response function (LRF) from which two parameters were derived, namely  $V_{\text{max}}$ , which refers to the saturating b-wave amplitude observed in the luminance response function, and  $\log K$  which is interpreted as retinal sensitivity and represents the intensity necessary to reach half of the  $V_{\text{max}}$ . Beside the b-wave, a-wave amplitude, a- and b-wave implicit times were also measured.

The reproducibility of the ERG recording method has already been discussed [25]. For each animal, the response obtained from each eye was reported separately. In order to determine if there is any statistical difference between both eyes, a Student paired  $t$ -test ( $p < 0.05$ ) was performed for every response obtained between left and right eye. No significant difference was found for any dogs, so the averaged response of both eyes was calculated and reported in the results section. Repeated-measures analyses of variance (ANOVAs) were performed to assess the effect of treatment in all the ERG parameters (a- and b-waves amplitudes and implicit times) in photopic and scotopic conditions. Analysis of the ERG also included the  $\log K$  and this variable was analyzed with paired  $t$ -tests. All analyses were conducted using SPSS for Windows, version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois)

(\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ). Standard deviations (SD) of the means are presented in the text with the averaged values of all parameters.

## Results

Figure 2.1 presents a typical example of photopic ERG waveforms obtained before and after melatonin ingestion. At first sight, an important decrease of a-wave and b-wave amplitudes can be observed. The mean photopic LRF for absolute a-wave and b-wave amplitudes are also shown in figure 2.1. A significant group difference was found [ $F(1,12) = 57.913$ ,  $p < 0.001$ ] for the a-wave amplitude and, consequently, the maximal a-wave amplitude was decreased following melatonin ingestion ( $-49.64 \pm 15.69 \mu\text{V}$ ;  $p < 0.001$ ) compared to the control condition ( $-126.9 \pm 16.45 \mu\text{V}$ ). A significant overall difference was also observed before and after melatonin ingestion [ $F(1,12) = 59.353$ ,  $p < 0.001$ ] for the b-wave amplitudes resulting in a  $V_{\text{max}}$  amplitude much diminished after melatonin ingestion ( $115.40 \pm 28.27 \mu\text{V}$ ;  $p < 0.001$ ) when compared to control condition ( $252.50 \pm 44.17 \mu\text{V}$ ). Post-hoc comparisons showed that a- and b-wave amplitudes were decreased following melatonin ingestion at almost every intensity used to generate the LRF. No significant change was reported in a-wave implicit time [ $F(1,12) = 1.803$ ,  $p = 0.204$ ], b-wave implicit time [ $F(1,12) = 2.198$ ,  $p = 0.164$ ] and in logK value before ( $-1.036 \pm 0.15$  log units) and after ( $-1.097 \pm 0.32$  log units;  $p = 0.619$ ) melatonin ingestion. The individual results of the dogs for the photopic ERG parameters are presented in table 2.1.

The results of photopic flicker ERG are presented in figure 2.2. A typical example of flicker ERG waveforms before and after melatonin ingestion is also presented. A significant overall difference was reported between the two groups [ $F(1,12) = 14.074$ ,  $p = 0.003$ ]. All animals showed a significant reduction in flicker amplitude after melatonin ingestion at the 6 Hz frequency (before melatonin:  $69.14 \pm 17.55 \mu\text{V}$ ; after melatonin:  $49.64 \pm 13.20 \mu\text{V}$ ;  $p = 0.006$ ), 12 Hz frequency (before melatonin:  $80.57 \pm 15.62 \mu\text{V}$ ; after melatonin:  $58.57 \pm 6.52 \mu\text{V}$ ;  $p = 0.002$ ), 20 Hz frequency (before melatonin:  $100.20 \pm 13.00 \mu\text{V}$ ; after melatonin:  $70.36 \pm 14.35 \mu\text{V}$ ;  $p = 0.002$ ) and at the 30 Hz frequency (before melatonin:  $89.93 \pm 17.59 \mu\text{V}$ ; after melatonin:  $61.00 \pm 19.14 \mu\text{V}$ ;  $p = 0.005$ ). The maximal flicker amplitude was obtained at a frequency of 20 Hz in both conditions. The individual results of the dogs for the photopic flicker ERG are presented in table 2.2.

Figure 2.3 shows a typical example of scotopic ERG waveform recorded in the control condition and after melatonin ingestion. The mean scotopic LRF for absolute a-wave and b-wave are also reported in figure 2.3. A significant overall difference before and after melatonin ingestion was reported [ $F(1,12) = 4.763, p = 0.050$ ] for the a-wave amplitude, but the post-hoc comparison revealed that none of the points on the LRF was found to be significant before and after melatonin ingestion. a-Wave maximal amplitude was also decreased after melatonin ingestion ( $-230.30 \pm 60.42 \mu\text{V}$ ) compared to the value obtained before ingestion ( $-306.90 \pm 59.35 \mu\text{V}$ ), but this change was not significant ( $p = 0.058$ ). A significant difference was also reported [ $F(1,12) = 5.084, p = 0.044$ ] for the b-wave amplitude and post-hoc comparisons revealed a significant change at some intensities used to generate the LRF.  $V_{\text{max}}$  was however not significantly changed following melatonin ingestion ( $437.60 \pm 103.40 \mu\text{V}; p = 0.069$ ) compared to the control condition ( $519.50 \pm 70.47 \mu\text{V}$ ). This represents a decrease of about 16% between the 2 conditions, albeit high inter-subjects variability was also observed. No change could be observed in a-wave implicit time [ $F(1,12) = 0.28, p = 0.602$ ], b-wave implicit time [ $F(1,12) = 0.072, p = 0.793$ ] and in logK value before ( $-0.91 \pm 0.12 \log \text{ units}$ ) and after ( $-0.82 \pm 0.18 \log \text{ units}; p = 0.619$ ) melatonin ingestion. The individual results of the dogs for the scotopic ERG parameters are presented in table 2.3.

## Discussion

In the present study, we demonstrated that melatonin administered orally at a dose of 90 mg can dramatically impact the cone response in dogs. More precisely, the maximal amplitude of a- and b-wave was decreased by about 61% and 54% respectively after melatonin ingestion. Photopic flicker ERG amplitudes were also significantly decreased at every frequency tested, with the maximal flicker amplitude obtained at 20 Hz at which frequency an important decrease of about 30% was observed. In scotopic condition, a smaller decrease of about 16% in  $V_{\text{max}}$  was observed although it was not significant. Interestingly, the a- and b-wave amplitudes were the only parameters changed in our experiment, suggesting that implicit time and retinal sensitivity as measured with the logK are not affected following melatonin ingestion. Noteworthy, all animals had a complete clinical examination after the ERG and no ophthalmic and visual sign of toxicity was observed (data not shown).

Our results corroborate other studies suggesting that exogenous melatonin administration

can reach the eye through general circulation. For example, it has been demonstrated that melatonin ingestion in humans [20, 21] and muscular injection of melatonin in domestic fowls [22] can impact the retinal response. Our ERG investigation clearly suggests that circulating melatonin can reach the eye and affect the retinal response.

The circadian secretion of melatonin in the eye is well described [27]. One of the advantages in our study is that direct implication of melatonin on the ERG response was measured without any influence of its normal circadian secretion because it was ingested during the day, when it is not thought to be secreted. A similar study [21] was performed on humans and demonstrated analogous results such as a decrease of the maximal cone response following melatonin ingestion. This decrease was about 8%, but the dose ingested (15 mg) is much lower than the dose we used on dogs. Also, since this experiment was performed in photopic condition only, we do not know if melatonin ingestion can impact the human scotopic ERG as observed in the present study with dogs. In another study in human, Emser et al. [20] reported a decrease of the b-wave maximal amplitude in both photopic and scotopic condition following the ingestion of 10 mg of melatonin. But, as mentioned by Gagné et al. [21], it is not clear that melatonin had any impact on rods since, in the scotopic condition, a mixed cone-rod response was triggered with the use of a bright red flash. Another experiment on the green iguana also demonstrated that melatonin reduces the cone driven b-wave amplitude according to the dose administered [13]. A similar result was reported in the domestic fowl where b-wave amplitude was decreased following melatonin muscular injection [22]. Altogether, these results clearly indicate that melatonin administration during the day can impact the cone system as measured with the ERG. The rod system could be affected, but to a lesser extent and it is possible that the reduction reported could still be linked to the cone system when using a flash which triggers a mixed rod-cone response.

Some studies on humans also demonstrated a correlation between the level of endogenous melatonin according to its circadian secretion and the maximal response of the ERG. For example, a slight but not significant decrease in the cone b-wave was reported in humans at 23:00 h that is at a time when melatonin is thought to be secreted. [23]. But since melatonin reaches its secretion peak at 3:00-4:00 h, a stronger decrease would have been expected if the ERG would have been performed in the middle of the night [28]. Of interest, the dynamics of the photopic hill of the ERG recorded in the

evening, revealed that the descending part of the photopic hill seems more affected than the ascending portion [23], suggesting a different impact of melatonin secretion on the ON and OFF pathways [29, 30]. Rufiange et al. [24] observed a significant negative correlation between the ERG amplitude and the salivary melatonin concentration for the scotopic mixed a- and b-wave as well as the photopic b-wave. In fact, they demonstrated that ERG amplitudes were lower in the morning in evening-type people in which circulating melatonin is higher due to the delayed rhythm whereas, ERG amplitude were higher in morning-type people because of lower melatonin production. Marcus et al. [31] confirmed that when circulating melatonin levels are low between 9:00 h and 16:00 h, no circadian variations of ERG amplitudes are observed. Altogether, these results suggest that endogenous melatonin, as well as melatonin administration, can impact the retinal function as assessed with the ERG.

Many studies demonstrated that melatonin and dopamine show reciprocal inhibition as an adaptive mechanism to facilitate the appropriate system to generate vision [32-34]. However, a limitation in our study is that nothing about dopamine was measured, but some mechanisms which could explain our results were already described. In fact, it is suggested that dopamine produced during the day bias the system in favor of the cones [13], whereas retinal melatonin produced at night has the opposite effect and promotes the rod system [14]. This cycle shows a 24h-rhythm with melatonin showing a peak during the dark phase and dopamine being stimulated by light [27]. The circadian clock driving this process is located within the retina with melatonin receptors (MT1) located on several retinal cells suggesting a direct effect of this hormone on cone and rod systems and dopamine production [35]. Also, it has been demonstrated that communication between rods and cones is mediated through gap junctions that are under the control of dopaminergic D2 receptors. These gap junctions are absent when dopamine is produced during daytime and are present at night, when dopamine is suppressed by melatonin [11]. A study on mudpuppy showed that dopamine antagonists enhance horizontal cell coupling, a process which contributes to regulate and integrate the input from multiple photoreceptors [36]. This mechanism could explain the decrease in the cone maximal response knowing that dopamine inhibition by melatonin would increase horizontal cell coupling with rods, yielding a decrease in cone functioning [37].

## **Conclusion**

In summary, we demonstrated that melatonin ingestion at a dose of 90 mg during the day, when it is not thought to be present, clearly decreases the photopic maximal amplitude of a- and b-waves, but has no impact on the implicit time and the retinal sensitivity. However, visual function tests would be needed to determine whether or how vision might be negatively impacted by ingesting oral melatonin during the day because a change in ERG does not necessarily translate to a meaningful deficit in vision or visibility. Considering that melatonin is commonly used to treat jetlag [9] and sleep disorders with doses ranging from 0.03 mg to 85 mg [38] its use as a chronic self-medication must be taken into consideration due to its negative impact on cone functioning.

## **Acknowledgements**

J.L. is recipient of a fellowship from the Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS).

## References

1. Solis-Chagoyan, H., L. Mendoza-Vargas, and B. Fuentes-Pardo, *Melatonin modulates the ERG circadian rhythm in crayfish*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2008. **149**(4): p. 373-9.
2. McIntyre, I.M., T.R. Norman, G.D. Burrows, et al., *Human melatonin suppression by light is intensity dependent*. *J Pineal Res*, 1989. **6**(2): p. 149-56.
3. Lewy, A.J., T.A. Wehr, F.K. Goodwin, et al., *Light suppresses melatonin secretion in humans*. *Science*, 1980. **210**(4475): p. 1267-9.
4. Tan, D.X., L.C. Manchester, R. Hardeland, et al., *Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin*. *J Pineal Res*, 2003. **34**(1): p. 75-8.
5. Rohde, B.H., M.A. McLaughlin, and L.Y. Chiou, *Existence and role of endogenous ocular melatonin*. *J Ocul Pharmacol*, 1985. **1**(3): p. 235-43.
6. Mhatre, M.C., A.S. van Jaarsveld, and R.J. Reiter, *Melatonin in the lacrimal gland: first demonstration and experimental manipulation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988. **153**(3): p. 1186-92.
7. Bernard, M., P.M. Iuvone, V.M. Cassone, et al., *Avian melatonin synthesis: photic and circadian regulation of serotonin N-acetyltransferase mRNA in the chicken pineal gland and retina*. *J Neurochem*, 1997. **68**(1): p. 213-24.
8. Peuhkuri, K., N. Sihvola, and R. Korpela, *Diet promotes sleep duration and quality*. *Nutr Res*, 2012. **32**(5): p. 309-19.
9. Herxheimer, A. and J. Waterhouse, *The prevention and treatment of jet lag*. *BMJ*, 2003. **326**(7384): p. 296-7.
10. Reme, C.E., A. Wirz-Justice, and M. Terman, *The visual input stage of the mammalian circadian pacemaking system: I. Is there a clock in the mammalian eye?* *J Biol Rhythms*, 1991. **6**(1): p. 5-29.
11. Witkovsky, P., *Dopamine and retinal function*. *Doc Ophthalmol*, 2004. **108**(1): p. 17-40.
12. Wiechmann, A.F., M.J. Vrieze, R. Dighe, et al., *Direct modulation of rod photoreceptor responsiveness through a Mel(1c) melatonin receptor in transgenic Xenopus laevis retina*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003. **44**(10): p. 4522-31.
13. Miranda-Anaya, M., P.A. Bartell, and M. Menaker, *Circadian rhythm of iguana electroretinogram: the role of dopamine and melatonin*. *J Biol Rhythms*, 2002. **17**(6): p. 526-38.
14. Peters, J.L. and V.M. Cassone, *Melatonin regulates circadian electroretinogram rhythms in a dose- and time-dependent fashion*. *J Pineal Res*, 2005. **38**(3): p. 209-15.
15. Birch, D.G., M.A. Sandberg, and E.L. Berson, *Diurnal rhythm in the human rod ERG. Relationship to cyclic lighting*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1986. **27**(2): p. 268-70.
16. Birch, D.G., E.L. Berson, and M.A. Sandberg, *Diurnal rhythm in the human rod ERG*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1984. **25**(2): p. 236-8.
17. Hankins, M.W., R.J. Jones, and K.H. Ruddock, *Diurnal variation in the b-wave implicit time of the human electroretinogram*. *Vis Neurosci*, 1998. **15**(1): p. 55-67.
18. Hankins, M.W., S.R. Jones, A. Jenkins, et al., *Diurnal daylight phase affects the temporal properties of both the b-wave and d-wave of the human electroretinogram*. *Brain Res*, 2001. **889**(1-2): p. 339-43.
19. Manglapus, M.K., P.M. Iuvone, H. Underwood, et al., *Dopamine mediates circadian rhythms of rod-cone dominance in the Japanese quail retina*. *J Neurosci*, 1999. **19**(10): p. 4132-41.

20. Emser, W., R. Dechoux, M. Weiland, et al., *Melatonin decreases the amplitude of the b-wave of the human electroretinogram*. *Experientia*, 1993. **49**(8): p. 686-7.
21. Gagne, A.M., K.V. Danilenko, S.G. Rosolen, et al., *Impact of oral melatonin on the electroretinogram cone response*. *J Circadian Rhythms*, 2009. **7**: p. 14.
22. Lu, J., M.J. Zoran, and V.M. Cassone, *Daily and circadian variation in the electroretinogram of the domestic fowl: effects of melatonin*. *J Comp Physiol A*, 1995. **177**(3): p. 299-306.
23. Lavoie, J., A.M. Gagne, M.P. Lavoie, et al., *Circadian variation in the electroretinogram and the presence of central melatonin*. *Doc Ophthalmol*, 2010. **120**(3): p. 265-72.
24. Rufiange, M., M. Dumont, and P. Lachapelle, *Correlating retinal function with melatonin secretion in subjects with an early or late circadian phase*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002. **43**(7): p. 2491-9.
25. Rosolen, S.G., F. Rigaudiere, and P. Lachapelle, *A practical method to obtain reproducible binocular electroretinograms in dogs*. *Doc Ophthalmol*, 2002. **105**(2): p. 93-103.
26. Hebert, M., P. Lachapelle, and M. Dumont, *Reproducibility of electroretinograms recorded with DTL electrodes*. *Doc Ophthalmol*, 1995. **91**(4): p. 333-42.
27. Tosini, G. and C. Fukuhara, *The mammalian retina as a clock*. *Cell Tissue Res*, 2002. **309**(1): p. 119-26.
28. Arent, J., *Melatonin: characteristics, concerns, and prospects*. *J Biol Rhythms*, 2005. **20**(4): p. 30-291.
29. Sieving, P.A., K. Murayama, and F. Naarendorp, *Push-pull model of the primate photopic electroretinogram: a role for hyperpolarizing neurons in shaping the b-wave*. *Vis Neurosci*, 1994. **11**(3): p. 519-32.
30. Rufiange, M., S. Rousseau, O. Dembinska, et al., *Cone-dominated ERG luminance-response function: the Photopic Hill revisited*. *Doc Ophthalmol*, 2002. **104**(3): p. 231-48.
31. Marcus, M., L. Cabael, and M.F. Marmor, *Are circadian variations in the electroretinogram evident on routine testing?* *Doc Ophthalmol*, 2004. **108**(2): p. 165-9.
32. Dubocovich, M.L., R.C. Lucas, and J.S. Takahashi, *Light-dependent regulation of dopamine receptors in mammalian retina*. *Brain Res*, 1985. **335**(2): p. 321-5.
33. Zawilska, J.B., *The role of dopamine in the regulation of melatonin biosynthesis in vertebrate retina*. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 1994. **54 Suppl**: p. 47-56.
34. Tosini, G. and J.C. Dirden, *Dopamine inhibits melatonin release in the mammalian retina: in vitro evidence*. *Neurosci Lett*, 2000. **286**(2): p. 119-22.
35. Alarma-Estrany, P. and J. Pintor, *Melatonin receptors in the eye: location, second messengers and role in ocular physiology*. *Pharmacol Ther*, 2007. **113**(3): p. 507-22.
36. Dong, C.J. and J.S. McReynolds, *The relationship between light, dopamine release and horizontal cell coupling in the mudpuppy retina*. *J Physiol*, 1991. **440**: p. 291-309.
37. Baylor, D.A. and M.G. Fuortes, *Electrical responses of single cones in the retina of the turtle*. *J Physiol*, 1970. **207**(1): p. 77-92.
38. Arent, J., *Melatonin and the mammalian pineal gland*. 1995, London: Chapman & Hall.

**Table 2.1.** Individual results of the dogs in photopic condition. Dogs 1 to 3 are females and dogs 4 to 7 are males. The mean result for all parameters before (control) and after melatonin ingestion as well as their difference are presented with the standard deviation (SD).

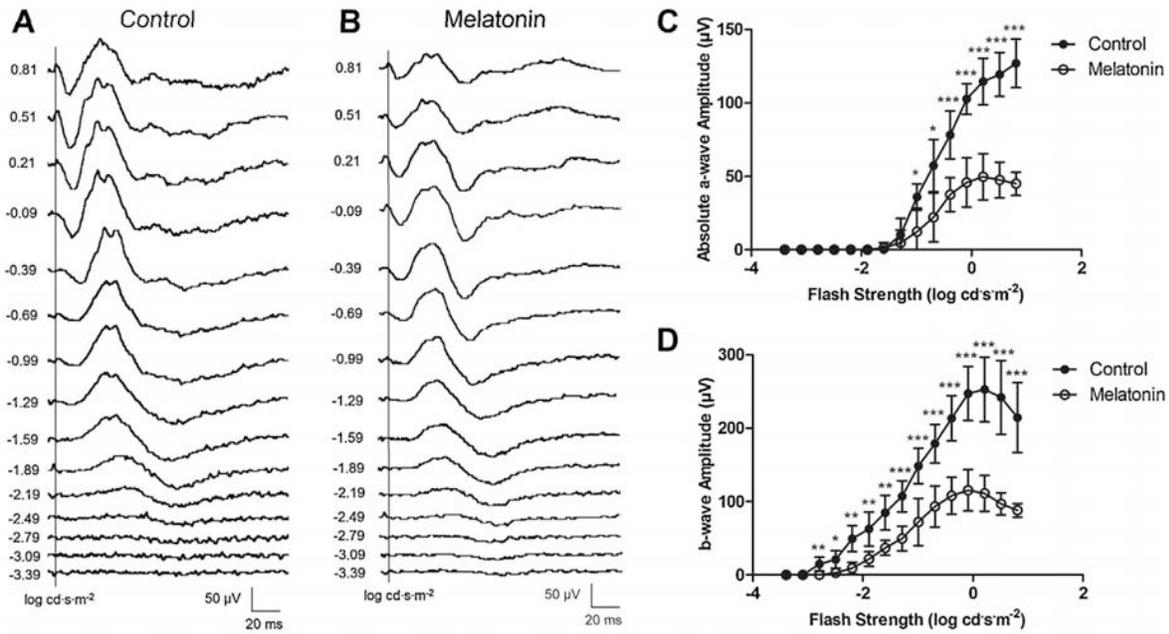
ERG parameters	Dogs	Control	Melatonin	Difference
a-wave Maximal Amplitude ( $\mu\text{V}$ )	1	-109.00	-36.00	73.00
	2	-109.50	-36.00	73.50
	3	-117.50	-30.50	87.00
	4	-154.00	-54.50	99.50
	5	-138.50	-73.00	65.50
	6	-133.50	-57.50	76.00
	7	-126.50	-60.00	66.50
	<b>Mean</b>	<b>-126.90 <math>\pm</math> 16.45</b>	<b>-49.64 <math>\pm</math> 15.69</b>	<b>77.29 <math>\pm</math> 12.09</b>
Vmax ( $\mu\text{V}$ )	1	255.50	105.50	150.00
	2	241.50	88.50	153.00
	3	239.50	85.00	154.50
	4	215.00	107.00	108.00
	5	198.00	114.50	83.50
	6	327.00	149.50	177.50
	7	291.00	158.00	133.00
	<b>Mean</b>	<b>252.50 <math>\pm</math> 44.17</b>	<b>115.40 <math>\pm</math> 28.27</b>	<b>137.10 <math>\pm</math> 31.86</b>
a-wave Implicit time at Maximal Amplitude (ms)	1	7.00	9.00	2.00
	2	8.00	8.00	1.00
	3	7.00	7.00	0.00
	4	6.50	8.50	2.00
	5	7.00	9.00	2.00
	6	8.00	8.00	0.00
	7	8.00	9.00	1.00
	<b>Mean</b>	<b>7.36 <math>\pm</math> 0.63</b>	<b>8.36 <math>\pm</math> 0.75</b>	<b>1.14 <math>\pm</math> 0.90</b>
b-wave Implicit time at Vmax (ms)	1	26.50	24.50	2.00
	2	27.50	26.50	1.00
	3	27.00	34.00	7.00
	4	30.50	30.00	0.50
	5	26.00	27.50	1.50
	6	24.50	24.50	0.00
	7	23.00	28.00	5.00
	<b>Mean</b>	<b>26.43 <math>\pm</math> 2.37</b>	<b>27.86 <math>\pm</math> 3.34</b>	<b>2.43 <math>\pm</math> 2.59</b>
logK value (log units)	1	-1.06	-0.99	0.07
	2	-1.16	-1.36	0.20
	3	-1.27	-1.10	0.17
	4	-0.88	-0.43	0.45
	5	-0.99	-1.34	0.35
	6	-0.82	-1.23	0.41
	7	-1.08	-1.23	0.15
	<b>Mean</b>	<b>-1.04 <math>\pm</math> 0.16</b>	<b>-1.10 <math>\pm</math> 0.32</b>	<b>0.26 <math>\pm</math> 0.14</b>

**Table 2.2.** Individual results of the dogs for the photopic flicker ERG. Dogs 1 to 3 are females and dogs 4 to 7 are males. The mean amplitude at every frequency before (control) and after melatonin ingestion as well as their difference are presented with the standard deviation (SD).

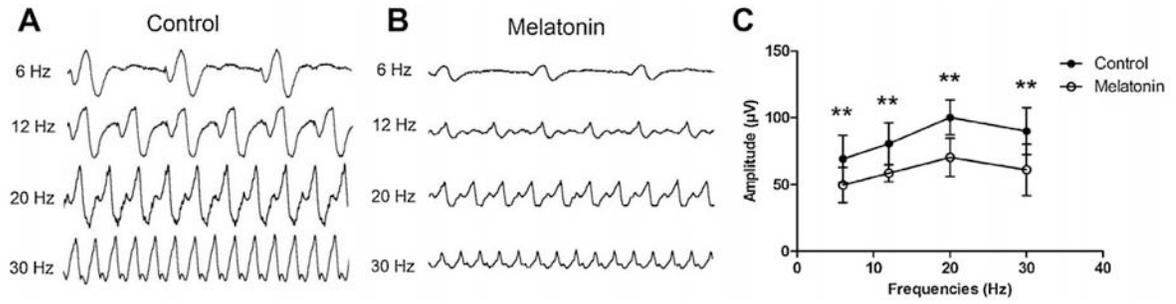
Flicker Frequencies	Dogs	Flicker Amplitude ( $\mu V$ )		Difference
		Control	Melatonin	
6 Hz	1	75.50	71.00	4.50
	2	66.00	44.00	22.00
	3	66.00	50.00	16.00
	4	57.50	44.50	13.00
	5	41.50	28.00	13.50
	6	96.50	52.50	44.00
	7	81.00	57.00	24.00
	<b>Mean</b>	<b>69.14 <math>\pm</math> 17.55</b>	<b>49.64 <math>\pm</math> 13.20</b>	<b>19.57 <math>\pm</math> 12.53</b>
12 Hz	1	90.00	57.50	32.50
	2	69.50	52.50	17.00
	3	72.00	59.00	13.00
	4	77.50	52.50	25.00
	5	64.00	56.00	8.00
	6	110.50	71.50	39.00
	7	80.50	61.00	20.50
	<b>Mean</b>	<b>80.57 <math>\pm</math> 15.62</b>	<b>58.57 <math>\pm</math> 6.52</b>	<b>22.14 <math>\pm</math> 10.90</b>
20 Hz	1	113.00	58.00	55.00
	2	99.50	66.50	33.00
	3	95.50	82.00	13.50
	4	85.00	46.50	38.50
	5	84.50	72.50	12.00
	6	118.00	86.00	32.00
	7	106.00	81.00	25.00
	<b>Mean</b>	<b>100.20 <math>\pm</math> 13.00</b>	<b>70.36 <math>\pm</math> 14.35</b>	<b>29.86 <math>\pm</math> 14.90</b>
30 Hz	1	95.50	47.50	48.00
	2	78.00	62.00	16.00
	3	75.00	67.00	8.00
	4	77.00	25.00	52.00
	5	78.50	66.50	12.00
	6	105.00	76.00	29.00
	7	120.00	82.50	37.50
	<b>Mean</b>	<b>89.93 <math>\pm</math> 17.59</b>	<b>61.00 <math>\pm</math> 19.14</b>	<b>28.93 <math>\pm</math> 17.61</b>

**Table 2.3.** Individual results of the dogs in scotopic condition. Dogs 1 to 3 are females and dogs 4 to 7 are males. The mean result for all parameters before (control) and after melatonin ingestion as well as their difference are presented with the standard deviation (SD).

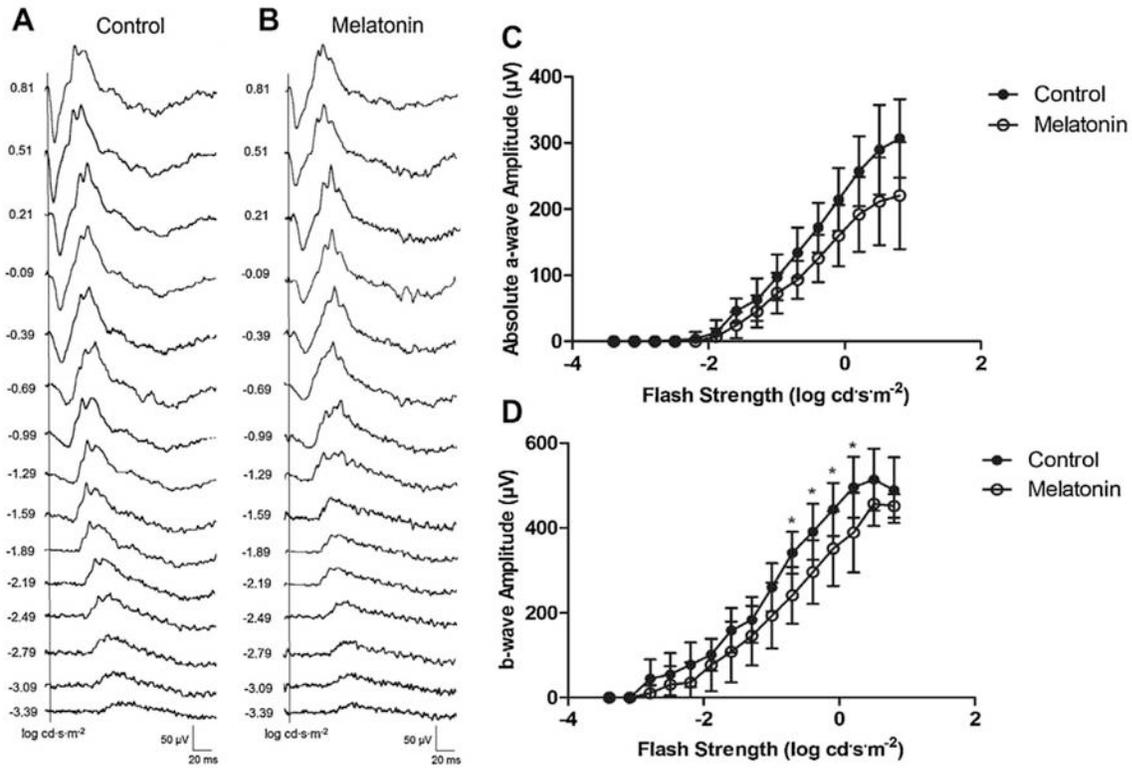
ERG parameters	Dogs	Control	Melatonin	Difference
a-wave Maximal Amplitude ( $\mu\text{V}$ )	1	-317.00	-206.00	111.00
	2	-190.00	-259.00	69.00
	3	-277.00	-214.00	63.00
	4	-353.50	-136.00	217.50
	5	-369.50	-331.50	38.00
	6	-321.50	-209.50	112.00
	7	-320.00	-256.00	64.00
	<b>Mean</b>	<b>-306.90 <math>\pm</math> 59.35</b>	<b>-230.30 <math>\pm</math> 60.42</b>	<b>96.36 <math>\pm</math> 59.79</b>
Vmax ( $\mu\text{V}$ )	1	607.00	458.00	149.00
	2	450.00	532.50	82.50
	3	528.50	452.00	76.50
	4	442.00	218.00	224.00
	5	461.00	421.50	39.50
	6	604.50	476.00	128.50
	7	543.50	505.00	38.50
	<b>Mean</b>	<b>519.50 <math>\pm</math> 70.47</b>	<b>437.60 <math>\pm</math> 103.40</b>	<b>105.50 <math>\pm</math> 66.68</b>
a-wave Implicit time at Maximal Amplitude (ms)	1	7.00	7.50	0.50
	2	7.00	7.00	0.00
	3	7.50	7.00	0.50
	4	7.00	7.00	0.00
	5	7.00	7.00	0.00
	6	7.00	8.00	1.00
	7	8.00	7.50	0.50
	<b>Mean</b>	<b>7.21 <math>\pm</math> 0.39</b>	<b>7.29 <math>\pm</math> 0.39</b>	<b>0.36 <math>\pm</math> 0.38</b>
b-wave Implicit time at Vmax (ms)	1	30.00	29.50	0.50
	2	29.00	28.00	1.00
	3	33.00	27.00	6.00
	4	30.00	30.00	0.00
	5	28.00	25.50	2.50
	6	22.50	28.00	5.50
	7	30.00	30.00	0.00
	<b>Mean</b>	<b>28.93 <math>\pm</math> 3.22</b>	<b>28.29 <math>\pm</math> 1.68</b>	<b>2.21 <math>\pm</math> 2.56</b>
logK value (log units)	1	-0.80	-0.99	0.19
	2	-0.97	-0.89	0.08
	3	-0.76	-1.06	0.30
	4	-1.02	-0.60	0.42
	5	-1.04	-0.76	0.28
	6	-0.97	-0.61	0.36
	7	-0.79	-0.87	0.08
	<b>Mean</b>	<b>-0.91 <math>\pm</math> 0.12</b>	<b>0.83 <math>\pm</math> 0.18</b>	<b>0.24 <math>\pm</math> 0.13</b>



**Figure 2.1.** Photopic ERG of dogs before and after melatonin ingestion. Example of the ERG waveform of a male dog before (A) and after (B) melatonin ingestion. Mean ( $n = 7$ ) luminance-response functions of absolute a-wave (C) and b-wave (D) showing the photopic ERG of dogs during control condition and following melatonin ingestion. Error bars represent the standard deviation of the mean.



**Figure 2.2.** Example of the flicker ERG waveform of a male dog before (A) and after (B) melatonin ingestion at the frequencies of 6 Hz, 12 Hz, 20 Hz and 30 Hz. (C) Mean ( $n = 7$ ) amplitudes at each frequency in the control condition and following melatonin ingestion. Error bars represent the standard deviation of the mean.



**Figure 2.3.** Scotopic ERG of dogs before and after melatonin ingestion. Example of the ERG waveform of a male dog before (A) and after (B) melatonin ingestion. Mean ( $n = 7$ ) luminance-response functions of absolute a-wave (C) and b-wave (D) showing the scotopic ERG of dogs during control condition and following melatonin ingestion. Error bars represent the standard deviation of the mean.

# **CHAPITRE 3 : THE ELECTRORETINOGRAM AS A BIOMARKER OF CENTRAL DOPAMINE AND SEROTONIN: POTENTIAL RELEVANCE TO PSYCHIATRIC DISORDERS**

## **Deuxième article**

Publié dans *Biological Psychiatry* (2014) 75(6):479-86

Utilisation de cette publication autorisée par Elsevier

## Résumé

**Problématique :** Des dysfonctions de la neurotransmission dopaminergique et sérotoninergique dans le cerveau pourraient être impliquées dans l'étiologie des maladies psychiatriques et des anomalies de l'électrorétinogramme (ERG) ont été observées chez les patients atteints de maladies du cerveau. L'objectif de cette étude est d'évaluer si ces anomalies de l'ERG sont provoquées par des dysfonctions de la dopamine et de la sérotonine centrale ou par des changements dans la biodisponibilité rétinienne de ces neurotransmetteurs.

**Méthode :** Un ERG en condition photopique et scotopique a été enregistré sur des souris knockin pour la tryptophane hydroxylase 2 (Tph2-KI) avec la mutation R439H qui présentent une diminution de ~80 % de la sérotonine centrale ainsi que sur des souris knockout pour le transporteur de la dopamine (DAT-KO) qui ont une augmentation (5X) de la concentration extracellulaire de dopamine dans le cerveau. Les contenus tissulaires en dopamine et en sérotonine dans la rétine et dans le striatum ont aussi été mesurés. Le rôle des récepteurs dopaminergiques D1 (D1R) et D2 (D2R) dans la réponse rétinienne a été étudié avec les souris D1R-KO et D2R-KO.

**Résultats :** Une augmentation de la latence de l'onde b en condition photopique a été observée chez les souris Tph2-KI (WT = 24,25 ms, KI = 25,22 ms;  $p = 0,011$ ). Les souris DAT-KO présentent une diminution dans la sensibilité des bâtonnets (WT = -1,97 unités log, KO = -1,81 unités log;  $p = 0,014$ ). Contrairement aux altérations marquées des contenus tissulaires en dopamine et en sérotonine dans leur striatum, aucun changement dans le contenu tissulaire de ces neurotransmetteurs n'a été observé dans la rétine de ces modèles animaux. Les souris D1R-KO présentent des anomalies de l'amplitude maximale de l'ERG en condition photopique et scotopique, tandis que les souris D2R-KO ont une plus grande contribution relative des potentiels oscillatoires dans l'amplitude de l'onde b.

**Conclusion :** Des altérations dans la neurotransmission dopaminergique et sérotoninergique centrale peuvent affecter la réponse de l'ERG. Les anomalies de l'ERG observées chez les patients atteints de maladies psychiatriques pourraient donc servir de biomarqueurs pour la transmission monoaminergique centrale, ce qui confirme que l'ERG s'avère un outil de choix pour la recherche en psychiatrie.

## **The Electroretinogram as a Biomarker of Central Dopamine and Serotonin: Potential Relevance to Psychiatric Disorders**

Joëlle Lavoie<sup>1,2,4</sup>, Placido Illiano<sup>3</sup>, Tatyana D. Sotnikova<sup>3</sup>, Raul R. Gainetdinov<sup>3</sup>, Jean-Martin Beaulieu<sup>1,4</sup>, Marc Hébert<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Psychiatry and Neurosciences, Faculty of Medicine, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada. <sup>2</sup>Department of Ophthalmology and Otorhinolaryngology, Faculty of Medicine, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada. <sup>3</sup>Department of Neuroscience and Brain Technologies, Istituto Italiano di Tecnologia, Genova, Italy. <sup>4</sup>Centre de recherche de l'Institut universitaire en santé mentale de Québec, Quebec City, Quebec, Canada.

### **Corresponding author:**

Marc Hébert, Ph.D.

Centre de recherche de l'Institut universitaire en santé mentale de Québec

2601, chemin de la Canardière, F-4500

Quebec City, Quebec, Canada G1J 2G3

Tel.: 1-418-663-5000 ext. 4765

Fax: 1-418-663-9540

marc.hebert@fmed.ulaval.ca

## Abstract

**Background:** Dysfunctions in brain dopamine and serotonin neurotransmission are believed to be involved in the etiology of psychiatric disorders and electroretinogram (ERG) anomalies have been reported in psychiatric patients. The goal of this study was to evaluate whether ERG anomalies could result from central dopamine or serotonin dysfunctions or from changes in the retinal bioavailability of these neurotransmitters.

**Method:** Photopic and scotopic ERGs were recorded in R439H tryptophan hydroxylase 2 knockin (Tph2-KI) mice that have an approximately 80% decrease in brain serotonin and in dopamine transporter knockout (DAT-KO) mice showing a five-fold increase in brain extracellular dopamine. Dopamine and serotonin retinal and striatal tissue content were also measured. The role of dopamine D1 receptors (D1R) and D2 receptors (D2R) in the ERG responses was evaluated in D1R-KO and D2R-KO mice.

**Results:** An increase in photopic b-wave implicit time was observed in Tph2-KI mice (WT = 24.25 ms, KI = 25.22 ms;  $p = 0.011$ ). DAT-KO mice showed a decrease in rod sensitivity (WT = -1.97 log units, KO = -1.81 log units;  $p = 0.014$ ). In contrast to remarkable alterations in brain levels, no changes in dopamine and serotonin retinal content were found in DAT-KO and Tph2-KI mice, respectively. D1R-KO mice showed anomalies in photopic and scotopic maximal amplitude while D2R-KO mice showed higher oscillatory potentials relative contribution to the b-wave amplitude.

**Conclusion:** Alterations in central dopamine and serotonin neurotransmission can affect the ERG responses. The ERG anomalies reported in psychiatric disorders might serve as biomarkers of central monoaminergic dysfunction, thus promoting ERG measurements as a useful tool in psychiatric research.

**Key words:** Electroretinogram; Biomarker; Dopamine; Serotonin; Dopamine transporter; Psychiatric Disorders

## Introduction

Understanding of the biological underpinnings of psychiatric disorders remains elusive in part due to well-known limitations in approaches used to investigate the living human brain. There is a strong demand to develop novel approaches to study human brain functions indirectly. One interesting subject of such studies is the retina, because it is a part of the central nervous system and thus, changes in retinal function might reflect anomalies found in brain disorders. These measurements can be achieved by using electroretinogram (ERG) recordings, a non-invasive technique to monitor the light-evoked electric potential originating from the retina in response to standardized flash stimuli. Multiple studies reported retinal anomalies as measured with the ERG in patients with psychiatric or neurologic disorders such as schizophrenia [1, 2], seasonal affective disorder (SAD) [3-6], autism [7], and Parkinson's disease [8] as well as in young offspring at high risk to develop schizophrenia or bipolar disorder [9]. However, whether these ERG anomalies are related to neurotransmission dysfunctions in the retina or in the central nervous system remains unknown. It should be noted that, although brain dopamine and serotonin are known to be involved in psychiatric disorders, these two neurotransmitters also play important roles in retinal physiology.

Dopamine is the major catecholamine expressed in the retina of most species [10]. A subtype of amacrine cells located in the proximal part of the inner nuclear layer releases dopamine, which is known to play a role in light adaptation [11]. Five dopaminergic receptors (D1R to D5R) grouped into two sub-classes (D1-class and D2-class) according to pharmacological properties and intracellular signaling responses have been described [12]. In the mammalian retina, D1R are expressed in bipolar, ganglion and horizontal cells. The D1-class receptors are responsible for the uncoupling of horizontal and amacrine cell-gap junctions [13]. D2R are found in the synapse between horizontal cells, bipolar cells and photoreceptors [14]. Dopaminergic cells in the brain are known to express the dopamine transporter (DAT) which regulates extracellular dopamine concentration by mediating its reuptake and maintains proper intracellular dopamine stores [15]. Thus, in mice lacking the DAT (DAT knockout mice, DAT-KO mice) extracellular levels of dopamine in the striatum are increased by 5-fold [16], whereas dopamine tissue content that is mostly reflective of its intraneuronal storage is decreased by 20-fold [17].

Serotonin is another monoaminergic neurotransmitter found in the retina of mammals, but at a lower level than dopamine [18]. Tryptophan hydroxylase 2 (Tph2) is the rate-limiting enzyme for neuronal serotonin synthesis [19, 20], whereas the closely related enzyme Tph1 is responsible for serotonin synthesis in peripheral tissues and the retina [21]. Anatomical studies also demonstrated that mammalian retinas receive inputs from the brain via retinopetal axons emerging from the optic nerve [18]. Recently, a rare human variant (R441H) of Tph2 was identified in few individuals with unipolar major depression [22]. On the basis of this mutation, Tph2 knockin (Tph2-KI) mice carrying the equivalent R439H mutation were generated. These mice display a reduction of approximately 80% brain serotonin synthesis, express depression-related behavioral abnormalities [23] and peripheral biomarkers [24].

Several pharmacological studies [25-30] suggest that alterations in dopamine and serotonin transmission can modulate the ERG responses, but the particular contribution of retinal or central serotonin- and dopamine-related processes in the ERG modulation is still unknown. The goal of this study was to evaluate whether the ERG anomalies similar to those reported in patients with psychiatric disorders can be related to central dopamine or serotonin dysfunctions or to alterations in retinal concentrations of these neurotransmitters. Both photopic and scotopic ERGs were assessed in Tph2-KI mice to investigate the impact of decreased brain serotonin on the ERG and in DAT-KO mice to evaluate the effects of persistently elevated dopaminergic tone in the brain [16]. We also investigated the role of dopamine D1R and D2R receptors in ERG responses with respective KO mice to evaluate whether abnormalities found in these mutants could be implicated in ERG anomalies described in psychiatric disorders.

## **Materials and Methods**

### **Animals**

Generation of DAT-KO [31], D1R-KO [32] and Tph2-KI [23] mice has been described previously. D2R-KO mice [33] were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). Mice were genotyped at weaning by polymerase chain reaction amplification from ear punch biopsy of genomic DNA. All genotypes were reconfirmed by additional genotyping after experimentation. For all

experiments, respective wildtype (WT) littermates were used as control subjects for homozygous mutant mice and all animals (male and females) were 3 to 5 months of age. Mice were housed 4-5/cage in a humidity-controlled room at 23°C on a 12-hour light-dark cycle with *ad libitum* access to food and water, before experiments. The Université Laval Institutional Animal Care Committee approved all experimental procedures in line with guidelines from the Canadian Council on Animal Care.

## **ERG Recordings**

Animals were anesthetized with a mixture of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) injected intraperitoneally, and body temperature was maintained between 36°C and 38°C with a homeothermic blanket during the ERG recording. Only the left eye was recorded. The pupil was dilated with a drop of 1% tropicamide (Mydracyl, Alcon Canada, Mississauga, Ontario, Canada) applied on the corneal surface, which was anesthetized with a drop of 0.5% propacaine hydrochloride (Alcaine, Alcon Canada, Mississauga, Ontario, Canada). Recordings were obtained with a DTL electrode (Shieldex 33/9 Thread; Statex, Bremen, Germany) shaped into a loop and placed on the corneal surface. Ground and reference electrodes (Grass Technologies, Astro-Med, Brossard, Quebec, Canada) were placed in the tail and in the mouth, respectively. Flash stimulations were administered with white light generated by light-emitting diodes (for scotopic ERG) and by xenon flashes (for photopic ERG) housed in the Ganzfeld Color Dome (Espion, Diagnosys LLC, Littleton, Massachusetts) to achieve full retinal stimulation. Photopic and scotopic ERGs were performed on different mice.

Scotopic ERG was used to assess rod function. After overnight dark adaptation, animals were prepared for ERG recording under a dim red light. Scotopic luminance-response function was obtained with 10 increasing single white flash stimulus strengths, ranging from -3.62 to 0.46 log cd·s/m<sup>2</sup>, with interstimuli interval set at 15 seconds (first 4 intensities) and 30 seconds (last 6 intensities). Photopic ERG was used to assess cone function. Animals were light-adapted for 10 minutes to a light background set at 30 cd/m<sup>2</sup>. A photopic luminance-response function was generated with 9 stimulus strengths of brief flashes, ranging from -0.81 to 2.86 log cd·s/m<sup>2</sup>, with an interstimuli interval set at 15 seconds (first 3 intensities) and 30 seconds (last 6 intensities). In both

scotopic and photopic condition, for each stimulus strength, at least 4 responses or more were averaged in order to achieve a high signal-to-noise ratio and confirm the reproducibility of the response.

## Data Analysis

The ERG response is primarily composed of a negative wave called the a-wave, followed by a positive component, the b-wave. The a-wave is generated mainly by the photoreceptors, whereas the b-wave originates from the bipolar cells. By convention, a-wave amplitude is measured from the baseline to trough and the b-wave from the trough of the a-wave to the peak of the b-wave (figure 3.1). On the ascending part of the b-wave, the oscillatory potentials (OPs) can be observed. Although their exact origin is still unclear, it is believed that they could result from the interaction between bipolar cells, amacrine cells and ganglion cells [34].

As per Hébert *et al.* [35], the b-wave amplitudes were plotted against flash luminance to generate the photopic and scotopic luminance response function (LRF) from which two parameters were derived, namely  $V_{max}$  and  $\log K$ .  $V_{max}$  refers to the maximal b-wave amplitude where the system saturation occurs. In scotopic condition,  $V_{max}$  was selected at the end of the plateau before cones intrusion.  $\log K$  is interpreted as retinal sensitivity and represents the intensity necessary to reach half of the  $V_{max}$ . In the current study, to avoid some subjectivity in the selection of the  $V_{max}$  parameter individually, the  $V_{max}$  was set at  $2.86 \log \text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  in photopic condition and at  $-0.0105 \log \text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  in scotopic condition. The latter intensities were selected after visual inspection of the averaged luminance response functions in a group of 10 WT mice. As a complimentary measure for retinal sensitivity, the criterion threshold intensity ( $T_{50\mu\text{V}}$ ) was calculated. This criterion is also derived from the luminance-response function and represents the flash luminance necessary to reach a b-wave amplitude of  $50 \mu\text{V}$  [4].

OPs were directly extracted from ERG recording by the Espion software in photopic condition or digitally extracted with a Butterworth filter (bandpass: 75-300 Hz, attenuation: -6 dB) using MATLAB R2012a (MathWorks, Natick, Massachusetts) in scotopic condition. The sum of OPs was

used for analysis. Because OPs are components of the b-wave, the ratio  $V_{max}/\text{sum of OPs}$  amplitude was also used to provide a relative measure of OPs contribution to the b-wave amplitude.

Repeated-measures analyses of variance were performed to assess the difference between WT and homozygous mutant mice in all the ERG parameters (a- and b-wave amplitude and implicit time) in photopic and scotopic conditions. Analysis of the ERG also included the logK as well as the value of the ERG parameters observed at the  $V_{max}$  including OPs. The later variables were analyzed with independent *t*-tests to compare WT and mutant mice and are presented with the standard deviation (SD). All analyses were conducted using SPSS for Windows (version 15.0; SPSS, Chicago, Illinois).

### **Analysis of Retinal and Striatal Monoamine Levels by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Microdialysis**

Retina and striatum were isolated from mice and homogenized in 10 volumes of 0.1 mol/L of perchloric acid ( $\text{HClO}_4$ ). The protocol for HPLC determination of tissue dopamine and serotonin levels has been described previously in Beaulieu *et al.* [23]. Extracellular dopamine concentrations in the striatum were evaluated by conventional microdialysis (flow rate 1  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) as described in Gainetdinov *et al.* [36].

## **Results**

### **ERG of Tph2-KI Mice**

Figure 3.2 presents, for each stimulus strength, the results for a- and b-wave amplitude and implicit time of WT and Tph2-KI mice in photopic and scotopic condition. In photopic condition, the repeated-measures analysis of variance showed that the luminance-response function of b-wave implicit time was significantly different between the two groups [ $F(1,15) = 6.30$ ;  $p = 0.024$ ]. Post hoc comparisons revealed that the b-wave implicit time was in fact longer in Tph2-KI mice at almost every intensity tested including the  $V_{max}$  (WT =  $24.25 \pm 0.46$  ms, Tph2-KI =  $25.22 \pm 0.83$  ms;  $p = 0.011$ ) as seen in figure 3.2D. No change could be observed in the other ERG parameters or in the OPs. In scotopic condition, none of the ERG parameters or OPs was significantly changed in mutants

compared with WT mice. Typical ERG and OPs filtered traces are presented in figure 3.3 for both WT and Tph2-KI mice.

No change was found ( $p = 0.6410$ ) in serotonin tissue content in the retina between WT ( $0.021 \pm 0.002$  ng/mg) and Tph2-KI ( $0.018 \pm 0.009$  ng/mg) mice (figure 3.4A). By comparison, in agreement with a previous report [23], a significant decrease in striatal serotonin was observed ( $p < 0.001$ ) in Tph2-KI mice ( $0.15 \pm 0.02$  mg/kg) compared to WT mice ( $0.89 \pm 0.06$  mg/kg) as seen in figure 3.4B.

### **ERG of DAT-KO mice**

Figure 3.5 presents, for each stimulus strength, the results for a- and b-wave amplitude and implicit time of WT and DAT-KO mice in photopic and scotopic condition. In photopic condition, no significant change could be observed in  $V_{max}$ ,  $\log K$ , amplitude and implicit time of a- and b-wave. In scotopic condition, a right shift along the X-axis can be observed in DAT-KO mice (see Figure 3.5F), which was confirmed statistically [ $F(1,25) = 5.44$ ;  $p = 0.028$ ], suggesting a decrease in retinal sensitivity. Post hoc analyses revealed that it was the linear part of the two curves that was statistically different, whereas  $V_{max}$  reached the same amplitude in WT and DAT-KO mice. The values of  $\log K$  were  $-1.97 \pm 0.07$  log units and  $-1.81 \pm 0.19$  log units in WT and DAT-KO mice respectively, representing a significant decrease in retinal sensitivity of 0.16 log units in mutant mice ( $p = 0.014$ ). The intensity to reach the  $T50\mu V$  criterion value was also significantly increased ( $p = 0.017$ ) in DAT-KO mice ( $-3.07 \pm 0.42$  log units) compared to WT mice ( $-3.42 \pm 0.29$  log units), which further confirms a decrease in scotopic retinal sensitivity in DAT-KO mice. None of the other parameters was affected in DAT-KO mice in scotopic condition. No difference was reported in the sum of OPs in both photopic and scotopic conditions. Typical ERG and OPs filtered traces are presented in figure 3.6 for both WT and DAT-KO mice.

No change was found ( $p = 0.5961$ ) in dopamine tissue content in the retina between WT ( $0.16 \pm 0.06$  ng/mg) and DAT-KO ( $0.18 \pm 0.04$  ng/mg) mice (figure 3.4C). At the same time, striatal dialysate levels of dopamine (figure 3.4D) were significantly increased ( $p < 0.01$ ) in DAT-KO mice

( $5.30 \pm 0.65$  nM) compared to WT mice ( $1.52 \pm 0.18$  nM), supporting previous observations on increased brain extracellular levels of dopamine in these mutants [16].

### ERG of D1R knockout Mice

Figure 3.7 presents, for each stimulus strength, the results for a- and b-wave amplitude and implicit time of WT and D1R-KO mice in photopic and scotopic condition. In photopic condition, a significant difference between the luminance-response functions of the two groups was observed [ $F(1,21) = 17.81$ ;  $p < 0.001$ ]. Post hoc analyses showed that b-wave amplitude was lower in D1R-KO mice at almost every intensity, with the  $V_{max}$  being approximately 22% significantly lower ( $p = 0.002$ ) in mutant mice ( $270.95 \pm 49.39$   $\mu$ V) when compared to WT mice ( $346.29 \pm 49.66$   $\mu$ V) as seen in figure 3.7B. A significant difference was also found between the two groups [ $F(1,21) = 14.84$ ;  $p = 0.001$ ] for the b-wave implicit time, the latter being significantly longer at  $V_{max}$  ( $p = 0.002$ ) in D1R-KO mice ( $30.73 \pm 2.33$  ms) when compared to WT mice ( $27.75 \pm 1.82$  ms) as well as at most intensities used to generate the luminance-response function (figure 3.7D). No significant change could be observed in the other measured parameters in photopic condition, namely the a-wave amplitude, the logK and the a-wave implicit time. In scotopic condition, the luminance-response function of the b-wave amplitude was significantly different between the two groups [ $F(1,30) = 25.84$ ;  $p < 0.001$ ]. This difference was observed for all intensities, including the  $V_{max}$ , which was on average 20% significantly lower ( $p < 0.001$ ) in D1R-KO mice ( $385.39 \pm 54.55$   $\mu$ V) when compared with WT mice ( $480.58 \pm 50.67$   $\mu$ V), as seen in figure 3.7F. No difference was found in the other parameters in scotopic condition, such as the a-wave amplitude, logK and the a- and b-wave implicit times. This suggests that both the photopic and scotopic  $V_{max}$  seem to be affected in a similar magnitude by the loss of the D1 receptor. Analysis of the OPs revealed a significant decrease of the sum of OPs in D1R-KO mice in both photopic condition ( $307.30$   $\mu$ V  $\pm 72.30$ ;  $p = 0.005$ ) when compared with WT mice ( $423.70 \pm 101.60$   $\mu$ V) and scotopic condition ( $287.50 \pm 57.51$   $\mu$ V;  $p = 0.026$ ) when compared with WT mice ( $347.90 \pm 79.27$   $\mu$ V). However, no difference was observed in the ratio  $V_{max}$ /sum of OPs between WT and D1R-KO mice, suggesting a similar relative contribution of OPs in b-wave amplitude at  $V_{max}$ . Typical ERG and OPs filtered traces are presented in figure 3.8 for both WT and D1R-KO mice.

## ERG of D2R-KO Mice

Figure 3.9 presents, for each stimulus strength, the results for a- and b-wave amplitude and implicit time of WT and D2R-KO mice in photopic and scotopic condition. No significant change could be observed in a- and b-wave amplitude or implicit time in either photopic or scotopic condition. However, OPs were found to be significantly higher ( $p = 0.003$ ) in photopic condition in D2R-KO mice ( $327.80 \pm 41.25 \mu\text{V}$ ) when compared to WT mice ( $279.8 \pm 37.97 \mu\text{V}$ ). The ratio  $V_{\text{max}}/\text{sum}$  of OPs was found to be significantly lower ( $p = 0.026$ ) in D2R-KO mice ( $1.44 \pm 0.10$ ) when compared with WT mice ( $1.54 \pm 0.12$ ). A higher ratio is indicative of lower relative contribution of OPs where a lower ratio is indicative of a higher relative contribution of OPs in  $V_{\text{max}}$  amplitude. Typical ERG and OPs filtered traces are presented in figure 3.10 for both WT and D2R-KO mice.

## Discussion

The present results indicate that a change in central monoamine neurotransmission can affect the ERG responses, and thus brain rather than retinal monoaminergic dysfunction might be implicated in the retinal anomalies reported in patients with psychiatric disorders. We observed that an increase in central dopaminergic tone diminishes retinal sensitivity in scotopic condition, and a decrease in central serotonin neurotransmission extends the b-wave implicit time in photopic condition. However, an important finding in our study is that, in contrast to remarkable alterations in brain levels of monoamines, no changes were found in retinal dopamine and serotonin tissue content in Tph2-KI and DAT-KO mice, respectively. This represents the first demonstration of the role of central monoamine neurotransmission in modulating the ERG response. As a secondary finding, we also report the detection of dopamine and serotonin in the retina of mice, with serotonin concentration being about 13% of the amount of retinal dopamine, which supports the previous estimations [18]. Furthermore, the present data suggest that D1R and D2R may be involved in the generation of OPs. Nevertheless, OPs seem to have a higher relative contribution in  $V_{\text{max}}$  amplitude in D2R-KO mice. However, a few studies have reported the measure of OPs in patients with psychiatric disorders, and none have been able to demonstrate any changes in OPs amplitude [37, 38].

One of the most studied psychiatric disorders with the ERG is the SAD syndrome [3-6] which is characterized by recurrent depressive episodes in the fall and winter with remission in the spring and summer. The etiology of SAD is not clear but it is agreed that the occurrence of the disorder is linked with the duration of the day, namely the photoperiod, and that patients with SAD demonstrate a good response to bright light therapy [39]. When measuring rod function, a decrease in retinal sensitivity was first observed in patients affected with a milder form of depression, namely subsyndromal SAD sufferers [3] and subsequently in patients with SAD [4, 5]. Furthermore, in addition to the rod sensitivity decrease, the assessment of cone function revealed that SAD patients also demonstrated a lower cone-driven b-wave amplitude and a lengthening of cone-driven b-wave implicit time during the depressive episode [5]. These changes in rods and cones ERGs were shown to normalize in summer time or after a 4-weeks bright light therapy treatment [5], suggesting that the retinal anomalies observed in this disorder represent a state marker.

Interestingly, two of the animal models used herein reproduce different ERG anomalies reported in patients with SAD and further confirm the role of these neurotransmitters in this disorder. First, variations in serotonin expression due to seasonal changes in light availability in northern latitudes were suspected to be implicated in SAD. In fact, higher serotonin transporter density is associated with lower synaptic serotonin level and it has been demonstrated that serotonin transporter binding was higher in the fall and winter in humans [40]. Intriguingly, it has been reported that serotonin transporter might be in a hyperfunctional state during depression in SAD [41]. In Tph2-KI mice, in which a decrease of approximately 80% in brain serotonin was observed [23], the only parameter that was changed was an increase of the b-wave implicit time in photopic condition. A longer photopic b-wave implicit time was also observed in patients with SAD during depressive episodes [5]. That genetic mutation of Tph2-KI mice does not affect the serotonin tissue content in the retina suggests that a decrease in brain serotonin might be sufficient to modify the b-wave implicit time in photopic condition.

In DAT-KO mice, we observed a decrease in the rod-driven b-wave amplitude for intensities below the  $V_{max}$ , which represents a decrease in retinal sensitivity. LogK value was changed of 0.16 log unit in DAT-KO mice in scotopic condition, which corroborates the decrease in rod sensitivity of 0.13 log unit reported in patients with SAD [5]. As per Hébert *et al.* [4], the latter change was also

corroborated with another means to assess retinal sensitivity which is the T50 $\mu$ V criterion. Of interest, Neumeister *et al.* [42] observed a decrease in DAT density in the left striatum of SAD patients. DAT-KO mice have a five-fold increase in extracellular dopamine as measured by microdialysis in the striatum [16], but no change in retinal dopamine level was found in these mutants. Intriguingly, a hyperdopaminergic dysfunction has been proposed in SAD, among other hypotheses [43-47]. Our study in mice seems to favor the hypothesis that the decrease in retinal sensitivity observed in SAD patients could be similar to that observed under conditions of increased central dopamine neurotransmission.

Although increase in central dopamine may explain some of the changes observed in SAD, the modulation of specific dopamine receptor is not sufficient to fully explain these effects. Indeed, D1R-KO mice displayed lowered b-wave Vmax of approximately 20% and 22% at the rod and cone level, respectively, which indicates that the dopamine D1 receptor is implicated in the maximal gain in response amplitude of both cones and rods as measured with the ERG. Herrmann *et al.* [48] reported a similar result in D1R-KO mice in scotopic condition and suggested that the light response of depolarizing “ON” bipolar cells is driven by sustained chloride currents via GABA<sub>A</sub> receptor channels controlled by D1R. These scotopic results are strikingly similar to those observed in young offspring at high risk to develop schizophrenia or bipolar disorder where a decrease of rod Vmax (approximately 23%) and an increase of b-wave implicit time were also found [9]. Of interest, dopamine deregulation and altered dopamine D1R signaling in prefrontal cortex are known to be associated with deficit in working memory in patients with schizophrenia [49] and impairments in verbal and visual episodic memory have also been observed in young offspring at high risk to develop schizophrenia or bipolar disorder [50].

Previous studies in humans and animals in which dopamine or serotonin neurotransmission was altered yielded variable effects on the ERG parameters [25-30, 51]. The inconsistent results in pharmacological studies may be explained by the temporal dynamics of the effects of antagonists and agonists and their selectivity [52]. Therefore, the current study provided an advantage in using genetically engineered animals in which we were able to investigate the consequence of persistent changes in central dopamine and serotonin transmission, as opposed to acute dynamic changes due to the use of pharmacological drugs. Although these mutant mice might represent models that are

closer to what would be expected to occur in patients with psychiatric disorders, the changes in transgenic animals may also result from adaptation to chronic changes arising from permanent loss or gain of gene function. This being said, the same might also occur in human diseases, where a persistent deficit in neurotransmitter(s) or receptor(s) may yield similar compensatory changes [53], especially because the Tph2-KI used in this study carry a gene variant identified in humans [22]. At the moment, the way central monoamines can affect the ERG response remains unknown. Among several potential mechanisms, one hypothesis suggests that ERG may be modulated by central monoamines via peripheral hormonal variations [54] or via the retinopetal axons [18], but further detailed studies are necessary to uncover the mechanisms of this regulation.

In summary, we demonstrate here that an increase in central extracellular dopamine in mice affects the rods sensitivity in the same magnitude as that observed in patients with psychiatric disorders such as SAD. We also report that a decrease in central serotonin can impact the b-wave implicit time in photopic condition, a parameter that is also changed in SAD patients. Furthermore, because dopamine and serotonin tissue contents in the retina were not changed in these animal models, in remarkable contrast to their brain levels, the observed ERG differences are likely caused by central monoaminergic dysfunction. We also demonstrated that D1R can modulate the maximal response of rods and cones, whereas D2R barely impacts the ERG parameters. Thus, the ERG anomalies found in patients with psychiatric disorders might represent possible biomarkers of central monoaminergic dysfunctions. In conclusion, these results provide further support to the idea that the ERG could be a valuable tool in psychiatric research.

## **Acknowledgements**

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (NSA 93798 to J-MB and MOP 82707 to MH). JL is recipient of fellowships from the Fonds de recherche du Québec – Santé and the Centre de recherche sur le cerveau, le comportement et la neuropsychiatrie. J-MB is a National Alliance for Research on Schizophrenia and Depression Vital Projects Fund Investigator and holds a Canada Research Chair in Molecular Psychiatry.

We thank Nathalie Bouchard and Kathye Aubé for assistance maintaining mouse colonies; Dr. Marc G. Caron (Duke University Medical Center, Durham, North Carolina) for generously providing D1R-KO and DAT-KO mice; as well as Damiana Leo, Jeanne Sophie Martin and Mathieu Gauvin for valuable help with certain experimental protocols.

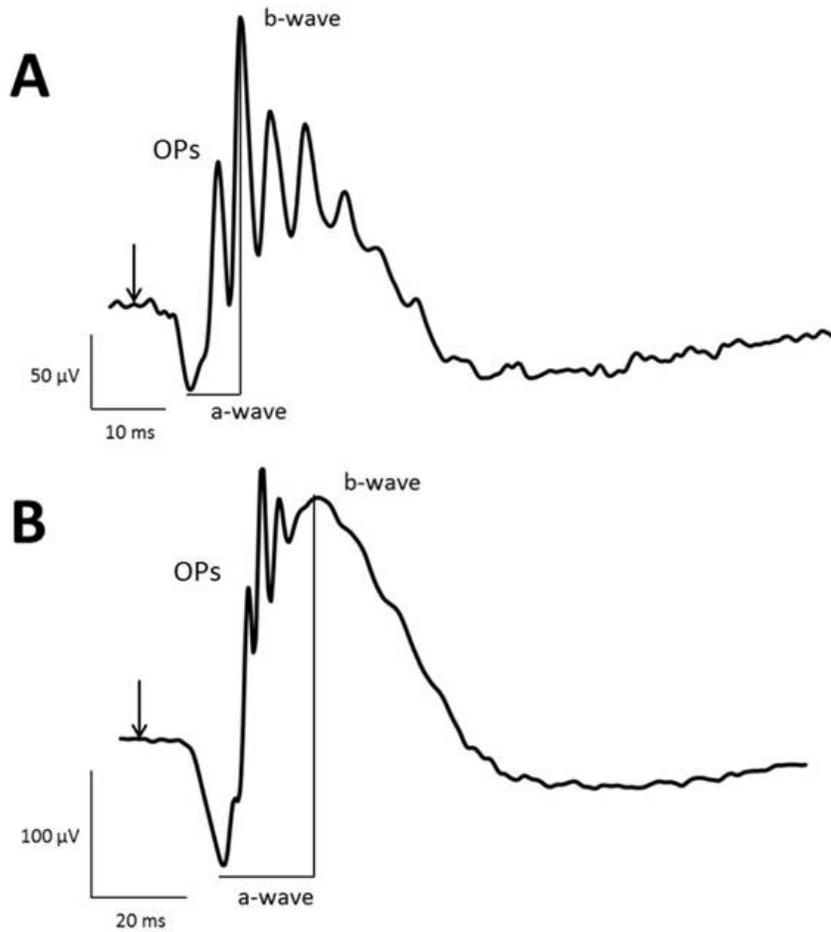
All authors reported no biomedical financial interests or potential conflicts of interest.

## References

1. Balogh, Z., G. Benedek, and S. Keri, *Retinal dysfunctions in schizophrenia*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2008. **32**(1): p. 297-300.
2. Warner, R., et al., *Retinal function as a marker for cell membrane omega-3 fatty acid depletion in schizophrenia: a pilot study*. Biol Psychiatry, 1999. **45**(9): p. 1138-42.
3. Hebert, M., M. Dumont, and P. Lachapelle, *Electrophysiological evidence suggesting a seasonal modulation of retinal sensitivity in subsyndromal winter depression*. J Affect Disord, 2002. **68**(2-3): p. 191-202.
4. Hebert, M., et al., *Electroretinography in patients with winter seasonal affective disorder*. Psychiatry Res, 2004. **127**(1-2): p. 27-34.
5. Lavoie, M.P., et al., *Evidence of a biological effect of light therapy on the retina of patients with seasonal affective disorder*. Biol Psychiatry, 2009. **66**(3): p. 253-8.
6. Lam, R.W., et al., *Electroretinography in seasonal affective disorder*. Psychiatry Res, 1992. **43**(1): p. 55-63.
7. Ritvo, E.R., et al., *Electroretinograms in autism: a pilot study of b-wave amplitudes*. Am J Psychiatry, 1988. **145**(2): p. 229-32.
8. Jaffe, M.J., et al., *Ganzfeld electroretinographic findings in parkinsonism: untreated patients and the effect of levodopa intravenous infusion*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1987. **50**(7): p. 847-52.
9. Hebert, M., et al., *Retinal response to light in young nonaffected offspring at high genetic risk of neuropsychiatric brain disorders*. Biol Psychiatry, 2010. **67**(3): p. 270-4.
10. Reis, R.A., et al., *Dopaminergic signaling in the developing retina*. Brain Res Rev, 2007. **54**(1): p. 181-8.
11. Witkovsky, P., *Dopamine and retinal function*. Doc Ophthalmol, 2004. **108**(1): p. 17-40.
12. Beaulieu, J.M. and R.R. Gainetdinov, *The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors*. Pharmacol Rev, 2011. **63**(1): p. 182-217.
13. Nguyen-Legros, J., et al., *Immunocytochemical localization of dopamine D1 receptors in the retina of mammals*. Vis Neurosci, 1997. **14**(3): p. 545-51.
14. Doi, M., et al., *Impaired light masking in dopamine D2 receptor-null mice*. Nat Neurosci, 2006. **9**(6): p. 732-4.
15. Kuhar, M.J., et al., *Dopamine transporter: biochemistry, pharmacology and imaging*. Eur Neurol, 1990. **30 Suppl 1**: p. 15-20.
16. Gainetdinov, R.R., S.R. Jones, and M.G. Caron, *Functional hyperdopaminergia in dopamine transporter knock-out mice*. Biol Psychiatry, 1999. **46**(3): p. 303-11.
17. Jones, S.R., et al., *Profound neuronal plasticity in response to inactivation of the dopamine transporter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(7): p. 4029-34.
18. Gastinger, M.J., et al., *Retinopetal axons in mammals: emphasis on histamine and serotonin*. Curr Eye Res, 2006. **31**(7-8): p. 655-67.
19. Zhang, X., et al., *Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis*. Science, 2004. **305**(5681): p. 217.
20. Walther, D.J., et al., *Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform*. Science, 2003. **299**(5603): p. 76.
21. Liang, J., et al., *Diurnal rhythms of tryptophan hydroxylase 1 and 2 mRNA expression in the rat retina*. Neuroreport, 2004. **15**(9): p. 1497-500.

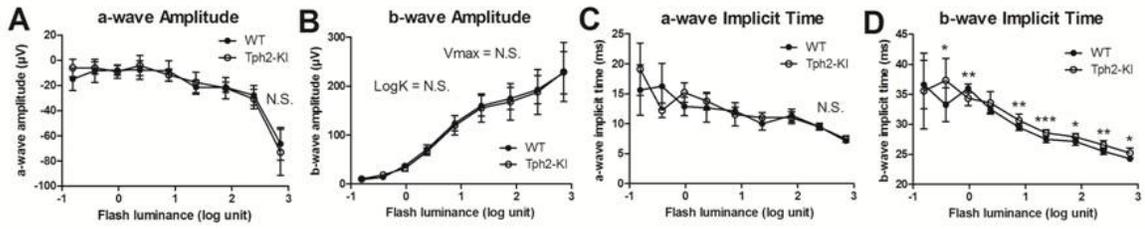
22. Zhang, X., et al., *Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression*. *Neuron*, 2005. **45**(1): p. 11-6.
23. Beaulieu, J.M., et al., *Role of GSK3 beta in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(4): p. 1333-8.
24. Jacobsen, J.P., et al., *Deficient serotonin neurotransmission and depression-like serotonin biomarker alterations in tryptophan hydroxylase 2 (Tph2) loss-of-function mice*. *Mol Psychiatry*, 2012. **17**(7): p. 694-704.
25. Huppe-Gourgues, F., et al., *Effects of the intravitreal administration of dopaminergic ligands on the b-wave amplitude of the rabbit electroretinogram*. *Vision Res*, 2005. **45**(2): p. 137-45.
26. Porciatti, V., et al., *Serotonin depletion modifies the pigeon electroretinogram*. *Doc Ophthalmol*, 1989. **72**(1): p. 93-100.
27. Nakatsuka, K. and D.I. Hamasaki, *Destruction of the indoleamine-accumulating amacrine cells alters the ERG of rabbits*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1985. **26**(8): p. 1109-16.
28. Skrandies, W. and H. Wassle, *Dopamine and serotonin in cat retina: electroretinography and histology*. *Exp Brain Res*, 1988. **71**(2): p. 231-40.
29. Holopigian, K., et al., *The effects of dopamine blockade on the human flash electroretinogram*. *Doc Ophthalmol*, 1994. **86**(1): p. 1-10.
30. Schneider, T. and E. Zrenner, *Effects of D-1 and D-2 dopamine antagonists on ERG and optic nerve response of the cat*. *Exp Eye Res*, 1991. **52**(4): p. 425-30.
31. Giros, B., et al., *Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter*. *Nature*, 1996. **379**(6566): p. 606-12.
32. Drago, J., et al., *Altered striatal function in a mutant mouse lacking D1A dopamine receptors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(26): p. 12564-8.
33. Kelly, M.A., et al., *Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D2 receptor-deficient mice*. *Neuron*, 1997. **19**(1): p. 103-13.
34. Wachtmeister, L., *Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal*. *Prog Retin Eye Res*, 1998. **17**(4): p. 485-521.
35. Hebert, M., P. Lachapelle, and M. Dumont, *Reproducibility of electroretinograms recorded with DTL electrodes*. *Doc Ophthalmol*, 1995. **91**(4): p. 333-42.
36. Gainetdinov, R.R., et al., *Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity*. *Science*, 1999. **283**(5400): p. 397-401.
37. Schechter, G., et al., *Electroretinographic assessment in schizophrenia*. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl*, 1987. **40**: p. 746-51.
38. Marmor, M.F., et al., *Oscillatory potentials as a marker for dopaminergic disease*. *Doc Ophthalmol*, 1988. **69**(3): p. 255-61.
39. Westrin, A. and R.W. Lam, *Seasonal affective disorder: a clinical update*. *Ann Clin Psychiatry*, 2007. **19**(4): p. 239-46.
40. Praschak-Rieder, N., et al., *Seasonal variation in human brain serotonin transporter binding*. *Arch Gen Psychiatry*, 2008. **65**(9): p. 1072-8.
41. Willeit, M., et al., *Enhanced serotonin transporter function during depression in seasonal affective disorder*. *Neuropsychopharmacology*, 2008. **33**(7): p. 1503-13.
42. Neumeister, A., et al., *Dopamine transporter availability in symptomatic depressed patients with seasonal affective disorder and healthy controls*. *Psychol Med*, 2001. **31**(8): p. 1467-73.
43. Gagne, A.M., et al., *[When a season means depression]*. *Med Sci (Paris)*, 2010. **26**(1): p. 79-82.

44. Oren, D.A., et al., *Circadian profiles of cortisol, prolactin, and thyrotropin in seasonal affective disorder*. Biol Psychiatry, 1996. **39**(3): p. 157-70.
45. Depue, R.A., et al., *Seasonal independence of low prolactin concentration and high spontaneous eye blink rates in unipolar and bipolar II seasonal affective disorder*. Arch Gen Psychiatry, 1990. **47**(4): p. 356-64.
46. Karson, C.N., *Spontaneous eye-blink rates and dopaminergic systems*. Brain, 1983. **106** (Pt 3): p. 643-53.
47. Depue, R.A., et al., *Seasonal and mood independence of low basal prolactin secretion in premenopausal women with seasonal affective disorder*. Am J Psychiatry, 1989. **146**(8): p. 989-95.
48. Herrmann, R., et al., *Rod vision is controlled by dopamine-dependent sensitization of rod bipolar cells by GABA*. Neuron, 2011. **72**(1): p. 101-10.
49. Goldman-Rakic, P.S., et al., *Targeting the dopamine D1 receptor in schizophrenia: insights for cognitive dysfunction*. Psychopharmacology (Berl), 2004. **174**(1): p. 3-16.
50. Maziade, M., et al., *Verbal and visual memory impairments among young offspring and healthy adult relatives of patients with schizophrenia and bipolar disorder: selective generational patterns indicate different developmental trajectories*. Schizophr Bull, 2011. **37**(6): p. 1218-28.
51. Citron, M.C., et al., *Modification of electroretinograms in dopamine-depleted retinas*. Brain Res, 1985. **345**(1): p. 186-91.
52. Roth, B.L., D.J. Sheffler, and W.K. Kroeze, *Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(4): p. 353-9.
53. Eells, J.B., *The control of dopamine neuron development, function and survival: insights from transgenic mice and the relevance to human disease*. Curr Med Chem, 2003. **10**(10): p. 857-70.
54. Bosse, R., et al., *Anterior pituitary hypoplasia and dwarfism in mice lacking the dopamine transporter*. Neuron, 1997. **19**(1): p. 127-38.

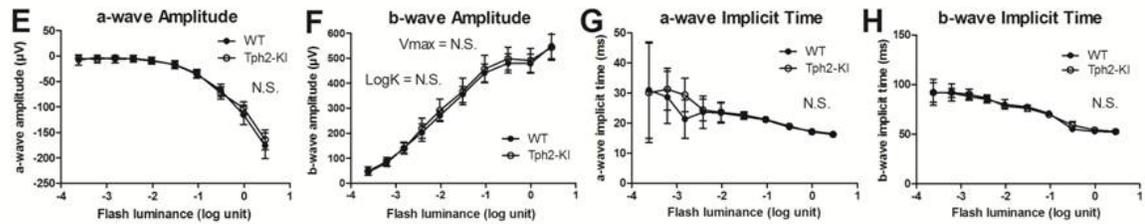


**Figure 3.1.** Example of mice electroretinogram waveform obtained at  $V_{max}$  in photopic (A) and scotopic (B) conditions. The photopic  $V_{max}$  was achieved at  $722 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  and scotopic  $V_{max}$  at  $0.98 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ . The a-wave amplitude is measured from the baseline to trough of the a-wave, and the b-wave is measured from trough of the a-wave to peak of the b-wave. The arrows indicate flash onset. OP: oscillatory potential.

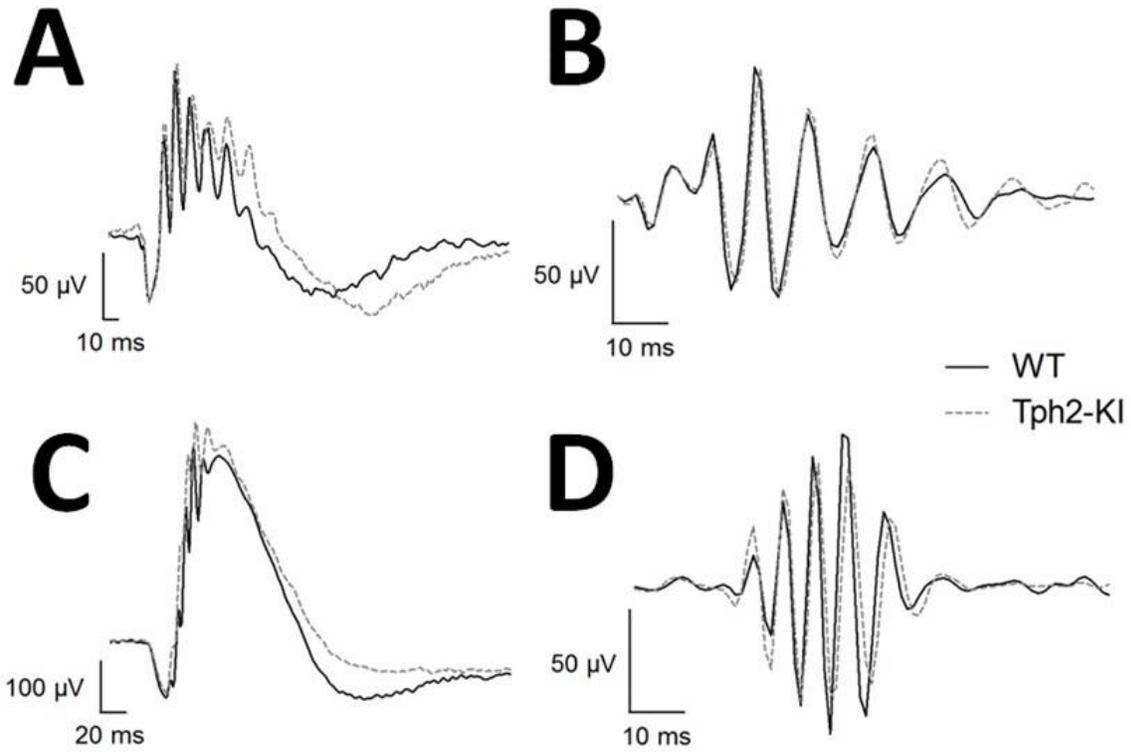
### Photopic Condition



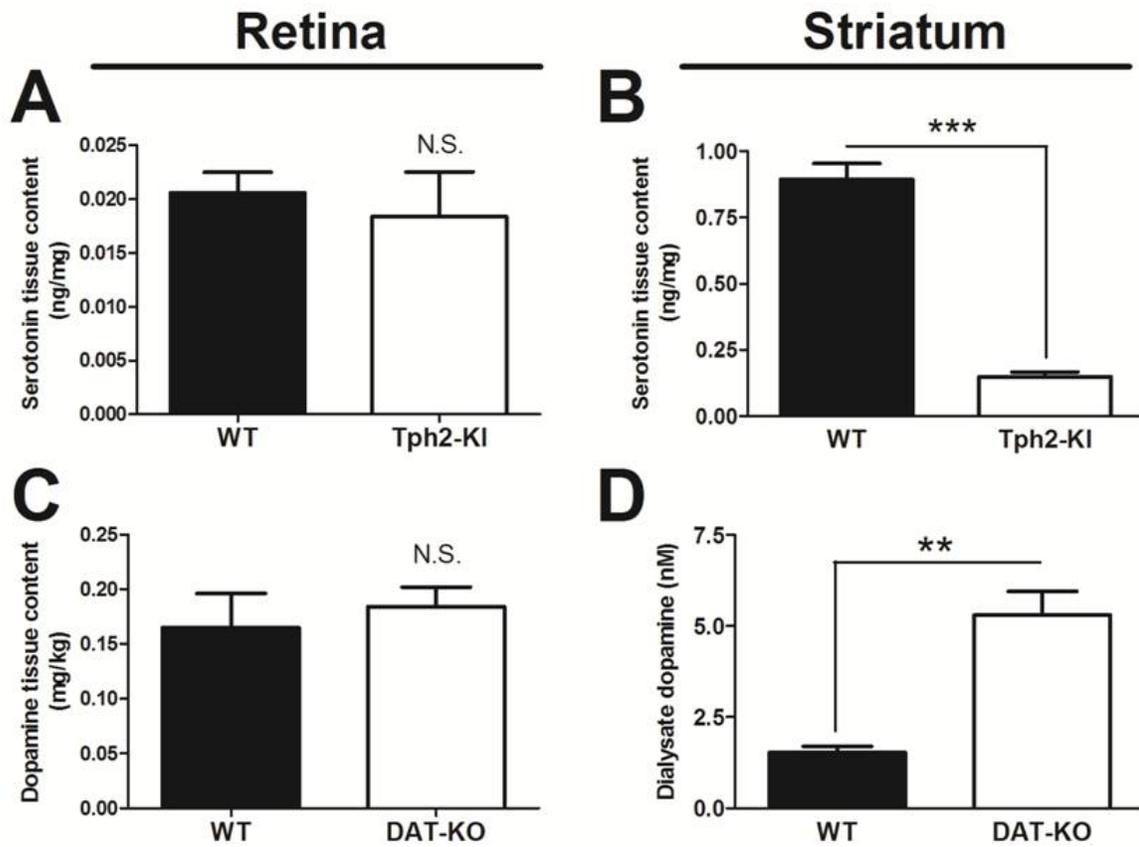
### Scotopic Condition



**Figure 3.2.** Photopic luminance-response function (LRF) between tryptophan hydroxylase 2 knockin (Tph2-KI) (n = 9) and wildtype (WT) (n = 8) mice for the a-wave amplitude (A), b-wave amplitude (B), a-wave implicit time (C) and b-wave implicit time (D). Scotopic luminance-response function between Tph2-KI (n = 8) and WT (n = 8) mice for the a-wave amplitude (E), b-wave amplitude (F), a-wave implicit time (G) and b-wave implicit time (H). Error bars represent the standard deviation (SD). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; N.S.: not significant.

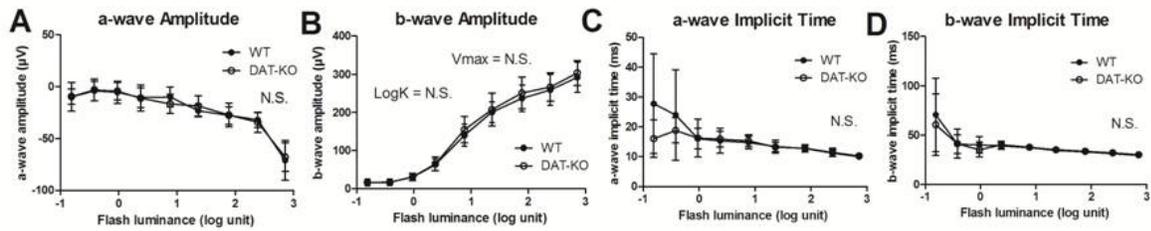


**Figure 3.3.** Examples of raw electroretinogram (ERG) traces and filtered oscillatory potential (OPs) in wildtype (WT) and Tph2-KI mice obtained at Vmax. The photopic Vmax was achieved at 722 cd·s/m<sup>2</sup> and scotopic Vmax at 0.98 cd·s/m<sup>2</sup>. (A) Photopic ERG and (B) photopic OPs. (C) Scotopic ERG and (D) scotopic OPs. A longer photopic b-wave implicit time was observed in Tph2-KI mice. None of the other ERG parameters or the OPs were changed in Tph2-KI mice compared to WT mice.

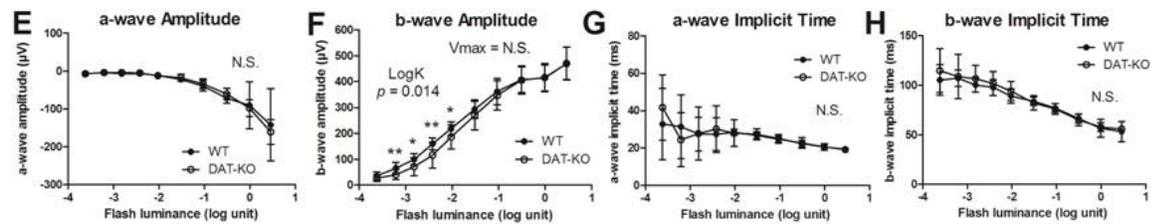


**Figure 3.4.** Serotonin tissue content in the retina (A) and in the striatum (B) of Tph2-KI and WT mice. Dopamine tissue content in the retina (C) and dialysate dopamine from the striatum (D) of DAT-KO and WT mice. Error bars represent the standard error of the mean (SEM). \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . Abbreviation as in figure 3.2.

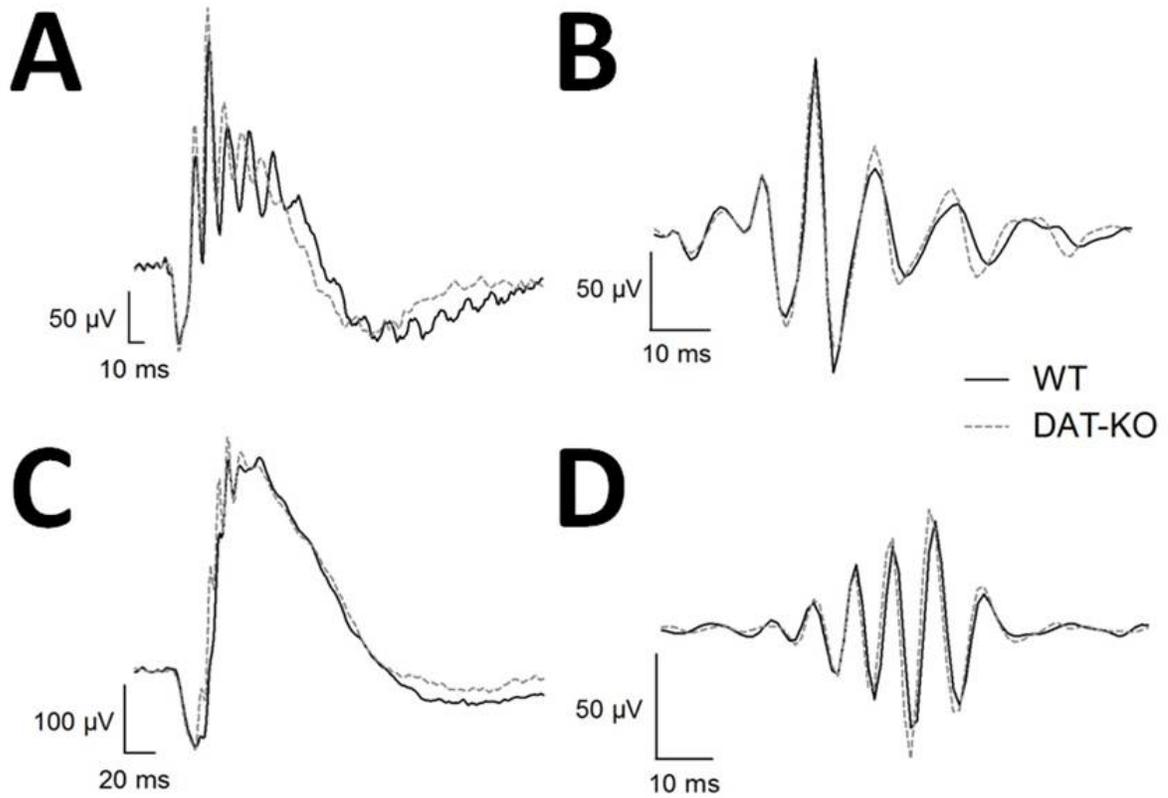
### Photopic Condition



### Scotopic Condition

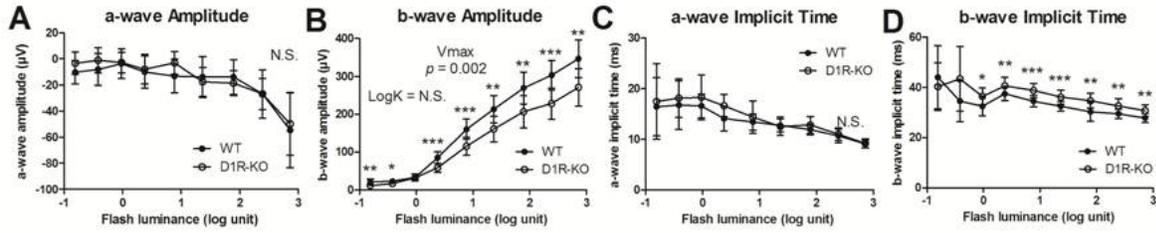


**Figure 3.5.** Photopic luminance-response function between dopamine transporter knockout (DAT-KO) ( $n = 12$ ) and wildtype (WT) ( $n = 12$ ) mice for the a-wave amplitude (A), b-wave amplitude (B), a-wave implicit time (C) and b-wave implicit time (D). Scotopic luminance-response function between DAT-KO ( $n = 12$ ) and WT ( $n = 15$ ) mice for the a-wave amplitude (E), b-wave amplitude (F), a-wave implicit time (G) and b-wave implicit time (H). Error bars represent the standard deviation (SD). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; N.S.: not significant.

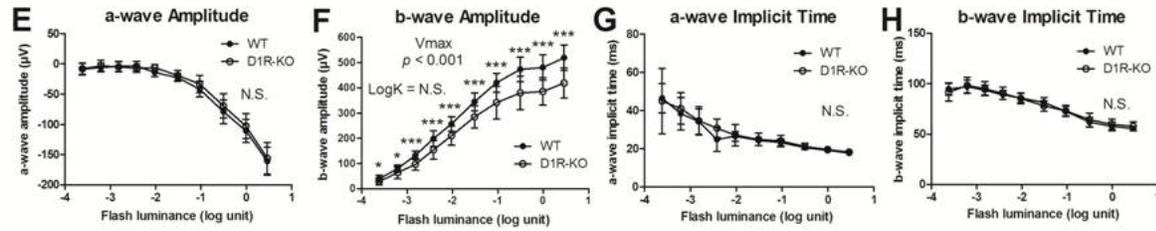


**Figure 3.6.** Examples of raw electroretinogram (ERG) traces and filtered oscillatory potential (OPs) in wildtype (WT) and DAT-KO mice obtained at  $V_{max}$ . The photopic  $V_{max}$  was achieved at  $722 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  and scotopic  $V_{max}$  at  $0.98 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ . (A) Photopic ERG and (B) photopic OPs. (C) Scotopic ERG and (D) scotopic OPs. No significant change could be observed in the ERG parameters or in the OPs at  $V_{max}$  intensities in DAT-KO mice.

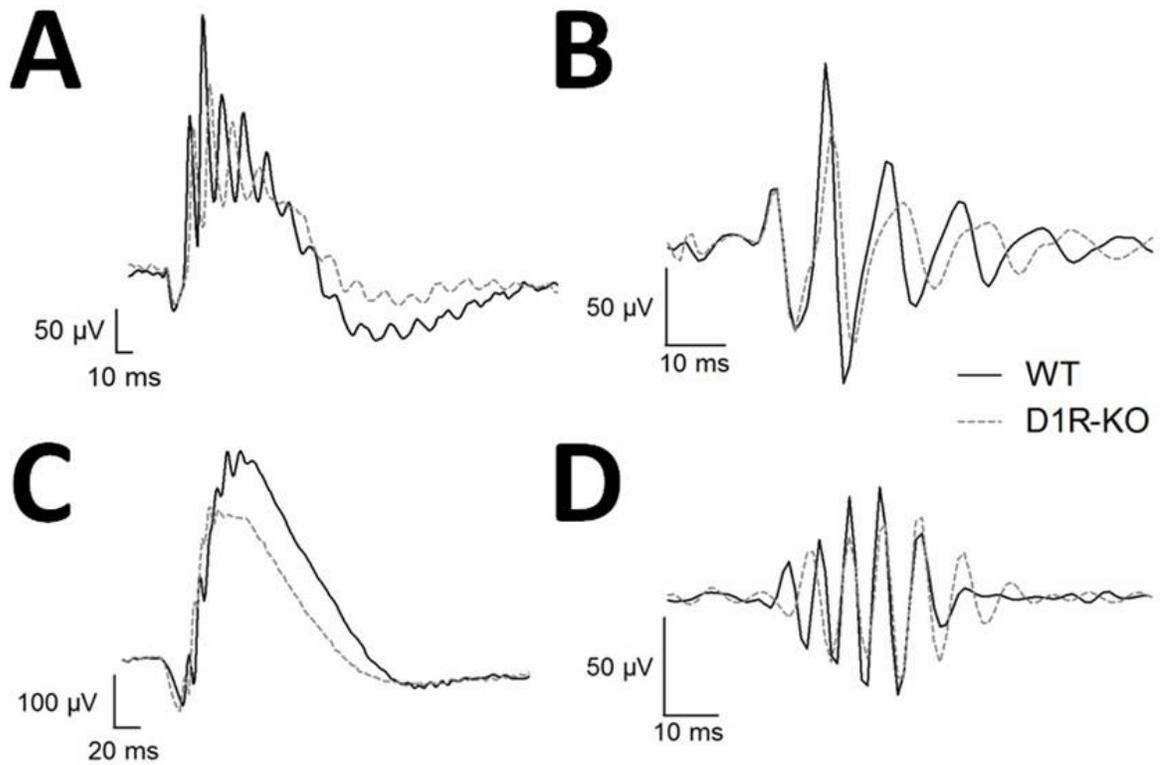
### Photopic Condition



### Scotopic Condition

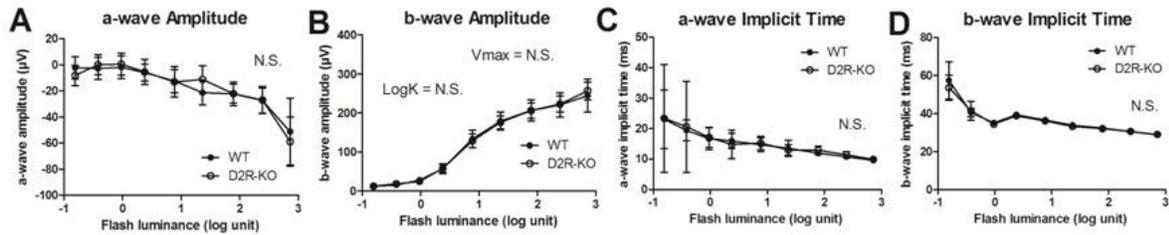


**Figure 3.7.** Photopic luminance-response function (LRF) between dopamine D1 receptor knockout (D1R-KO) ( $n = 11$ ) and wildtype (WT) ( $n = 12$ ) mice for the a-wave amplitude (A), b-wave amplitude (B), a-wave implicit time (C) and b-wave implicit time (D). Scotopic luminance-response function between D1R-KO ( $n = 15$ ) and WT ( $n = 17$ ) mice for the a-wave amplitude (E), b-wave amplitude (F), a-wave implicit time (G) and b-wave implicit time (H). Error bars represent the standard deviation (SD). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; N.S.: not significant.

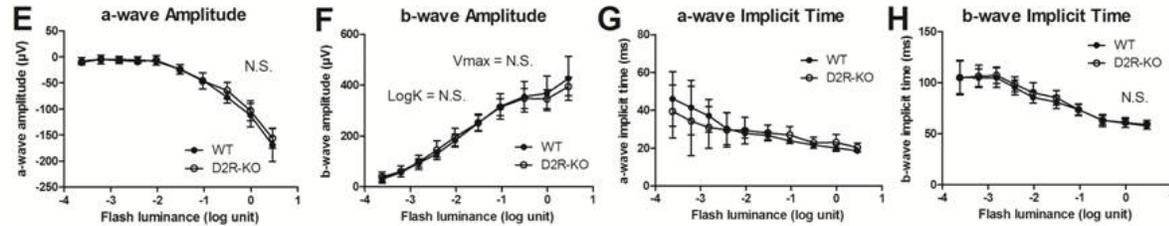


**Figure 3.8.** Examples of raw electroretinogram (ERG) traces and filtered oscillatory potential (OPs) in wildtype (WT) and D1R-KO mice obtained at  $V_{max}$ . The photopic  $V_{max}$  was achieved at  $722 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  and scotopic  $V_{max}$  at  $0.98 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ . (A) Photopic ERG and (B) photopic OPs. (C) Scotopic ERG and (D) scotopic OPs. A decrease in b-wave amplitude can be observed in D1R-KO mice in photopic and scotopic condition. b-wave implicit time was longer in HO mice compared to WT in photopic condition. The sum of OPs was also decreased in photopic and scotopic condition.

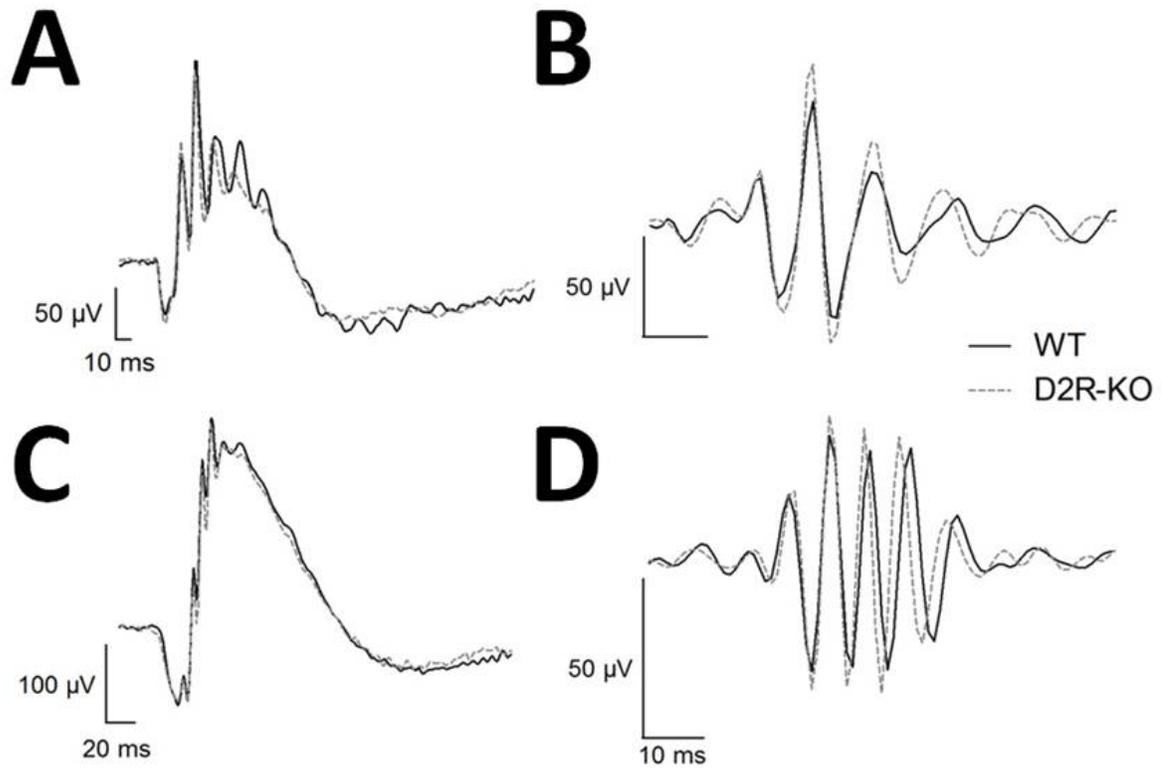
### Photopic Condition



### Scotopic Condition



**Figure 3.9.** Photopic luminance-response function (LRF) between dopamine D2 receptor knockout (D2R-KO) ( $n = 17$ ) and wildtype (WT) ( $n = 13$ ) mice for the a-wave amplitude (A), b-wave amplitude (B), a-wave implicit time (C) and b-wave implicit time (D). Scotopic luminance-response function between D2R-KO ( $n = 11$ ) and WT ( $n = 14$ ) mice for the a-wave amplitude (E), b-wave amplitude (F), a-wave implicit time (G) and b-wave implicit time (H). Error bars represent the standard deviation (SD). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; N.S.: not significant.



**Figure 3.10.** Examples of raw electroretinogram (ERG) traces and filtered oscillatory potential (OPs) in wildtype (WT) and D2R-KO mice obtained at  $V_{max}$ . The photopic  $V_{max}$  was achieved at  $722 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  and scotopic  $V_{max}$  at  $0.98 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ . (A) Photopic ERG and (B) photopic OPs. (C) Scotopic ERG and (D) scotopic OPs. No change in the ERG parameters were found to be significant in D2R-KO mice. The sum of OPs was significantly higher in D2R-KO mice compared to WT mice in photopic condition.



**CHAPITRE 4 : GLYCOGEN SYNTHASE KINASE-3  
OVEREXPRESSION REPLICATES ELECTRORETINOGRAM  
ANOMALIES OF OFFSPRING AT HIGH GENETIC RISK FOR  
SCHIZOPHRENIA AND BIPOLAR DISORDER**

**Troisième article**

Sous presse dans *Biological Psychiatry*  
(accepté le 27 août 2013 comme *Priority Communication*)

Utilisation de cette publication autorisée par Elsevier

## Résumé

**Problématique :** Des anomalies de l'électrorétinogramme (ERG) sont observées chez les patients atteints de troubles psychiatriques et pourraient potentiellement servir de biomarqueurs pour ces maladies. Par exemple, une diminution de l'amplitude de l'onde b des bâtonnets s'avère un endophénotype observé chez des enfants à haut risque génétique (HR) de développer la schizophrénie (SZ) ou la maladie bipolaire (BD). De plus, une diminution de l'amplitude de l'onde a des cônes et des bâtonnets a été démontrée chez les patients atteints de SZ. Cependant, les mécanismes moléculaires de ces anomalies demeurent inconnus. Plusieurs facteurs de risque pour la SZ et/ou la BD peuvent activer les isozymes de la glycogène synthase kinase-3 (GSK3 $\alpha$  et  $\beta$ ). Dans cette étude, nous examinons la contribution de la GSK3 $\alpha$  et  $\beta$  dans la réponse de l'ERG.

**Méthodes :** Un ERG des cônes et des bâtonnets a été mesuré chez des souris avec une augmentation (prpGSK3 $\beta$ ) ou une diminution (GSK3 $\beta^{+/-}$ ) de l'expression de la GSK3 $\beta$  ainsi que chez des souris knockout (KO) pour la GSK3 $\alpha$ .

**Résultats :** Chez les souris prpGSK3 $\beta$ , nous observons une diminution de l'amplitude de l'onde b des bâtonnets au Vmax, alors qu'une augmentation de ce paramètre est démontrée chez les souris GSK3 $\beta^{+/-}$ . Une augmentation de l'amplitude des ondes a et b des cônes au Vmax ainsi que de l'onde b des bâtonnets a été observée chez les souris GSK3 $\alpha$ -KO.

**Conclusion :** L'expression de la GSK3 peut moduler certains paramètres de l'ERG. Le phénotype observé chez les souris prpGSK3 $\beta$  corrobore ce qui a été démontré chez les HRs. Les anomalies de l'ERG retrouvées chez les souris GSK3 $\beta^{+/-}$  et GSK3 $\alpha$ -KO confirment une association entre l'amplitude de l'onde b des cônes et des bâtonnets avec l'expression des isozymes de la GSK3. Cela dit, des changements dans l'expression ou l'activité de GSK3 pourraient expliquer certaines anomalies de l'ERG chez les HRs et les patients avec SZ, ce qui supporte la validité des anomalies de l'ERG comme biomarqueurs des maladies psychiatriques.

# **Glycogen Synthase Kinase-3 Overexpression Replicates Electroretinogram Anomalies of Offspring at High Genetic Risk for Schizophrenia and Bipolar Disorder**

Joëlle Lavoie<sup>1,2,3</sup>, Marc Hébert<sup>1,3</sup>, Jean-Martin Beaulieu<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centre de recherche de l'Institut universitaire en santé mentale de Québec, Quebec City, Quebec, Canada; <sup>2</sup>Department of Psychiatry and Neuroscience, Faculty of Medicine, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada; <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, Otorhinolaryngology and Cervico facial Surgery, Faculty of Medicine, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada.

## **Corresponding Author:**

Jean-Martin Beaulieu, Ph.D.

2601, chemin de la canadière, F-6500

Quebec City, Quebec, Canada G1J 2G3

Phone: 418-663-5000 x6888

Fax: 418-663-8756

[martin.beaulieu@crulrg.ulaval.ca](mailto:martin.beaulieu@crulrg.ulaval.ca)

## Abstract

**Background:** Electroretinogram (ERG) anomalies occur in patients with psychiatric disorders and represent potential biomarkers for diagnosis. For instance, decreased rod ERG (b-wave amplitude at Vmax) is a biological endophenotype in young offspring at high genetic risk (HR) of schizophrenia (SZ) or bipolar disorder (BD). Also, a decrease in cone a-wave and rod a- and b-wave amplitude was observed in SZ patients. However, the biological underpinning of these anomalies remains unknown. Several genetic variants associated with enhanced risk for SZ and/or BD can activate glycogen synthase kinase-3 isozymes (GSK3 $\alpha$  and  $\beta$ ). Here, we examined the potential contribution of GSK3 $\alpha$  and  $\beta$  in the modulation of the ERG.

**Methods:** Cone and rod ERGs were recorded in mice having increased (prpGSK3 $\beta$  mice) or reduced (GSK3 $\beta^{+/-}$  mice) GSK3 $\beta$  expression and in GSK3 $\alpha$  knockout (KO) mice.

**Results:** In prpGSK3 $\beta$ , we observed a decrease in rod b-wave amplitude at Vmax, whereas enhanced b-wave amplitude at Vmax was found in GSK3 $\beta^{+/-}$  mice. An increase in cone a- and b-wave amplitude at Vmax and in rod b-wave amplitude at Vmax was observed in GSK3 $\alpha$ -KO mice.

**Conclusion:** GSK3 expression modulates some ERG parameters. The phenotype observed in prpGSK3 $\beta$  mice is consistent with observations made in HRs. ERG anomalies observed in GSK3 $\beta^{+/-}$  and GSK3 $\alpha$ -KO confirm an association between the rod and cone b-wave amplitude and the expression of GSK3 isozymes. Changes in GSK3 expression or activity may explain some ERG anomalies in HRs and patients, thus supporting the biological validity of ERG measurements as a valuable biomarker for psychiatric research.

**Keywords:** Electroretinogram; Glycogen synthase kinase-3; Biomarker; Schizophrenia; Bipolar disorder; Risk factor

## Introduction

Psychiatry research and clinical practice are limited by difficulties in obtaining quantitative biological data from the living brain. There is therefore a need to identify reliable surrogate biomarkers to better characterize the pathophysiology of mental illnesses, allow evidence-based diagnosis and develop personalized therapies. Because it is part of the central nervous system, the retina has been widely used as a site of investigation for understanding psychiatric disorders. Several studies reported retinal anomalies measured with the flash electroretinogram (ERG), and these anomalies may serve as biomarkers in patients with seasonal affective disorder (SAD) [1-4], schizophrenia (SZ) [5, 6], autism [7] and drug addiction [8]. This non-invasive technique records the light-evoked biopotential originating from the retina in response to standardized flash stimuli. Using the ERG technique, cone (day vision) and rod (night vision) function can be assessed separately.

Recently, a biological endophenotype consisting in a decreased rod ERG (b-wave amplitude at Vmax) and trends for a longer rod b-wave implicit time and a decreased cone a-wave amplitude were observed in young non-affected offspring at high genetic risk (HR) of SZ or bipolar disorder (BD) [9]. These ERG anomalies were independent of the diagnosis of the parents (either SZ or BD) and the age of the HRs. This biological signature was also observed in patients with SZ (among other ERG anomalies such as a decreased rod and cone a-wave amplitude) [6], suggesting that ERG profiles represent biomarkers of risk to develop major neuropsychiatric disorders, but their biological origin remains unknown.

The signaling module composed by the serine/threonine kinases Akt and glycogen synthase kinase-3 (GSK3) has been associated with monoamine neurotransmission, psychiatric drug action and several genetic risk factors for the development of SZ and BD, suggesting a crucial role of these molecules in the pathophysiology of mental disorders [10, 11]. Mammalian genomes encode three Akt (Akt1, 2 and 3) as well as two GSK3 (GSK3 $\alpha$  and  $\beta$ ) isozymes. Akt kinases are activated by phosphorylation in response to phosphoinositide 3-kinase mediated signaling [12]. GSK3 isozymes are believed to be constitutively active and are inactivated by Akt following the phosphorylation of their amino-terminal regulatory domain (Ser21 for GSK3 $\alpha$  and Ser9 for GSK3 $\beta$ ) by Akt and other kinases [13, 14].

Pharmacological agents used for the management of psychiatric disorders act on monoamines neurotransmission, especially dopamine and serotonin [15-18]. Among several mechanisms, part of their action on behavior is exerted by modulating the Akt-GSK3 signalling pathway [10]. In short, both typical and atypical antipsychotics as well as lithium and several antidepressants have been shown to inhibit brain GSK3 activity in rodents [19-23]. Conversely, several genetic variants associated with enhanced risk for SZ and/or BD can result either direct or indirect GSK3 activation as a consequence of Akt inhibition [24, 25]. Indeed, Akt1 protein levels were found to be lower in lymphocytes and post-mortem brain samples from patients with SZ [26] and an association of *AKT1* haplotypes with SZ and/or BD was also demonstrated [27, 28]. Furthermore, several other SZ and/or BD risk gene products, including tryptophan hydroxylase 2 (*TPH2*) [29, 30], disrupted in schizophrenia 1 (*DISC1*) [24, 25], brain derived neurotrophic factor (*BDNF*) and neuregulin (*NRG1*) [31-34] are known to be involved in the regulation of GSK3 activity. In line with this, a decrease in phosphor-Ser9-GSK3 $\beta$  protein levels was observed in post-mortem frontal cortex of SZ patients [35] as well as in peripheral blood lymphocytes [26]. More directly, GSK3 $\beta$  gene variants may be associated with susceptibility to SZ [36, 37] as well as with clinical measures linked to mood disorders [38, 39]. Morphologic studies also revealed an association of GSK3 $\beta$  single nucleotide polymorphisms with temporal lobe volume in SZ [40] and major depression [41] as well as in the attenuation of magnetic resonance imaging prefrontal activity and reduction of prefrontal cortical thickness in SZ [37]. Together, this suggests a role for increased GSK3 activity in the pathophysiology and genetic of SZ and BD.

To investigate the origins of the ERG anomalies reported in patients with schizophrenia and HRs, we used several lines of genetically modified mice with altered GSK3 expression to examine the implication of these kinases in the modulation of retinal functions. Our finding revealed an association between the rod b-wave amplitude and the expression of GSK3 that is consistent with the ERG anomalies observed in HRs.

## Material and Methods

### Animals

Generation of mice having increased (prpGSK3 $\beta$  mice) [42] or reduced (GSK3 $\beta^{+/-}$ ) [43] GSK3 $\beta$  expression as well as GSK3 $\alpha$  knockout (GSK3 $\alpha$ -KO) mice [44] has been described previously. Mice were genotyped at weaning by polymerase chain reaction amplification of genomic DNA obtained from ear punch biopsy. All genotypes were reconfirmed by additional genotyping after experimentation. Respective wild-type littermates (WT) were used as control subjects for mutant mice, and all animals (males and females) were 3 to 5 months old. For ERG recordings, 8 to 15 animals per genotype were used, and specific effectives for each experiment are indicated in figures legend. Mice were housed four to five per cage in a humidity-controlled room at 23°C of a 12-hour light/dark cycle with ad libitum access to food and water before experiments. The Université Laval institutional Animal Care Committee approved all experimental procedures in line with guidelines from the Canadian Council on Animal Care.

### Western Blotting

Mice were killed by decapitation, and their heads were immediately cooled by immersion in liquid nitrogen for a few seconds. The striatum and prefrontal cortex were rapidly dissected on an ice-cold surface and frozen in liquid nitrogen within 45 seconds as described [45]. For retinas, mice were killed by decapitation and enucleated. Retinas were immediately dissected and frozen in liquid nitrogen within 45 seconds. Tissue samples were homogenized in boiling 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) and boiled for 5 minutes. Protein concentration was measured using a detergent-compatible protein assay (Bio-Rad, Hercules, California). Protein extracts (25  $\mu$ g) were separated on a 10% sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis Tris-glycine gels (Life Technologies, Burlington, Canada) and transferred to nitrocellulose membranes (Life Technologies). Blots were immunostained overnight at 4°C with primary antibodies (mouse monoclonal immunoglobulin G [IgG] SC-7291, 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California) and mouse monoclonal IgG MAB1501 (1:1000; Millipore, Billerica, Massachusetts) to detect GSK3 $\alpha/\beta$  and actin, respectively. For revelation and quantitative analyses of labelling using the Odyssey imager (Licor Biotechnology,

Lincoln, Nebraska), secondary antibody IRDye 800CW Goat Anti-Mouse IgG LIC-926-32210 (1:10000; Mandel, Guelph, Canada) was used. Actin was used as a loading control for the evaluation of total protein levels, and results were further normalized to respective control conditions to allow comparison between separate experiments.

## ERG Recording and Analysis

Photopic and scotopic ERGs were recorded on animals according to the procedure previously described [46]. The ERG response is first composed of a negative component – namely the a-wave generated for the most part by the photoreceptors, followed by the b-wave, a positive component originating from the bipolar and the Müller cells complex stimulation. By convention, amplitude ( $\mu\text{V}$ ) of the a-wave is measured from the baseline to trough, and the b-wave is measured from the trough of the a-wave to the peak of the b-wave. The implicit time of a- and b-wave represents the number of milliseconds at which the peak of the waves is reached. These four parameters (a- and b-wave amplitude and implicit time) derived from a typical ERG traces are represented in figure 4.1.

For each 4 parameters, the data were plotted against flash luminance to generate the photopic and scotopic luminance response function (LRF). As per Hébert *et al.* [47], two other parameters were derived from the scotopic and photopic LRF of the b-wave, the  $V_{\text{max}}$  and  $\log K$ .  $V_{\text{max}}$  refers to the maximal b-wave amplitude in which the system of the retina saturates. In scotopic condition,  $V_{\text{max}}$  was selected at the end of the plateau before cone intrusion, which refers to the Naka-Rushton curve plateau [48]. In the current experimentation, to avoid some subjectivity in the selection of the  $V_{\text{max}}$  parameter individually, the  $V_{\text{max}}$  was set at  $2.86 \log \text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  in photopic condition and at  $-0.0105 \log \text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  in scotopic condition [46]. The latter intensities were selected after visual inspection of the averaged LRFs in a group of 10 WT mice.  $\log K$  is interpreted as retinal sensitivity and represents the intensity necessary to reach half of the  $V_{\text{max}}$ . Repeated measures analyses of variance with Bonferroni correction were performed to assess the difference between WT and mutant mutant mice for each of the ERG parameters (a- and b-wave amplitude and implicit time) in both photopic and scotopic conditions.  $\log K$  was analysed using one-way analyses of variance.

The results are presented in the text with SD. All analyses were conducted using SPSS for Windows (version 15.0; SPSS, Chicago, Illinois).

## Results

### GSK3 Expression in prpGSK3 $\beta$ Mice

To assess the impact of GSK3 $\beta$  overexpression on the ERG parameters, we studied the prpGSK3 $\beta$  mice. These mice express a C-terminal 6X-his tag recombinant GSK3 $\beta$  under the control of a neuron-specific mouse prion protein promoter [42]. In contrast to GSK3 $\beta^{+/-}$  and GSK3 $\alpha$ -KO that display ubiquitous changes in GSK3 expression, prpGSK3 $\beta$  mice overexpress GSK3 in specific cell populations. Western blot analysis were therefore carried out to establish whether GSK3 overexpression in these mice was restricted to the brain or also extended to the retina. As previously described [42], these mice display increased GSK3 $\beta$  protein expression in the cortex and the striatum (figure 4.2A-D). Additional characterization revealed an increase of approximately 40% in GSK3 $\beta$  protein expression in the retina of prpGSK3 $\beta$  mice compared to the WT mice (figure 4.2E,F). As seen on the representative Western blots analysis presented in figure 4.2, there was a partial proteolysis of endogenous GSK3 $\beta$  and GSK3 $\beta$ -his. GSK3 $\beta$ -his migrates between the endogenous GSK3 $\beta$  form and the alternatively spliced form of endogenous GSK3 $\beta$  (Figure 4.2).

### ERG of prpGSK3 $\beta$ Mice

ERG recordings revealed no significant change under photopic condition between WT and prpGSK3 $\beta$  mice for the a- and b-wave amplitude and implicit time (figure 4.3A-D) as well as the logK.

In contrast, under scotopic condition, a significant decrease in the b-wave amplitude was observed (figure 4.3F) between groups [ $F(1,26) = 19.327, p < 0.001$ ]. Post hoc analyses showed that b-wave amplitude was lower in prpGSK3 $\beta$  mice at almost every intensity, with the  $V_{max}$  being significantly lower ( $p < 0.001$ ) by approximately 18% in mutant mice ( $388.40 \pm 30.42 \mu V$ ) compared with WT mice ( $472.60 \pm 49.97 \mu V$ ) (figure 4.4A). The ERG waveform examination of prpGSK3 $\beta$  and WT mice (figure 4.4B) confirms that none of the other ERG parameters was significantly changed

between the groups. These results suggest that overexpression of neuronal GSK3 $\beta$  decreases the scotopic b-wave amplitude and has no impact on the other ERG parameters in scotopic or photopic conditions.

### **ERG of GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> Mice**

To further examine the contribution of GSK3 $\beta$  expression in the ERG response, we then used GSK3 $\beta$  haploinsufficient (GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup>) mice. Disruption of the murine GSK3 $\beta$  gene leads to embryonic lethality caused by liver degeneration during gestation; therefore only adult haploinsufficient mice can be studied [43]. Under photopic condition, a significant difference between the luminance-response functions of WT and GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> mice for the b-wave amplitude was observed [ $F(1,19) = 7.059$ ,  $p = 0.016$ ] and post hoc analyses showed that b-wave amplitude was higher in mutant mice at several intensities (figure 4.5B). The photopic Vmax was also significantly increased in GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> mice ( $345.90 \pm 26.62 \mu\text{V}$ ;  $p = 0.045$ ) compared with WT mice ( $314.50 \pm 39.95 \mu\text{V}$ ) (figure 4.6). None of the other ERG parameters – namely the a-wave amplitude, a- and b-wave implicit time and logK – was significantly changed in photopic condition (figure 4.5).

Under scotopic condition, the LRF of the b-wave amplitude was also significantly different between groups [ $F(1,22) = 6.868$ ,  $p = 0.016$ ]. This difference was observed mainly for the higher intensities (figure 4.5F). Scotopic Vmax amplitude was also significantly increased (figure 4.6C) in GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> mice ( $499.40 \pm 51.77 \mu\text{V}$ ;  $p = 0.006$ ) compared with WT mice ( $437.60 \pm 47.51 \mu\text{V}$ ). Moreover, an overall difference was found between groups for the b-wave implicit time [ $F(1,22) = 4.694$ ,  $p = 0.041$ ] and post hoc comparisons revealed a significant decrease in GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> mice at some intensities (figure 4.5H). The examination of the ERG traces (figure 4.6D) of WT and GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> mice also confirmed the significant changes of these parameters under scotopic condition. None of the other ERG parameters such as the a-wave amplitude and implicit time as well as the logK was affected in GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> mice compared with WT mice.

## ERG of GSK3 $\alpha$ -KO Mice (GSK3 $\alpha^{+/-}$ and GSK3 $\alpha^{-/-}$ )

To assess the role of the GSK3 $\alpha$  isozyme in the retinal functions, we used GSK3 $\alpha^{+/-}$  and GSK3 $\alpha^{-/-}$  mice. Under photopic condition, an overall difference was found between the two GSK3 $\alpha$  animal models and the WT mice [F(2,23) = 9.219,  $p$  = 0.001] for the a-wave amplitude. However, post hoc comparisons showed a significant difference between WT and GSK3 $\alpha^{+/-}$  mice at only one intensity (figure 4.7A). For the b-wave amplitude, an overall difference was also observed [F(2,23) = 4.932,  $p$  = 0.017]. The Vmax amplitude was found to be significantly higher (figure 4.8) in GSK3 $\alpha^{-/-}$  mice ( $330.90 \pm 69.24$   $\mu$ V;  $p$  = 0.010) compared to WT mice ( $254.70 \pm 27.46$   $\mu$ V). No significant change was found between WT and GSK3 $\alpha^{+/-}$  mice. None of the other ERG parameters, namely – the a- and b-wave implicit time and the logK – was influenced by the loss of GSK3 $\alpha$  in photopic condition.

Under scotopic condition, only an overall difference between the three groups for the b-wave amplitude was observed [F(2,32) = 5.849;  $p$  = 0.007] and post hoc analyses (figure 4.7F) revealed significant changes at several flash luminances, especially at highest intensities. Vmax amplitude was significantly increased in GSK3 $\alpha^{-/-}$  mice ( $516.10 \pm 73.34$   $\mu$ V;  $p$  = 0.006) compared with WT mice ( $437.60 \pm 47.51$   $\mu$ V), but no significant change was observed between WT and GSK3 $\alpha^{+/-}$  mice (figure 4.8). None of the other ERG parameters, such as the a-wave amplitude, the a- and b-wave implicit time and the logK was changed in mutant mice for GSK3 $\alpha$ .

## Discussion

The data presented here indicate that ERG response can be modulated by the expression of both GSK3 isozymes with the suggestion that increased GSK3 activity might be involved in some retinal anomalies observed in HRs and in patients with SZ. With the prpGSK3 $\beta$  mice, a model showing an overexpression of neuronal GSK3 $\beta$ , we reproduced the significant decrease in rod b-wave amplitude at Vmax that was previously detected in HRs compared with control subjects [9]. Moreover, a trend for a longer rod b-wave implicit time at Vmax was also observed in HRs and this trend was also present in prpGSK3 $\beta$  ( $p$  = 0.095). Furthermore, we demonstrated that these phenotypes can be reversed by reduced GSK3 $\beta$  expression as observed in GSK3 $\beta^{+/-}$  mice, where

increased rod b-wave amplitude and decreased rod b-wave implicit time at Vmax were measured compared with WT mice.

We also observed an anomaly of the cone a-wave only in GSK3 $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice, suggesting a role of this GSK3 isozyme in the modulation of a-wave amplitude under photopic condition. ERG assessments in patients with SZ revealed impairments in the earliest stage of visual information processing, and the observation of a reduction in cone a-wave amplitude in SZ patients is consistent among previous studies [5, 6]. A trend for a lower cone a-wave at Vmax was also reported in HRs with an effect size of 0.40 [9]. Interestingly, GSK3 $\alpha$  mRNA has also been identified as a SZ biomarker overexpressed in blood peripheral cells from patients with schizophrenia [49].

Only a handful of studies assessed the retinal functions of BD patients and no anomaly was observed compared with healthy controls [5, 50]. However, in one of the study [50], BD patients were all treated for many years with lithium, a direct and indirect inhibitor of GSK3 [19, 21]. The dark-adapted ERG was measured and no change in the b-wave amplitude and implicit time was reported. Of course, other assessments of retinal functions in BD would be worthwhile because the previous studies were independent of disease state (depressive or maniac), and only a few flash intensities were used, which do not allow analyzing the dynamic of the ERG response.

Although GSK3 expression might explain some of the ERG anomalies observed in patients with psychiatric illnesses, the impact of other molecules implicated in mental disorders must also be taken into consideration. Indeed, the ERG anomalies are strikingly different between illnesses, thus suggesting the implication of different factors underlying their origin. As an example, the dopaminergic hypothesis in SZ had been well described [18, 51], and, given that dopamine is the major catecholamine expressed in the retina [52], changes in retinal or central dopamine tones can also affect ERG [46]. Moreover, the data presented here and our previous observations in mice with increased dopamine tones [46] suggest that GSK3 and central dopamine may impact different ERG parameters. The mechanism through which central monoamines can affect the ERG response remains unknown. In contrast, the detection of enhanced GSK3 $\beta$  expression in the retina of prpGSK3 $\beta$  mice is compatible with a direct contribution of this kinase in the regulation of scotopic b-wave amplitude at Vmax in the retina. However, because the role of GSK3 in the retina had been

scarcely explored, additional detailed studies are necessary to uncover the physiological mechanisms of the modulation of the retinal functions by GSK3.

Overall, data presented here demonstrate an association between the rod b-wave amplitude and GSK3 activity, a risk factor for major brain disorders. Increased GSK3 $\beta$  expression reproduced the exact same ERG anomaly reported in HRs suggesting that GSK3 $\beta$  expression or activity may be increased before disease onset in HRs. The cone a-wave anomaly observed in several ERG studies on SZ patients might also be linked to GSK3 $\alpha$  expression. ERG anomalies found in psychiatric disorders may therefore represent telltale signatures of various disease risk factors. Further analysis of genetic risk factor epistasis and ERG anomalies in human populations may thus become an important next step of research to further the usefulness of ERG as a part of a biologically validated psychiatric diagnosis toolbox with potential high value clinical relevance.

## **Acknowledgements**

This work was supported by a Canadian Institutes of Health Research (CIHR) operating grant (NSA 93798) to JMB and a Fonds de recherche du Québec - Santé project for innovative strategic development. JMB is Canada Research Chair in Molecular Psychiatry. JL is recipient of fellowships from the Fonds de recherche du Québec – Santé, the Canadian Federation of University Women and the Vision Research Network.

We thank Nathalie Bouchard and Kathye Aubé for assistance maintaining mouse colonies as well as Annie Barbeau, Ph.D. and Karine Zaniolo, Ph.D. for valuable help with experimental protocols. prpGSK3 $\beta$  mice kind gift from Peter S. Klein (Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia). GSK3 $\alpha$  and  $\beta$ -KO animals were obtained from Dr. James Woodgett (Samuel Lunenfeld Research Institute, Toronto).

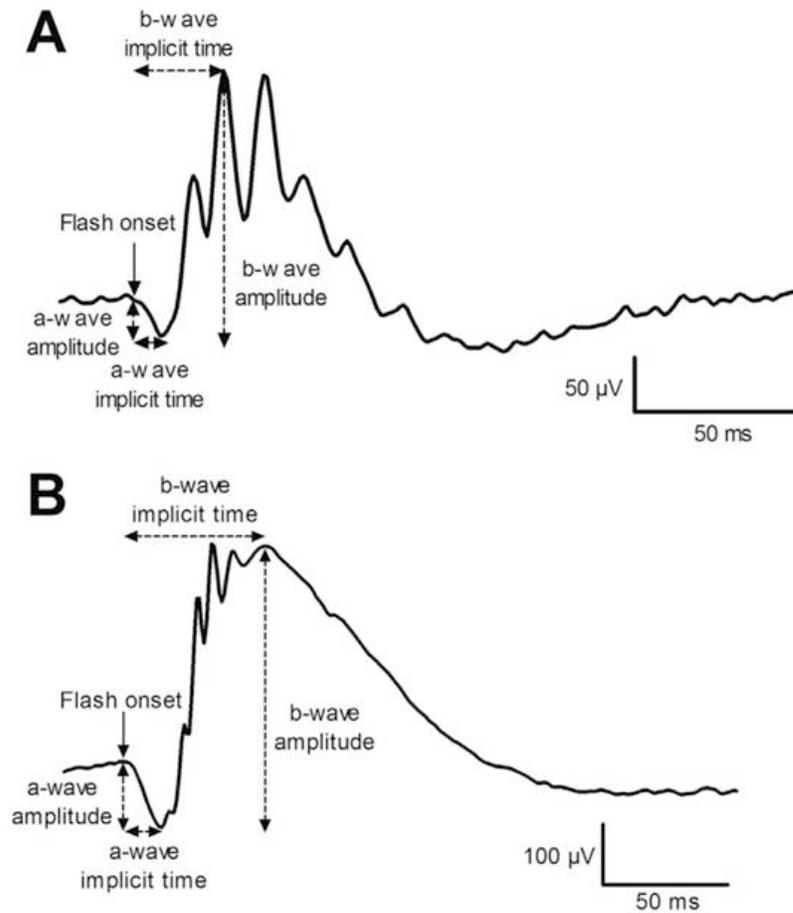
All authors have no biomedical financial interests or potential conflicts of interest.

## References

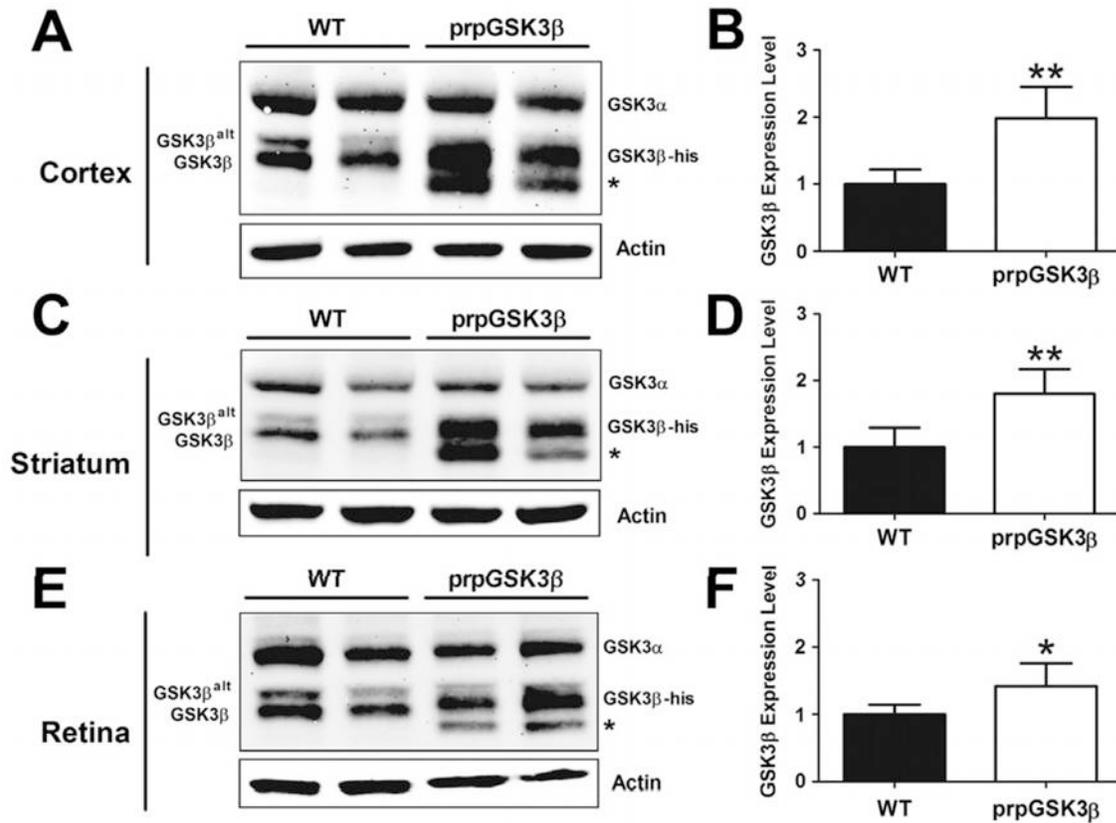
1. Hebert, M., M. Dumont, and P. Lachapelle, *Electrophysiological evidence suggesting a seasonal modulation of retinal sensitivity in subsyndromal winter depression*. J Affect Disord, 2002. **68**(2-3): p. 191-202.
2. Hebert, M., et al., *Electroretinography in patients with winter seasonal affective disorder*. Psychiatry Res, 2004. **127**(1-2): p. 27-34.
3. Lavoie, M.P., et al., *Evidence of a biological effect of light therapy on the retina of patients with seasonal affective disorder*. Biol Psychiatry, 2009. **66**(3): p. 253-8.
4. Lam, R.W., et al., *Electroretinography in seasonal affective disorder*. Psychiatry Res, 1992. **43**(1): p. 55-63.
5. Balogh, Z., G. Benedek, and S. Keri, *Retinal dysfunctions in schizophrenia*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2008. **32**(1): p. 297-300.
6. Warner, R., et al., *Retinal function as a marker for cell membrane omega-3 fatty acid depletion in schizophrenia: a pilot study*. Biol Psychiatry, 1999. **45**(9): p. 1138-42.
7. Ritvo, E.R., et al., *Electroretinograms in autism: a pilot study of b-wave amplitudes*. Am J Psychiatry, 1988. **145**(2): p. 229-32.
8. Roy, M., D. Smelson, and A. Roy, *Longitudinal study of blue cone retinal function in cocaine-withdrawn patients*. Biol Psychiatry, 1997. **41**(2): p. 252-3.
9. Hebert, M., et al., *Retinal response to light in young nonaffected offspring at high genetic risk of neuropsychiatric brain disorders*. Biol Psychiatry, 2010. **67**(3): p. 270-4.
10. Beaulieu, J.M., *A role for Akt and glycogen synthase kinase-3 as integrators of dopamine and serotonin neurotransmission in mental health*. J Psychiatry Neurosci, 2012. **37**(1): p. 7-16.
11. Jope, R.S., *Glycogen synthase kinase-3 in the etiology and treatment of mood disorders*. Front Mol Neurosci, 2011. **4**: p. 16.
12. Alessi, D.R. and P. Cohen, *Mechanism of activation and function of protein kinase B*. Curr Opin Genet Dev, 1998. **8**(1): p. 55-62.
13. Cross, D.A., et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B*. Nature, 1995. **378**(6559): p. 785-9.
14. Kaidanovich-Beilin, O. and J.R. Woodgett, *GSK-3: Functional Insights from Cell Biology and Animal Models*. Front Mol Neurosci, 2011. **4**: p. 40.
15. Kapur, S. and G. Remington, *Atypical antipsychotics: new directions and new challenges in the treatment of schizophrenia*. Annu Rev Med, 2001. **52**: p. 503-17.
16. Hoyer, D., J.P. Hannon, and G.R. Martin, *Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors*. Pharmacol Biochem Behav, 2002. **71**(4): p. 533-54.
17. Seeman, P., et al., *Dopamine supersensitivity correlates with D2High states, implying many paths to psychosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(9): p. 3513-8.
18. Snyder, S.H., *The dopamine hypothesis of schizophrenia: focus on the dopamine receptor*. Am J Psychiatry, 1976. **133**(2): p. 197-202.
19. Klein, P.S. and D.A. Melton, *A molecular mechanism for the effect of lithium on development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(16): p. 8455-9.
20. Beaulieu, J.M., R.R. Gainetdinov, and M.G. Caron, *Akt/GSK3 signaling in the action of psychotropic drugs*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2009. **49**: p. 327-47.
21. Beaulieu, J.M., et al., *A beta-arrestin 2 signaling complex mediates lithium action on behavior*. Cell, 2008. **132**(1): p. 125-36.

22. Li, X., et al., *Regulation of mouse brain glycogen synthase kinase-3 by atypical antipsychotics*. Int J Neuropsychopharmacol, 2007. **10**(1): p. 7-19.
23. Alimohamad, H., et al., *Antipsychotics alter the protein expression levels of beta-catenin and GSK-3 in the rat medial prefrontal cortex and striatum*. Biol Psychiatry, 2005. **57**(5): p. 533-42.
24. Nakata, K., et al., *DISC1 splice variants are upregulated in schizophrenia and associated with risk polymorphisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(37): p. 15873-8.
25. Lipska, B.K., et al., *Expression of DISC1 binding partners is reduced in schizophrenia and associated with DISC1 SNPs*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(8): p. 1245-58.
26. Emamian, E.S., et al., *Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3beta signaling in schizophrenia*. Nat Genet, 2004. **36**(2): p. 131-7.
27. Tan, H.Y., et al., *Epistatic interactions of AKT1 on human medial temporal lobe biology and pharmacogenetic implications*. Mol Psychiatry, 2012. **17**(10): p. 1007-16.
28. Tan, H.Y., et al., *Genetic variation in AKT1 is linked to dopamine-associated prefrontal cortical structure and function in humans*. J Clin Invest, 2008. **118**(6): p. 2200-8.
29. Beaulieu, J.M., et al., *Role of GSK3 beta in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(4): p. 1333-8.
30. Zhang, X., et al., *Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression*. Neuron, 2005. **45**(1): p. 11-6.
31. Law, A.J., et al., *Neuregulin 1-ErbB4-PI3K signaling in schizophrenia and phosphoinositide 3-kinase-p110delta inhibition as a potential therapeutic strategy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(30): p. 12165-70.
32. Nicodemus, K.K., et al., *Biological validation of increased schizophrenia risk with NRG1, ERBB4, and AKT1 epistasis via functional neuroimaging in healthy controls*. Arch Gen Psychiatry, 2010. **67**(10): p. 991-1001.
33. Nicodemus, K.K., et al., *A 5' promoter region SNP in NRG1 is associated with schizophrenia risk and type III isoform expression*. Mol Psychiatry, 2009. **14**(8): p. 741-3.
34. Sei, Y., et al., *Neuregulin1-induced cell migration is impaired in schizophrenia: association with neuregulin1 and catechol-o-methyltransferase gene polymorphisms*. Mol Psychiatry, 2007. **12**(10): p. 946-57.
35. Amar, S., et al., *Possible involvement of post-dopamine D2 receptor signalling components in the pathophysiology of schizophrenia*. Int J Neuropsychopharmacol, 2008. **11**(2): p. 197-205.
36. Li, M., et al., *Genetic association and identification of a functional SNP at GSK3beta for schizophrenia susceptibility*. Schizophr Res, 2011. **133**(1-3): p. 165-71.
37. Blasi, G., et al., *Association of GSK-3beta Genetic Variation With GSK-3beta Expression, Prefrontal Cortical Thickness, Prefrontal Physiology, and Schizophrenia*. Am J Psychiatry, 2013.
38. Lee, Y.J. and Y.K. Kim, *The impact of glycogen synthase kinase 3beta gene on psychotic mania in bipolar disorder patients*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2011. **35**(5): p. 1303-8.
39. Saus, E., et al., *A haplotype of glycogen synthase kinase 3beta is associated with early onset of unipolar major depression*. Genes Brain Behav, 2010. **9**(7): p. 799-807.
40. Benedetti, F., et al., *Temporal lobe grey matter volume in schizophrenia is associated with a genetic polymorphism influencing glycogen synthase kinase 3-beta activity*. Genes Brain Behav, 2010. **9**(4): p. 365-71.
41. Inkster, B., et al., *Association of GSK3beta polymorphisms with brain structural changes in major depressive disorder*. Arch Gen Psychiatry, 2009. **66**(7): p. 721-8.

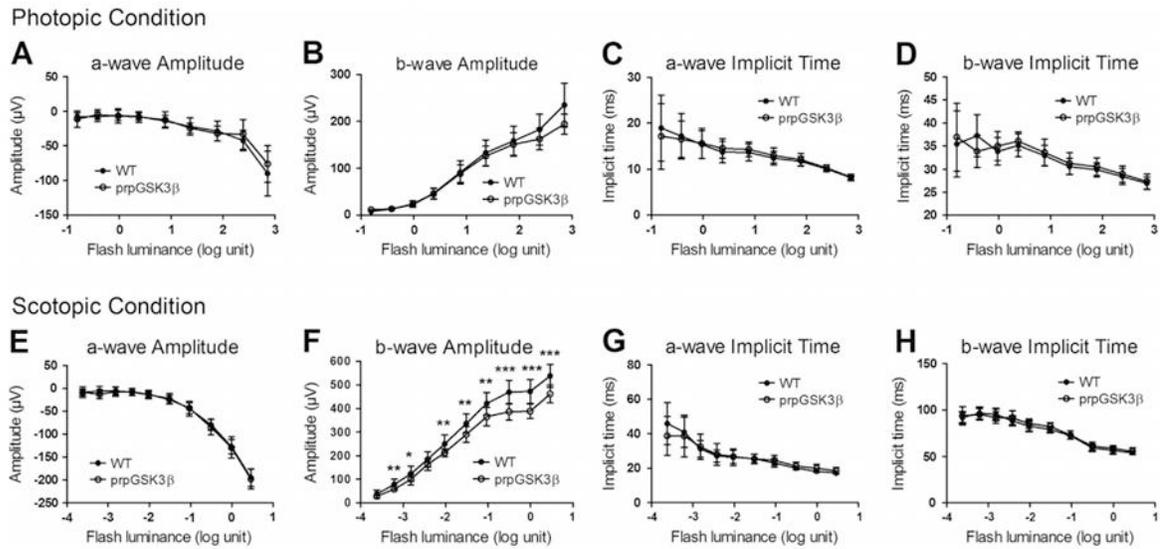
42. O'Brien, W.T., et al., *Glycogen synthase kinase-3 is essential for beta-arrestin-2 complex formation and lithium-sensitive behaviors in mice*. J Clin Invest, 2011. **121**(9): p. 3756-62.
43. Hoeflich, K.P., et al., *Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation*. Nature, 2000. **406**(6791): p. 86-90.
44. MacAulay, K., et al., *Glycogen synthase kinase 3alpha-specific regulation of murine hepatic glycogen metabolism*. Cell Metab, 2007. **6**(4): p. 329-37.
45. Beaulieu, J.M., et al., *Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(14): p. 5099-104.
46. Lavoie, J., et al., *The Electroretinogram as a Biomarker of Central Dopamine and Serotonin: Potential Relevance to Psychiatric Disorders*. Biol Psychiatry, 2013.
47. Hebert, M., P. Lachapelle, and M. Dumont, *Reproducibility of electroretinograms recorded with DTL electrodes*. Doc Ophthalmol, 1995. **91**(4): p. 333-42.
48. Naka, K.I. and W.A. Rushton, *S-potentials from colour units in the retina of fish (Cyprinidae)*. J Physiol, 1966. **185**(3): p. 536-55.
49. Glatt, S.J., et al., *Comparative gene expression analysis of blood and brain provides concurrent validation of SELENBP1 up-regulation in schizophrenia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(43): p. 15533-8.
50. Lam, R.W., et al., *Effects of chronic lithium treatment on retinal electrophysiologic function*. Biol Psychiatry, 1997. **41**(6): p. 737-42.
51. Kuepper, R., M. Skinbjerg, and A. Abi-Dargham, *The dopamine dysfunction in schizophrenia revisited: new insights into topography and course*. Handb Exp Pharmacol, 2012(212): p. 1-26.
52. Witkovsky, P., *Dopamine and retinal function*. Doc Ophthalmol, 2004. **108**(1): p. 17-40.



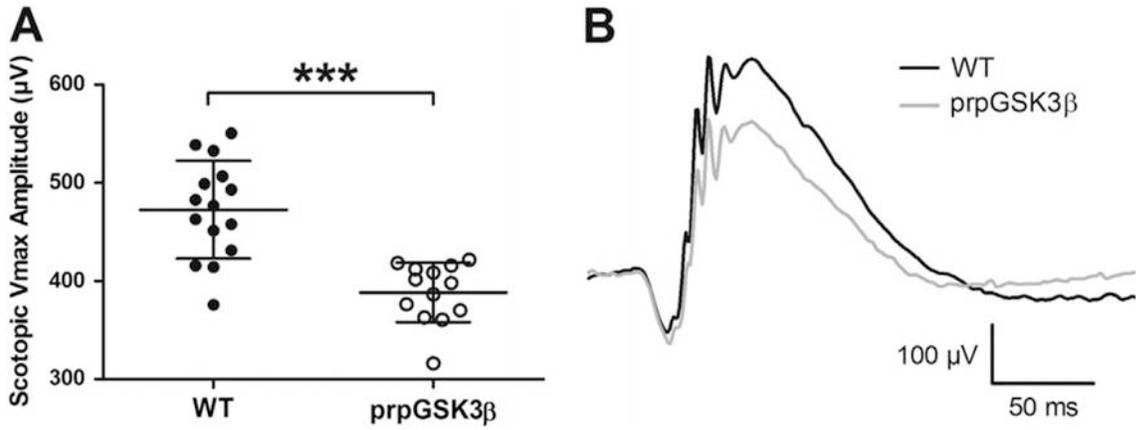
**Figure 4.1.** Example of mice ERG waveform observed at Vmax in photopic (A) and scotopic (B) conditions. The photopic Vmax was selected at  $2.86 \log \text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  and scotopic Vmax at  $-0.0105 \log \text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ . The arrows indicate the way the parameters are measured.



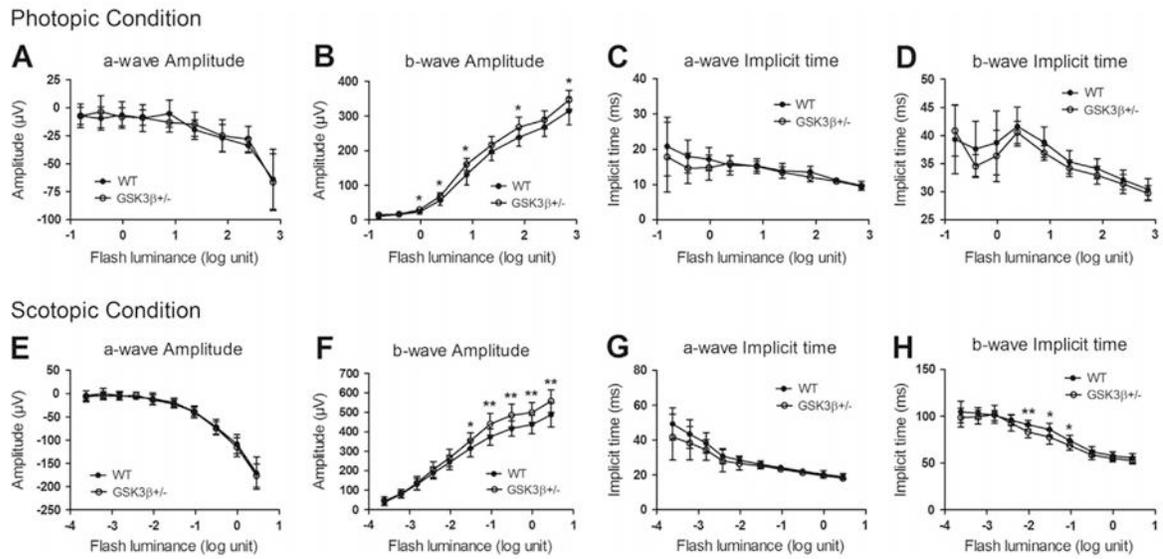
**Figure 4.2.** Representative Western blot analysis performed with tissue extracts of wild-type (WT) mice and mice having increased glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3 $\beta$ ) expression (prpGSK3 $\beta$  mice) for an evaluation of GSK3 expression and densitometric analysis ( $n = 5$  per genotype) of the Western blot in the cortex (A and B), the striatum (C and D) and the retina (E and F). The partial proteolysis of endogenous GSK3 $\beta$  and GSK3 $\beta$ -his (asterisks) is confirmed. The alternatively spliced form of endogenous GSK3 $\beta$  is indicated with GSK3 $\beta^{alt}$ . GSK3 $\beta$ -his migrates between the endogenous GSK3 $\beta$  and GSK3 $\beta^{alt}$  forms. Error bars represent the SD. (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).



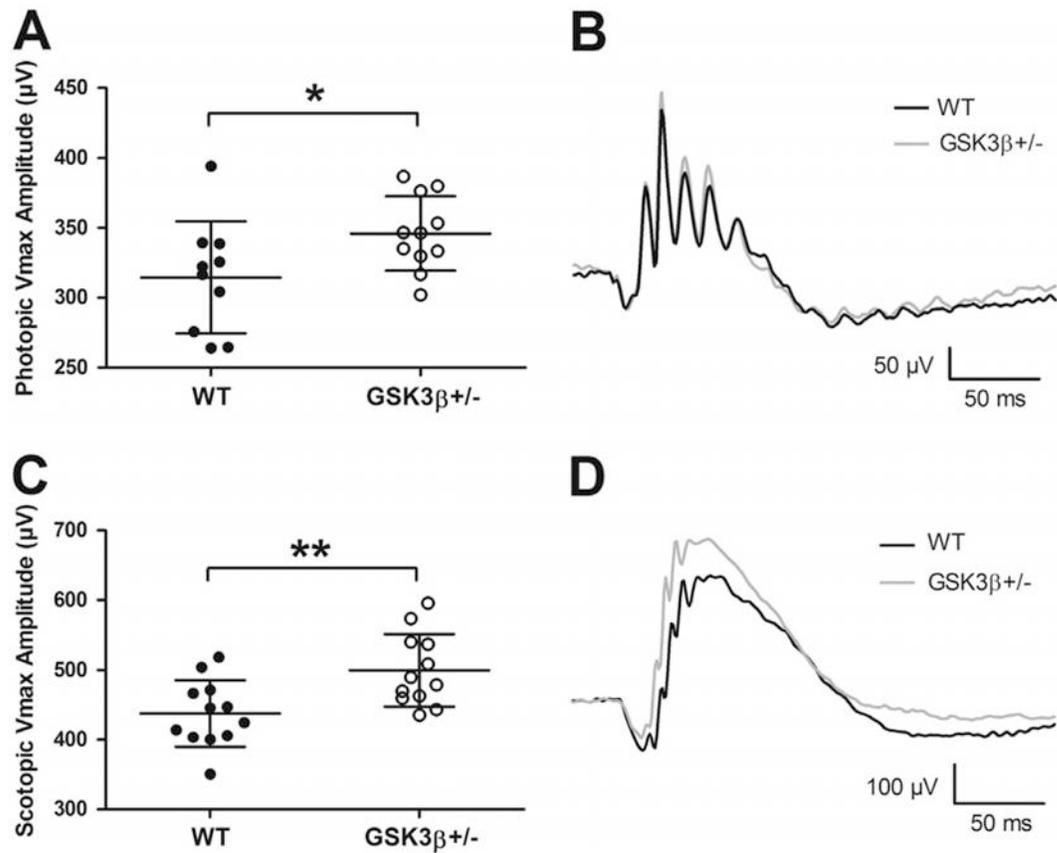
**Figure 4.3.** Photopic luminance-response function between mice having increased glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3 $\beta$ ) expression (prpGSK3 $\beta$ ; n = 13) and wild-type mice (WT; n = 15) for the a-wave amplitude (A), b-wave amplitude (B), a-wave implicit time (C) and b-wave implicit time (D). Scotopic luminance-response function between prpGSK3 $\beta$  (n = 13) and WT (n = 15) mice for the a-wave amplitude (E), b-wave amplitude (F), a-wave implicit time (G) and b-wave implicit time (H). Error bars represent the SD. (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).



**Figure 4.4.** (A) Distribution of the Vmax amplitude in scotopic condition for wild-type (WT) mice and mice having increased glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3β) expression (prpGSK3β) mice. (B) Example of an electroretinogram trace at Vmax for one WT mouse (black) and one prpGSK3β mouse (gray) at scotopic Vmax. A decrease in b-wave amplitude and no change in the other ERG parameters in scotopic condition are observed. Error bars represent the SD. (\*\* $p < 0.001$ ).

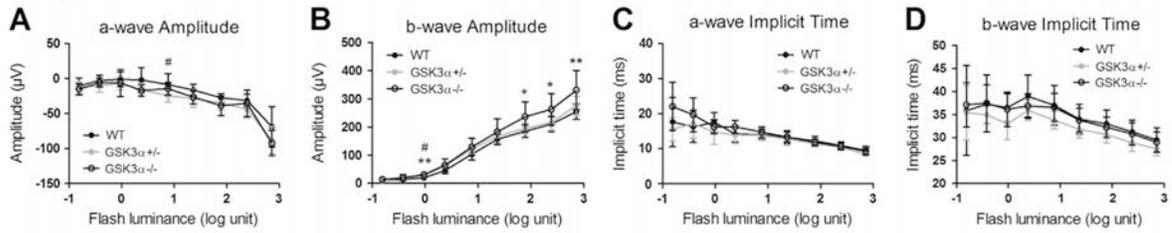


**Figure 4.5.** Photopic luminance-response function between mice having reduced glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3 $\beta$ ) expression (GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup>; n = 11) and wild-type mice (WT; n = 10) for the a-wave amplitude (A), b-wave amplitude (B), a-wave implicit time (C) and b-wave implicit time (D). Scotopic luminance-response function between GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> mice (n = 12) and WT (n = 12) mice for the a-wave amplitude (E), b-wave amplitude (F), a-wave implicit time (G) and b-wave implicit time (H). Error bars represent the SD. (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).

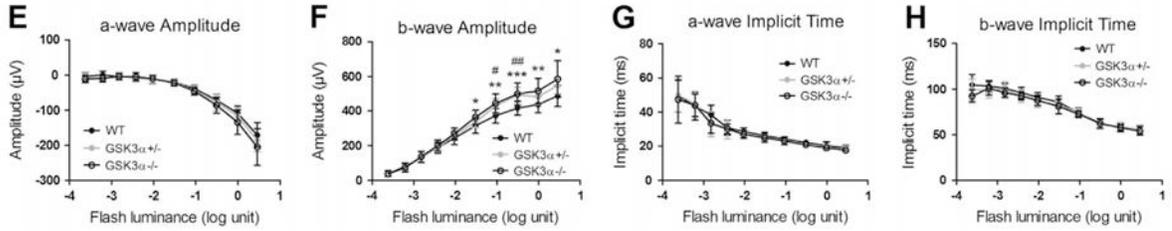


**Figure 4.6.** (A) Distribution of the Vmax amplitude in photopic condition for wild-type (WT) and mice having reduced glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3β) expression (GSK3β<sup>+/-</sup>). (B) Example of a photopic electroretinogram (ERG) trace at Vmax for one WT mouse (black) and one GSK3β<sup>+/-</sup> mouse (gray). An increase in b-wave amplitude at Vmax is observed in GSK3β<sup>+/-</sup> mice in photopic condition. (C) Distribution of the Vmax amplitude in scotopic condition for WT and GSK3β<sup>+/-</sup> mice. (D) Example of a scotopic ERG trace at Vmax for one WT mouse (black) and one GSK3β<sup>+/-</sup> mouse (gray). An increase in b-wave amplitude at Vmax in GSK3β<sup>+/-</sup> mice is demonstrated in scotopic condition. Error bars represent the SD. (\**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01).

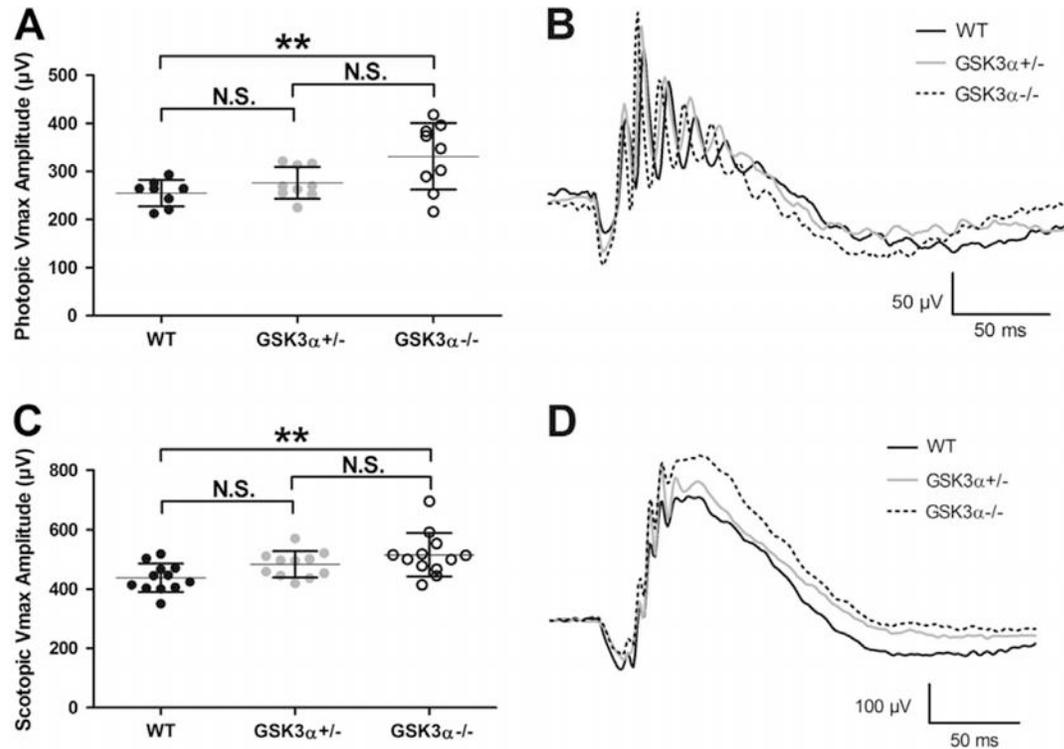
Photopic Condition



Scotopic Condition



**Figure 4.7.** Photopic luminance-response function among glycogen synthase kinase-3 alpha (GSK3α) heterozygous (GSK3α<sup>+/-</sup>; n = 9), homozygous (GSK3α<sup>-/-</sup>; n = 9) and wild-type (WT; n = 8) mice for the a-wave amplitude (A), b-wave amplitude (B), a-wave implicit time (C) and b-wave implicit time (D). Scotopic luminance-response function between GSK3α<sup>+/-</sup> (n = 11), GSK3α<sup>-/-</sup> (n = 12) and WT (n = 12) mice for the a-wave amplitude (E), b-wave amplitude (F), a-wave implicit time (G) and b-wave implicit time (H). Error bars represent the SD. (#*p* < 0.005; ##*p* < 0.01; difference between WT and GSK3α<sup>+/-</sup> mice) (\**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001; difference between WT and GSK3α<sup>-/-</sup> mice).



**Figure 4.8.** (A) Distribution of the Vmax amplitude in photopic condition for wild-type (WT), GSK3α heterozygous (GSK3α<sup>+/-</sup>) and GSK3α homozygous (GSK3α<sup>-/-</sup>) mice. (B) Example of a photopic electroretinogram (ERG) trace at Vmax for one WT mouse (black), one GSK3α<sup>+/-</sup> mouse (grey) and one GSK3α<sup>-/-</sup> mouse (dotted line). An increase in a- and b-wave amplitude at Vmax is observed in GSK3α<sup>-/-</sup> mice in photopic condition. (C) Distribution of the Vmax amplitude in scotopic condition for WT, GSK3α<sup>+/-</sup> and GSK3α<sup>-/-</sup> mice. (D) Example of a scotopic ERG trace at Vmax for one WT mouse (black), one GSK3α<sup>+/-</sup> mouse (grey) and one GSK3α<sup>-/-</sup> mouse (dotted line). An increase in b-wave amplitude at Vmax is observed in GSK3α<sup>-/-</sup> mice in scotopic condition. Error bars represent the SD. (\*\**p* < 0.01; N.S.: not significant)

**CHAPITRE 5 : GLYCOGEN SYNTHASE KINASE-3 $\beta$   
HAPLOINSUFFICIENCY LENGTHENS THE CIRCADIAN LOCOMOTOR  
ACTIVITY PERIOD IN MICE**

**Quatrième article**

Publié dans *Behavioral Brain Research* (2013) 253 : 262-265  
(*Short Communication*)

Utilisation de cette publication autorisée par Elsevier

## Résumé

Il a été démontré que le stabilisateur d'humeur lithium peut moduler les rythmes circadiens chez les vertébrés. Parmi les nombreuses cibles thérapeutiques proposées du lithium, l'inhibition directe de la glycogène synthase kinase-3 bêta (GSK3 $\beta$ ) a été suggérée pour expliquer ses effets sur la physiologie circadienne. Dans cette expérience, nous étudions l'effet de l'haploinsuffisance de GSK3 $\beta$  sur l'activité locomotrice circadienne chez la souris durant une période de noirceur constante en comparaison avec des souris wild-type (WT). Les animaux ont été hébergés individuellement dans une cage comportant une roue afin de mesurer leur activité circadienne. Les souris ont été entraînées à un cycle de 12 heures de lumière et 12 heures de noirceur pendant 14 jours et ensuite placées sous noirceur constante pour 14 autres jours. Durant la phase de noirceur constante, la période d'activité locomotrice circadienne des souris GSK3 $\beta^{+/-}$  fut significativement augmentée ( $23,83 \pm 0,05$  h) en comparaison avec les souris WT ( $23,54 \pm 0,10$  h;  $p = 0,0374$ ). Aucune différence significative du niveau d'activité locomotrice n'a été observée. Sachant que la GSK3 $\beta$  interagit avec la plupart des composants moléculaires de l'horloge biologique interne, ces résultats suggèrent que la GSK3 $\beta$  s'avère un important régulateur intrinsèque de l'horloge circadienne et joue un rôle crucial dans la régulation de la période en réponse à un traitement au lithium.

# **Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$ Haploinsufficiency Lengthens the Circadian Locomotor Activity Period in Mice**

Joëlle Lavoie<sup>1,2,3</sup>, Marc Hébert<sup>1,3</sup>, Jean-Martin Beaulieu<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centre de recherche de l'Institut universitaire en santé mentale de Québec, Behavioral Platform, Quebec City, Quebec, Canada; <sup>2</sup>Department of Psychiatry and Neuroscience, Faculty of Medicine, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada; <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, Otorhinolaryngology and Cervico-facial Surgery, Faculty of Medicine, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada.

## **Corresponding author:**

Jean-Martin Beaulieu, Ph.D.

2601, chemin de la canardière, F-6500

Quebec City, Quebec G1J 2G3

Phone: 1-418-663-5747 ext. 6888

Fax: 1-418-663-8756

[martin.beaulieu@crulrg.ulaval.ca](mailto:martin.beaulieu@crulrg.ulaval.ca)

## Abstract

The mood stabilizer drug lithium has been reported to impact circadian rhythms in vertebrates. Among several putative therapeutic molecular targets, direct inhibition of glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3 $\beta$ ) by lithium has been proposed to underlie its effects on circadian physiology. Here we study the effect of GSK3 $\beta$  haploinsufficiency on the circadian locomotor activity in mice during a free-running period in comparison to wild-type littermates (WT). Mice were housed individually to record their circadian wheel running activity and were entrained to a 12h light/12h dark cycle for 14 days and then placed under constant darkness for 14 days to allow free-running. During the free-running phase, the circadian locomotor activity period of GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> was significantly lengthened ( $23.83 \pm 0.05$  h) when compared to the WT mice ( $23.54 \pm 0.10$  h;  $p = 0.0374$ ). No significant difference in locomotor activity was observed. Knowing that GSK3 $\beta$  interacts with most of the core clock components, these data suggest that GSK3 $\beta$  acts as a critical intrinsic regulator of the circadian clock and plays an important role in regulating its period in response to lithium treatment.

**Keywords:** Glycogen synthase kinase-3 $\beta$ ; Circadian rhythms; Free-running; Period; Locomotor activity

Circadian rhythms are orchestrated by the suprachiasmatic nucleus (SCN) located in the anterior hypothalamus and known as the circadian primary pacemaker [1]. The circadian behavior is mainly entrained by the daily rhythms in the spontaneous firing rate of SCN neurons [2]. At the molecular level, cells throughout the body also display 24-hour rhythms that are generated and maintained through clock genes interconnected transcriptional feedback. Briefly, the cycle begins with the heterodimerization of the bHLH-PAS domain proteins BMAL1 and CLOCK. This complex then activates the clock genes *Per1*, *Per2*, *Cry1* and *Cry2*. PER and CRY accumulate in the cytosol before translocating into the nucleus where the PER-CRY complex inhibits its own transcription by binding to the BMAL1-CLOCK complex. The orphan nuclear receptor Rev-erba also plays a role in the negative feedback loops in repressing the transcription of *Bmal1* during the circadian night. Alternatively, the BMAL1-CLOCK complex activates *Rev-erba* [1].

Numerous pathologies such as psychiatric disorders, cancer, cardiac and inflammatory diseases have been linked to circadian disturbances [3]. As an example, several lines of evidence of marked circadian abnormalities have been reported in bipolar disorder (BD) and other mood disorders such as sleep/wake activity, diurnal secretion of hormones and endogenous substances as well as appetite [4]. Indirectly, the circadian rhythms hypothesis in mood disorder is supported by pharmacological studies using the mood stabilizer lithium. At the cellular level, it was demonstrated that lithium impacts the spontaneous firing of the SCN neurons [5] as well as the circadian rhythm of SCN individual neurons firing rate [6]. Moreover, behavioral studies reported that lithium lengthens the circadian period in mammals [7-10].

Among several putative therapeutic molecular targets of lithium [11], the inhibition of the serine/threonine kinase glycogen synthase kinase-3 (GSK3) has been proposed to underlie several of its effects on circadian rhythms [12]. Two isoforms of GSK3  $\alpha$  and  $\beta$  are expressed throughout the brain [13]. GSK3 isoforms are believed to be constitutively active and can be inhibited by the phosphorylation of single serine residues on their regulatory amino-terminal domain [14]. Interestingly, mice with GSK3 $\beta$  haploinsufficiency (GSK3 $\beta^{+/-}$ ) have been shown to phenocopy several behavioral effects of lithium in rodents [15]. Indeed GSK3 $\beta^{+/-}$  mice display decreased anxiety, reduced immobility in forced-swimming and tail suspension tests, resilience to social stress and reduced responsiveness to amphetamine [15-19]. Recent works using animal models suggested a

role of GSK3 in the circadian physiology. Paul *et al.* [20] reported that GSK3 $\alpha/\beta$  knock-in mice, where both  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms were constitutively active as a result of an alanine substitution of their regulatory serine residues, exhibited disrupted behavioral rhythmicity, but this circadian behavior was unaltered in mice expressing only one activated GSK3 isoform. However, this circadian behaviour was unaltered in mice expressing only one constitutively activated GSK3 isoform. Furthermore, *Drosophila* over-expressing the GSK3 ortholog *shaggy* (*sgg*) exhibit a shorter circadian locomotor activity period while reduced *sgg* expression produces a contrasting lengthened period phenotype [21]. Altogether, these previous observations implicate GSK3 as an important intrinsic regulator of the circadian rhythms, but, to date, no study investigated the circadian disturbances caused by GSK3 $\beta$  haploinsufficiency in mammals. This experiment focuses on the intrinsic circadian locomotor activity of GSK3 $\beta^{+/-}$  mice to better understand the role of this GSK3 isoform in the circadian clock intrinsic period.

In this study, respective wildtype littermates (WT, n = 5) were used as control subjects for GSK3 $\beta^{+/-}$  mice (n = 5). Both groups had a C57BL/6 genetic background. All animals were males and were about 4 months of age. Mice were genotyped at weaning by polymerase chain reaction amplification from ear punch of genomic DNA. Before the experiment, mice were housed 4-5/cage in a humidity-controlled room at 23 °C on a 12-hour light-dark cycle with ad libitum access to food and water. The Université Laval Institutional Animal Care Committee approved all experimental procedures in line with guideline from the Canadian Council on Animal Care.

To record the circadian locomotor activity, mice were housed individually in cages equipped with a running wheel (Coulbourn Instruments, Whitehall, PA) to record their circadian running activity. Mice were first entrained to a 12h light/12 h dark cycle (LD) for 14 days (lights on at 7:00 am and off at 7:00 pm) and then placed under constant darkness (DD) for 14 days to allow free-running. Wheel running activity was monitored continuously using the ClockLab software (Actimetrics, Wilmette, IL).

Actograms were generated using the 6-min bins of activity and double plotted for easier visualisation. A representation of the activity profile over 24h was also generated for ease of examination. The period length as well as the level of locomotor activity were calculated using batch analysis in ClockLab software. All parameters were analysed using an independent *t*-test to compare

WT and GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> mice and are presented with the standard error of the mean (SEM). All analyses were performed using GraphPad Prism software (La Jolla, CA).

Under LD, both WT and GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> mice were well entrained to the LD cycle, with most of the running activity occurring during the dark phase as seen on the actogram presented in figure 5.1A and B. Under DD, the free-running period of GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> mice was significantly lengthened ( $23.83 \pm 0.05$  h) when compared to the WT mice ( $23.54 \pm 0.10$  h;  $p = 0.0374$ ). The 24h activity profile under LD and DD confirms those observations (figure 5.1C-F) with GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> mice being less active than WT mice between 7:00 am and 7:00 pm under DD, representing the subjective light phase (figure 5.1F). While apparently small, this difference in period length between WT and GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> mice resulted in noticeable difference in activity pattern under DD condition. The lengthening in the intrinsic circadian period in GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> mice to a value that is closer to 24h resulted in maintenance of the activity pattern between LD and DD conditions (figure 5.1B). In contrast, WT animals that have a shorter endogenous period, displayed a shift in onset and offset of locomotor activity (figure 5.1A) that resulted in enhanced activity at the end of the subjective light period and in a drop in activity during the latter half of the subjective dark phase.

When analysing the level of locomotor activity under the light and dark phases, most of the parameters as presented in figure 5.2 were not significantly different between WT and GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> mice. For example, no difference was observed in the number of wheel revolutions per minute and per day under LD and DD between WT and GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> mice. When analysing the activity during the different phases under LD, the number of wheel revolutions remained not significant between WT and GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> mice during the light phase as well as during the dark phase. However, the number of wheel revolutions of GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> mice was significantly lower ( $p = 0.0144$ ) during the subjective light phase in DD (between 7:00 am and 7:00 pm) which is in line with the lengthening of their intrinsic circadian period. During the subjective dark phase (between 7:00 pm and 7:00 am), the number of wheel revolutions was not significant between WT and GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> mice.

The results presented here demonstrated that the haploinsufficiency of GSK3 $\beta$  lengthens the intrinsic circadian period in mice, supporting the hypothesis that GSK3 $\beta$  act as an intrinsic regulator of the molecular clock. Moreover, no difference in the daily number of wheel revolutions has been

reported, suggesting that WT and GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> mice have similar locomotor activity levels as previously observed [22].

These observations are consistent with an implication of GSK3 expression on the circadian locomotor activity of vertebrates. The shorter circadian locomotor activity period observed in *Drosophila* over-expressing the GSK3 ortholog *sgg* was attributed to early nuclear translocation of the PERIOD/TIMELESS heterodimer. On the other hand, the period was lengthened following a decrease in *sgg* activity, which is compatible with our observation in mice [21]. Furthermore, GSK3 $\beta$  haploinsufficiency mimicked the circadian phenotype previously observed in vertebrates following lithium treatment. Indeed, the period of the circadian activity rhythm is lengthened following lithium treatment in mice [7] and lithium treatment lengthened the period of free-running activity even in SCN lesioned hamsters [9].

The studies on the molecular targets of GSK3 in circadian physiology suggest potential mechanisms which may help understanding the circadian phenotype observed in GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> mice. First, GSK3 $\beta$  directly phosphorylates PER2 and promotes its nuclear translocation. Therefore, a decrease in the activation of GSK3 $\beta$  would result in a phase delay caused by the late nuclear transfer of PER2. Alternatively, a phase advance would be caused by an increased GSK3 $\beta$  function [23]. Second, in cultured cells, GSK3 $\beta$  phosphorylates and stabilises the orphan nuclear receptor Rev-erba known as a negative component of the circadian clock. Moreover, the rapid proteasomal degradation of Rev-erba and the activation of the gene *Bmal1* were observed following lithium treatment of cells suggesting that Rev-erba is a biological target of GSK3 $\beta$  as well as lithium [24]. Finally, GSK3 $\beta$  phosphorylates BMAL1 and controls the amplitude of the circadian oscillation in stabilizing this protein, which appears to be crucial to maintain the robustness of the circadian clock [25].

In conclusion, the results presented here support an important role of GSK3 $\beta$  in the circadian behavior and its regulation following lithium treatment. Further detailed studies are necessary to uncover the mechanisms of this regulation as well as the role of this other GSK3 isoform, GSK3 $\alpha$ , in the circadian rhythms. Because dysregulation of GSK3 is involved in many disorders linked with

circadian rhythms dysfunctions, a better understanding of the modulation of circadian physiology by GSK3 may lead to novel therapeutics for circadian disturbances.

### **Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

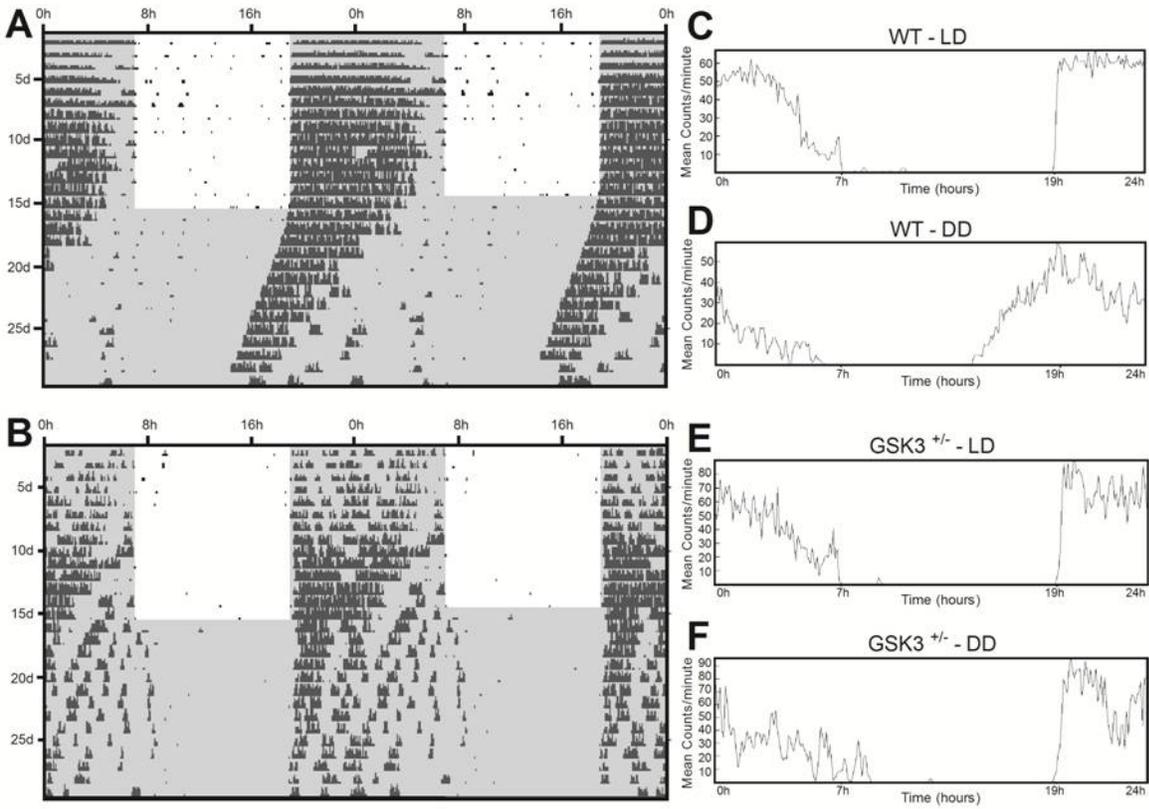
### **Acknowledgements**

We thank James R. Woodgett for GSK3 haploinsufficient mice as well as Nathalie Bouchard and Kathye Aubé for assistance maintaining mice colonies. J.L. is recipient of fellowships from the Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQ-S) and the Canadian Federation of University Women (CFUW). J.M.B. is Canada research Chair in Molecular Psychiatry. This work was supported by a Canadian Institutes of Health Research (CIHR) operating grant (NSA 93798) to J.M.B.

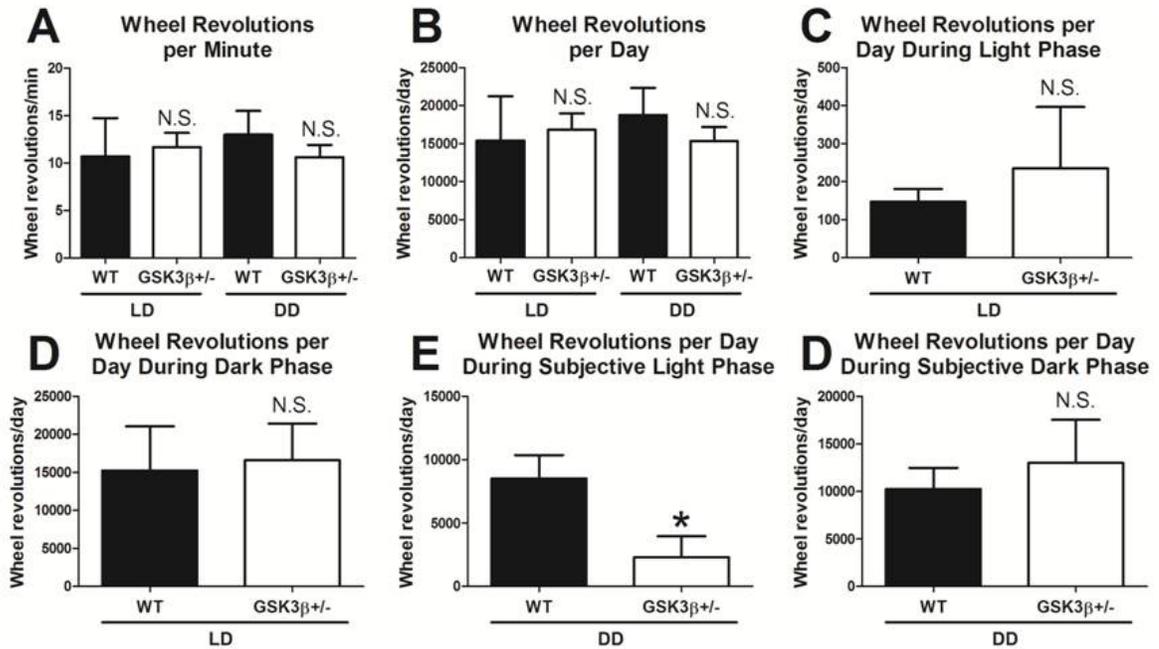
## References

1. Gachon, F., E. Nagoshi, S.A. Brown, et al., *The mammalian circadian timing system: from gene expression to physiology*. *Chromosoma*, 2004. **113**(3): p. 103-12.
2. Schwartz, W.J., R.A. Gross, and M.T. Morton, *The suprachiasmatic nuclei contain a tetrodotoxin-resistant circadian pacemaker*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(6): p. 1694-8.
3. Takahashi, J.S., H.K. Hong, C.H. Ko, et al., *The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease*. *Nat Rev Genet*, 2008. **9**(10): p. 764-75.
4. Mansour, H.A., T.H. Monk, and V.L. Nimgaonkar, *Circadian genes and bipolar disorder*. *Ann Med*, 2005. **37**(3): p. 196-205.
5. Mason, R. and S.M. Biello, *A neurophysiological study of a lithium-sensitive phosphoinositide system in the hamster suprachiasmatic (SCN) biological clock in vitro*. *Neurosci Lett*, 1992. **144**(1-2): p. 135-8.
6. Abe, M., E.D. Herzog, and G.D. Block, *Lithium lengthens the circadian period of individual suprachiasmatic nucleus neurons*. *Neuroreport*, 2000. **11**(14): p. 3261-4.
7. Iwahana, E., T. Hamada, A. Uchida, et al., *Differential effect of lithium on the circadian oscillator in young and old hamsters*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **354**(3): p. 752-6.
8. Iwahana, E., M. Akiyama, K. Miyakawa, et al., *Effect of lithium on the circadian rhythms of locomotor activity and glycogen synthase kinase-3 protein expression in the mouse suprachiasmatic nuclei*. *Eur J Neurosci*, 2004. **19**(8): p. 2281-7.
9. LeSauter, J. and R. Silver, *Lithium lengthens the period of circadian rhythms in lesioned hamsters bearing SCN grafts*. *Biol Psychiatry*, 1993. **34**(1-2): p. 75-83.
10. Li, J., W.Q. Lu, S. Beesley, et al., *Lithium impacts on the amplitude and period of the molecular circadian clockwork*. *PLoS One*, 2012. **7**(3): p. e33292.
11. Piel, C.J. and P.S. Klein, *Molecular targets of lithium action*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001. **41**: p. 789-813.
12. Kaladchibachi, S.A., B. Doble, N. Anthopoulos, et al., *Glycogen synthase kinase 3, circadian rhythms, and bipolar disorder: a molecular link in the therapeutic action of lithium*. *J Circadian Rhythms*, 2007. **5**: p. 3.
13. Woodgett, J.R., *Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A*. *EMBO J*, 1990. **9**(8): p. 2431-8.
14. Doble, B.W. and J.R. Woodgett, *GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 7): p. 1175-86.
15. O'Brien, W.T., A.D. Harper, F. Jove, et al., *Glycogen synthase kinase-3beta haploinsufficiency mimics the behavioral and molecular effects of lithium*. *J Neurosci*, 2004. **24**(30): p. 6791-8.
16. Kaidanovich-Beilin, O., T.V. Lipina, K. Takao, et al., *Abnormalities in brain structure and behavior in GSK-3alpha mutant mice*. *Mol Brain*, 2009. **2**: p. 35.
17. Kim, W.Y. and W.D. Snider, *Functions of GSK-3 Signaling in Development of the Nervous System*. *Front Mol Neurosci*, 2011. **4**: p. 44.
18. Latapy, C., V. Rioux, M.J. Guitton, et al., *Selective deletion of forebrain glycogen synthase kinase 3beta reveals a central role in serotonin-sensitive anxiety and social behaviour*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2012. **367**(1601): p. 2460-74.

19. Beaulieu, J.M., T.D. Sotnikova, W.D. Yao, et al., *Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(14): p. 5099-104.
20. Paul, J.R., R.L. Johnson, R.S. Johe, et al., *Disruption of circadian rhythmicity and suprachiasmatic action potential frequency in a mouse model with constitutive activation of glycogen synthase kinase 3*. Neuroscience, 2012. **226**: p. 1-9.
21. Martinek, S., S. Inonog, A.S. Manoukian, et al., *A role for the segment polarity gene shaggy/GSK-3 in the Drosophila circadian clock*. Cell, 2001. **105**(6): p. 769-79.
22. Beaulieu, J.M., S. Marion, R.M. Rodriguiz, et al., *A beta-arrestin 2 signaling complex mediates lithium action on behavior*. Cell, 2008. **132**(1): p. 125-36.
23. Iitaka, C., K. Miyazaki, T. Akaike, et al., *A role for glycogen synthase kinase-3beta in the mammalian circadian clock*. J Biol Chem, 2005. **280**(33): p. 29397-402.
24. Yin, L., J. Wang, P.S. Klein, et al., *Nuclear receptor Rev-erbalpha is a critical lithium-sensitive component of the circadian clock*. Science, 2006. **311**(5763): p. 1002-5.
25. Sahar, S., L. Zocchi, C. Kinoshita, et al., *Regulation of BMAL1 protein stability and circadian function by GSK3beta-mediated phosphorylation*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8561.



**Figure 5.1.** Representative wheel running behavior for WT and GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> mice. Example of a double-plotted actogram for a WT mouse (A) and a GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> mouse (B) showing running activity under LD and DD. The lights were turned on at 7:00 am (white bars) and turned off at 7:00 pm (gray bars). The activity profile was then transferred on a schematic representation over 24h for the WT mouse under LD (C) and DD (D) as well as for the GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> mouse under LD (E) and DD (F).



**Figure 5.2.** Mean level of locomotor activity between WT and GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> mice. Number of wheel revolutions per minute under LD and DD (A). Number of wheel revolutions per day under LD and DD (B). Number of wheel revolutions under LD during the light phase (C) and the dark phase (D). Number of wheel revolutions under DD during the subjective light phase (E) and the subjective dark phase (F). The results are presented with the SEM. (\*: p < 0.05)



## CHAPITRE 6 : DISCUSSION GÉNÉRALE

### 6.1. Récapitulation des résultats

L'objectif général de cette thèse était d'investiguer les origines de certains déficits et anomalies des fonctions rétiniennes et des rythmes circadiens qui ont été retrouvés chez les patients atteints de maladies psychiatriques, dont le TAS et la schizophrénie, ainsi que chez des enfants à haut risque génétique de développer une maladie psychiatrique. Les deux premières études avaient pour but de comprendre l'implication dans les fonctions rétiniennes des amines reconnues pour jouer un rôle potentiel dans la pathophysiologie des maladies psychiatriques, dont le TAS, c'est-à-dire la mélatonine, la dopamine centrale et la sérotonine centrale. Plus précisément, la première étude démontre que l'ingestion d'une dose élevée de mélatonine provoque une diminution de l'amplitude des ondes a et b de l'ERG des cônes et des bâtonnets chez le chien. Quant à la deuxième étude, elle utilise des modèles animaux qui présentent un changement dans la neurotransmission sérotoninergique centrale ou dopaminergique centrale, c'est-à-dire les souris Tph2-KI, DAT-KO, D1R-KO et D2R-KO et démontre que certains paramètres de l'ERG sont modulés par une dysfonction de la sérotonine centrale ou de la dopamine centrale de même que par la perte du récepteur D1R. Les résultats obtenus dans ces études corroborent certaines anomalies de l'ERG qui ont été observées dans le TAS, ce qui permet de suggérer un modèle multifactoriel qui pourrait expliquer les anomalies de l'ERG qui ont été rapportées dans ce trouble. Pour leur part, les deux dernières études se penchent sur GSK3 qui est un facteur de risque pour la schizophrénie et le trouble bipolaire afin d'investiguer son implication dans les anomalies de l'ERG ainsi que dans les dysfonctions circadiennes qui ont été observées chez les patients ou les enfants à risque de ces maladies. De ce fait, la troisième étude démontre une association entre l'amplitude des ondes de l'ERG, particulièrement de l'onde b, avec l'expression des deux isozymes de GSK3. Enfin, la quatrième étude mesure l'activité locomotrice circadienne des souris haploinsuffisantes pour GSK3 $\beta$  et démontre que cette molécule est un important régulateur intrinsèque de l'horloge biologique.

Ce chapitre fait une récapitulation des résultats qui découlent de chacune des études présentées dans cette thèse et discute des mécanismes moléculaires et physiologiques qui

pourraient expliquer les anomalies des fonctions rétiniennes et de la régulation des rythmes circadiens observées dans ces expérimentations, en plus des considérations méthodologiques reliées à chacune de ces études.

### **6.1.1. Étude de l'impact de la prise de mélatonine orale sur l'ERG**

L'une des hypothèses émises pour expliquer l'étiologie du TAS est la présence d'une dysfonction de la mélatonine [113-115, 311]. En effet, des anomalies dans la période de sécrétion de cette hormone chez les sujets atteints du TAS ont été observées [113, 311] et des expérimentations ont rapporté une association entre l'inhibition de la mélatonine et la rémission des symptômes dépressifs chez des personnes avec TAS [114, 115]. En plus d'être produite principalement par la glande pinéale, la mélatonine est aussi sécrétée par différentes structures oculaires, dont la rétine, ce qui nous amène à suggérer qu'elle pourrait jouer un rôle potentiel dans les anomalies de l'ERG qui ont été observées chez les personnes atteintes du TAS. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'impact sur l'ERG de la prise d'une forte dose orale de mélatonine sur les systèmes des cônes et des bâtonnets et, indirectement, cette expérimentation nous informe sur comment la mélatonine pourrait influencer l'ERG dans le TAS. L'hypothèse émise était que l'ingestion d'une forte dose de mélatonine favoriserait le système des bâtonnets et diminuerait ainsi l'amplitude des ondes a et b du système des cônes. Cette hypothèse a été confirmée en partie puisque le résultat principal démontre que la mélatonine provoque une diminution drastique de l'amplitude des ondes a et b du système des cônes. Quant au système des bâtonnets, cette expérimentation démontre qu'il est aussi affecté par la prise d'une forte dose de mélatonine, mais d'une manière beaucoup moins prononcée que ce qui est observé dans le système des cônes. Cette section traite des résultats obtenus dans cette expérimentation, de ses limitations, des mécanismes physiologiques potentiels qui pourraient expliquer les observations de l'étude et, finalement, des liens avec les anomalies de l'ERG qui ont été observées dans le TAS.

Dans cette étude, des chiens ont été utilisés puisque leurs rythmes circadiens ressemblent sensiblement à ceux des humains. En effet, il a été observé que les chiens sont des animaux qui sont majoritairement actifs durant le jour et qui passent une bonne partie de la nuit à dormir [313]. De plus, il a été démontré que la sécrétion de mélatonine chez les chiens suit un rythme qui s'apparente

beaucoup à celui des humains, où sa production débute en soirée pour atteindre sa sécrétion maximale vers 2 h du matin et redescendre à son niveau basal le matin [314]. Cela dit, tout comme chez l'humain, la mélatonine s'avère un signal de sommeil pour les chiens et cette espèce représente ainsi un bon modèle pour étudier les effets de la mélatonine sur l'ERG afin de les transposer chez l'humain.

Tel que mentionné précédemment, le résultat principal de cette étude démontre que l'ingestion d'une dose élevée de mélatonine (90 mg) durant le jour réduit grandement la réponse du système des cônes. En effet, on observe une diminution drastique de l'amplitude des ondes a et b du système photopique de même qu'une diminution de l'amplitude de l'ERG flicker à toutes les fréquences testées suite à l'ingestion de mélatonine. D'ailleurs, ces résultats corroborent ce qui a été observé chez l'humain, où l'ingestion de 15 mg de mélatonine a provoqué une diminution d'environ 8 % de l'amplitude maximale de l'onde b des cônes [315]. De plus, les observations de la présente expérimentation vont dans le sens des résultats qui ont été rapportés dans certaines études et qui ont démontré une association entre le niveau de mélatonine endogène et une variation circadienne de certains paramètres de l'ERG chez l'humain [269, 316]. Les mécanismes potentiellement à l'origine de ces observations sont discutés plus loin dans cette section.

Également, la présente étude est la première à investiguer l'impact de la mélatonine exogène sur le système des bâtonnets durant le jour, soit lorsqu'elle n'est physiologiquement pas présente dans l'organisme, et démontre que ce système est aussi affecté par la prise d'une dose élevée de cette hormone. En fait, on rapporte une diminution globale des amplitudes des ondes a et b suite à l'ingestion de mélatonine, mais l'amplitude maximale de ces ondes n'est pas affectée par la prise de cette hormone. Cependant, en comparant les valeurs individuelles de chacun des paramètres de l'ERG en condition scotopique (table 2.3), on constate une grande variabilité entre les sujets. Cette variabilité est reflétée par l'écart-type élevé des moyennes pour l'amplitude maximale de l'onde a (contrôles =  $-306,90 \pm 59,35 \mu\text{V}$ ; mélatonine =  $-230,30 \pm 60,42 \mu\text{V}$ ) et du  $V_{\text{max}}$  qui représente l'amplitude maximale de l'onde b (contrôles =  $519,50 \pm 70,47 \mu\text{V}$ ; mélatonine =  $437,60 \pm 103,40 \mu\text{V}$ ). De plus, chez le chien numéro 2, on remarque que l'ingestion de mélatonine a provoqué une augmentation de l'amplitude maximale de l'onde a et du  $V_{\text{max}}$ , ce qui va dans le sens contraire de ce qui est observé chez les autres chiens. D'ailleurs, les différences rapportées pourraient être

expliquées par plusieurs facteurs. Par exemple, il y avait un stimulateur différent pour chaque œil et un positionnement différent de celui-ci entre les séances d'enregistrement aurait pu faire varier les résultats. De plus, la variabilité entre les données aurait pu aussi être causée par un placement différent de l'électrode principale. Afin de minimiser l'effet de cette variabilité, les données rapportées dans les tables représentent la moyenne des valeurs entre les deux yeux et aucune différence significative n'a été décelée dans ces valeurs entre les deux yeux pour chacun des paramètres. Cependant, malgré cela, on retrouve tout de même une grande variabilité dans les résultats entre les sujets, particulièrement dans la condition scotopique.

Cette étude comporte aussi quelques lacunes. Premièrement, seulement sept chiens ont été testés dans le cadre de cette expérimentation, ce qui représente un petit échantillon de sujets. En fait, il faut garder en tête qu'en condition scotopique, une différence globale significative est observée pour les amplitudes des ondes a ( $p = 0,050$ ) et b ( $p = 0,044$ ) et qu'une tendance est rapportée pour une différence dans les valeurs de l'amplitude maximale de l'onde a ( $p = 0,058$ ) et du  $V_{max}$  ( $p = 0,069$ ). Or, une analyse de puissance effectuée par la suite a révélé qu'avec un nombre de 15 chiens, une différence dans les valeurs de l'amplitude maximale des ondes a et b aurait pu être détectée avec 85 % de puissance. Deuxièmement, le protocole utilisé ne permet pas de déterminer si les déficits de l'ERG sont le résultat d'une toxicité causée par la forte dose de mélatonine. Afin de compléter l'étude, il aurait été intéressant de mesurer un ERG sur les mêmes chiens 24 heures après la prise de mélatonine afin de vérifier si l'effet grandement négatif de cette hormone sur le système des cônes persiste. Dans le cas où la diminution de l'amplitude des ondes a et b avait été présente à ce moment et même durant les jours suivants, une étude histologique subséquente aurait été pertinente pour analyser l'intégrité du système rétinien et déceler s'il y a présence d'une toxicité cellulaire dans la rétine. De plus, des tests visuels auraient pu permettre de déterminer si la vision des chiens est aussi affectée suite à l'ingestion de mélatonine malgré le fait qu'une anomalie de l'ERG ne s'accompagne pas toujours de dysfonctions visuelles. Or, dans la présente étude, un examen ophtalmologique a été effectué après l'expérimentation et aucun signe clinique de toxicité n'a été décelé (résultats non montrés). D'ailleurs, les chiens étudiés ont été utilisés pour d'autres expérimentations [317, 318] effectuées après plusieurs jours, voire des mois, et aucune anomalie de l'ERG n'a été observée en condition basale.

En écartant l'hypothèse de la présence de toxicité rétinienne, on peut pencher en faveur d'un dysfonctionnement moléculaire dans la rétine pour expliquer les résultats observés dans cette étude. En fait, il faut garder à l'esprit que, dans la rétine, la mélatonine et la dopamine agissent comme antagonistes mutuels et pourraient être à l'origine du changement entre la vision de nuit et la vision de jour [261]. À vrai dire, de par son expression nocturne, la mélatonine pourrait être en mesure de favoriser le système des bâtonnets pour la vision de nuit [263], tandis que la dopamine, dont la production est augmentée par la lumière, pourrait jouer en faveur du système des cônes pour la vision de jour [262]. Cependant, l'une des principales limitations de cette étude est qu'aucune mesure directe ou indirecte de la dopamine ni de la mélatonine n'a été effectuée. Cela dit, il n'est pas possible de déterminer si les phénotypes observés à l'ERG résultent directement d'une augmentation de la mélatonine seule ou indirectement d'une diminution de la dopamine dans la rétine. En se basant sur la littérature scientifique, on peut donc favoriser l'implication de l'antagonisme mélatonine/dopamine dans la rétine pour spéculer sur les mécanismes physiologiques à l'origine des anomalies de l'ERG rapportées dans la présente étude. D'ailleurs, en ce qui a trait à la dopamine, une étude chez les patients dépendants à la cocaïne a démontré qu'une diminution de l'amplitude de l'onde b des cônes bleus est associée à une réduction de la concentration cérébrospinale de HVA qui est un métabolite de la dopamine [297]. De plus, il a été rapporté que la communication entre les cônes et les bâtonnets se fait par des jonctions électriques qui sont sous le contrôle des récepteurs dopaminergiques D2. Ces jonctions électriques sont découplées lorsque la dopamine est produite durant le jour et couplées lorsque la dopamine est supprimée par la mélatonine durant la nuit [229]. Aussi, une étude sur le necture, qui est un type de salamandre, a démontré que les antagonistes dopaminergiques augmentent le couplage des cellules horizontales, ce qui permet d'intégrer et de réguler les signaux de plusieurs photorécepteurs [319]. Ce phénomène se ferait via les récepteurs dopaminergiques de la famille D1 [229]. Cela suggère que, dans la présente étude chez le chien, la diminution marquée de l'amplitude des ondes a et b des systèmes des cônes et des bâtonnets pourrait être associée à la diminution probable de la dopamine causée par l'ingestion d'une forte dose de mélatonine.

Une autre hypothèse physiologique suggère que la dopamine pourrait aussi être impliquée dans la diminution de l'amplitude de l'onde a, et ce, via son effet sur la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. En fait, la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase est retrouvée dans le segment externe des photorécepteurs et elle

permet de garder ces cellules dépolarisées dans l'obscurité [229]. L'hyperpolarisation des photorécepteurs, qui est reflétée par l'onde a de l'ERG, est provoquée par l'inhibition de cette pompe. Chez le rat, il a été démontré que la dopamine inhibe la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase des bâtonnets via les récepteurs de type D4R [320]. Cela dit, il a été spéculé par la suite que la dopamine favoriserait l'hyperpolarisation des bâtonnets [229]. À la lumière de ces résultats, on peut suggérer que l'ingestion d'une dose élevée de mélatonine mènerait à une diminution de la dopamine rétinienne et ainsi à une réduction de l'inhibition de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Cela provoquerait une diminution de l'hyperpolarisation des bâtonnets qui pourrait se traduire par une réduction globale des amplitudes de l'onde a en condition scotopique, telle que rapportée dans la présente étude. Cependant, l'effet de la dopamine sur la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase a été étudiée seulement chez le rat, qui est une espèce nocturne, et son effet sur les cônes demeure encore inconnu. Or, puisque la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase se retrouve sur tous les photorécepteurs y compris les cônes [321, 322], il est possible de spéculer qu'une diminution de la production de dopamine rétinienne pourrait aussi réduire l'inhibition de cette pompe sur les cônes et ainsi diminuer l'hyperpolarisation des cônes. Cela pourrait expliquer la réduction globale des amplitudes de l'onde a observée en condition photopique dans la présente étude.

Ce phénomène pourrait aussi avoir un impact indirect sur l'amplitude de l'onde b de l'ERG. En fait, si l'hyperpolarisation des photorécepteurs est diminuée (suite à la réduction de l'inhibition de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase causée par une baisse de dopamine rétinienne), la dépolarisation subséquente des cellules bipolaires rétiniennes pourrait elle aussi être diminuée. De plus, en tenant compte que l'amplitude de l'onde b de l'ERG est dépendante de l'amplitude de l'onde a (parce que l'amplitude de l'onde b est mesurée à partir de l'amplitude maximale de l'onde a), on peut suggérer qu'une réduction de l'amplitude de l'onde a mènerait à une diminution de l'amplitude de l'onde b. En d'autres termes, la diminution de la dopamine rétinienne provoquerait une réduction de l'hyperpolarisation des photorécepteurs (par la réduction de l'inhibition de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase), ce qui diminuerait le signal électrique envoyé aux cellules bipolaires et qui se traduirait par une diminution de l'amplitude de l'onde b, telle qu'observée dans la présente étude. Afin de valider ces hypothèses, il serait intéressant d'étudier l'effet de la dopamine et de la mélatonine sur la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase des cônes et des bâtonnets chez le chien ainsi que chez d'autres espèces diurnes.

Par ailleurs, la sérotonine, qui est le précurseur de la mélatonine, est reconnue pour jouer un rôle dans la vasoconstriction des vaisseaux sanguins [238, 239]. Or, il a été rapporté que la mélatonine joue aussi un rôle semblable [323] et il a été démontré, chez l'humain, que le récepteur de la mélatonine MT1 est exprimé dans le réseau vasculaire de la rétine [324]. De plus, une étude a rapporté qu'il est possible de déceler une perte des fonctions rétinienne résultant d'une ischémie grâce à l'ERG puisque l'amplitude de l'onde b des cônes et des bâtonnets est diminuée suite à une occlusion de la veine rétinienne centrale [325]. Dans un même ordre d'idées, il a aussi été démontré, chez l'humain, que la dopamine augmente le diamètre des vaisseaux sanguins de la rétine [326]. Selon ces résultats, il est possible de spéculer que la dose élevée de mélatonine pourrait avoir provoqué une vasoconstriction des vaisseaux sanguins de la rétine, ce qui pourrait être à l'origine de la diminution de l'amplitude de l'onde b des cônes et des bâtonnets observée dans la présente étude. Dans le but de valider cette hypothèse, il serait pertinent d'analyser l'intégrité du système vasculaire de la rétine des chiens suite à la prise d'une forte dose de mélatonine.

Les principales anomalies de l'ERG qui ont été rapportées lors de la phase dépressive du TAS sont une diminution de la sensibilité des bâtonnets (logK), une diminution de l'amplitude de l'onde b des cônes et une augmentation de la latence de l'onde b des cônes [38]. Or, les résultats présentés ici démontrent que l'ingestion de la mélatonine n'affecte pas la sensibilité rétinienne (d'après le paramètre du logK) ni la latence des ondes, et ce, dans les conditions photopique et scotopique. Cela dit, la présente étude suggère qu'un dysfonctionnement de la mélatonine pourrait expliquer partiellement les anomalies de l'ERG observées chez les personnes atteintes du TAS puisqu'elle démontre que l'augmentation de mélatonine dans l'organisme peut, entre autres, diminuer l'amplitude de l'onde b des cônes, ce qui corrobore l'une des anomalies de l'ERG qui a été retrouvée dans le TAS. D'ailleurs, tel que mentionné précédemment, certaines observations suggèrent l'implication de la mélatonine dans l'étiologie du TAS [113-115, 311], mais il faut garder en tête que l'hypothèse de la mélatonine dans le TAS demeure controversée puisque certaines études n'ont pas été en mesure de répliquer les résultats qui découlent de ces expérimentations [116, 117]. Or, des études ont démontré une association entre la sécrétion de mélatonine endogène et la variation circadienne des paramètres de l'ERG [316], ce qui supporte l'hypothèse qu'un déséquilibre de la sécrétion de mélatonine dans le TAS pourrait être en partie impliqué dans les anomalies de l'ERG qui ont été observées dans ce trouble. Par exemple, une étude portant sur la période de sécrétion de

mélatonine selon le chronotype a rapporté des résultats sur l'impact de la mélatonine endogène sur l'ERG qui vont dans le sens des observations de la présente étude [316]. En fait, il a été démontré que les types du soir ont une concentration de mélatonine salivaire plus élevée le matin en comparaison avec les types du matin, alors que la situation opposée est observée le soir. Ce déphasage de la sécrétion de mélatonine le matin a été associé à une diminution de l'amplitude des ondes a et b du système des cônes et des bâtonnets ainsi qu'à une diminution de la sensibilité des bâtonnets le matin. De plus, une corrélation négative a été observée entre la concentration de mélatonine salivaire et l'amplitude de l'ERG des cônes ainsi que de la réponse mixte des cônes et des bâtonnets. En somme, les résultats qui ont été rapportés chez l'humain suite à un déphasage de la sécrétion de mélatonine endogène corroborent partiellement les observations démontrées dans la présente étude. Cela supporte l'hypothèse que la mélatonine pourrait être en partie impliquée dans les anomalies de l'ERG qui ont été retrouvées chez les sujets atteints du TAS.

Bref, à la lumière des résultats observés dans la présente étude, il est possible de suggérer que les déficits de l'ERG qui ont été rapportés chez les sujets atteints du TAS durant la phase dépressive pourraient être expliqués partiellement par un dysfonctionnement de la mélatonine, mais d'autres mécanismes entrent inévitablement en jeu dans ces anomalies de l'ERG. En plus de l'implication de la mélatonine, d'autres hypothèses ont été émises afin de comprendre l'étiologie du TAS, dont une diminution de la neurotransmission de la sérotonine centrale et une augmentation de la neurotransmission de la dopamine centrale. Il est intéressant de constater que ces deux neurotransmetteurs sont directement reliés à la mélatonine puisque la sérotonine est son précurseur et que la dopamine est son antagoniste dans la rétine. Les résultats présentés ici ont permis de spéculer sur l'implication de la dopamine rétinienne dans le phénotype de l'ERG observé suite à l'ingestion d'une forte dose de mélatonine, mais l'effet d'une augmentation de la neurotransmission dopaminergique centrale sur l'ERG demeure toujours inconnu. De plus, les données de la présente étude ne permettent pas d'émettre des hypothèses sur l'implication de la sérotonine dans l'ERG puisque c'est une dose de mélatonine exogène qui a été utilisée dans cette expérimentation. Cela dit, dans le but de valider ces hypothèses dans le TAS et dans les autres maladies ainsi que pour mieux comprendre l'implication de ces monoamines centrales dans l'ERG, de plus amples expérimentations étaient de mise avec des modèles animaux différents comme des souris génétiquement modifiées.

## **6.1.2. Étude de l'implication de la sérotonine et de la dopamine centrale sur l'ERG**

De nombreuses études suggèrent l'implication de la sérotonine centrale [85, 86, 95-98] et de la dopamine centrale [119, 158] dans l'étiologie des maladies psychiatriques, dont le TAS. Il a aussi été démontré que plusieurs drogues utilisées en psychiatrie exercent leur mode d'action via les récepteurs dopaminergiques de type D1R et D2R [52, 62] et que certains de ces composés influencent les paramètres de l'ERG [230-235, 242, 300-303]. L'objectif de cette étude était d'évaluer si les anomalies de l'ERG observées chez les patients atteints de maladies psychiatriques peuvent être associées à des changements sérotoninergiques ou dopaminergiques centraux ou à des altérations de la neurotransmission rétinienne de ces monoamines. L'hypothèse émise était qu'une diminution de la sérotonine centrale et une augmentation de la dopamine centrale affecteraient l'ERG d'une manière semblable à ce qui a été retrouvé chez les personnes atteintes du TAS, sachant qu'un déséquilibre au niveau de la neurotransmission de ces monoamines centrales pourrait être potentiellement impliqué dans cette maladie. Pour ce faire, quatre modèles animaux qui présentent des dysfonctions de la neurotransmission sérotoninergique ou dopaminergique ont été utilisés, c'est-à-dire les souris Tph2-KI, DAT-KO, D1R-KO et D2R-KO.

### **Implication de la sérotonine centrale sur l'ERG**

Tout d'abord, les souris Tph2-KI ont été utilisées afin d'évaluer l'impact d'une diminution de la sérotonine centrale sur l'ERG. Il faut garder en tête que la présence de dysfonctions de la neurotransmission sérotoninergique centrale demeure l'une des hypothèses les plus étudiées pour expliquer l'apparition de symptômes dépressifs, comme ceux observés dans le TAS. À titre d'exemple, il a été démontré que les antidépresseurs qui agissent sur la neurotransmission de la sérotonine sont efficaces pour contrer les symptômes dépressifs du TAS [85, 86, 95-97]. De plus, il a été observé que le niveau de sérotonine centrale est réduit lorsque la luminosité extérieure diminue, ce qui pourrait expliquer l'apparition des symptômes dépressifs du TAS à l'hiver [104]. Cela dit, les souris Tph2-KI représentent un modèle animal de choix pour déterminer si une dysfonction sérotoninergique centrale peut moduler l'ERG puisqu'une diminution marquée d'environ 80 % du contenu tissulaire en sérotonine a été décrite dans le système nerveux central de ces souris [48]. D'ailleurs, la présente étude reproduit ce résultat sur la diminution du contenu tissulaire en sérotonine

dans le striatum et ne rapporte aucun changement dans le contenu tissulaire en sérotonine dans la rétine des souris Tph2-KI (figure 3.4). Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que c'est Tph1 qui prédomine dans la rétine, tandis que Tph2 est retrouvée principalement dans le cerveau [327]. Cela confirme que la souris Tph2-KI représente un bon modèle animal pour étudier l'impact sur l'ERG d'une diminution de la neurotransmission sérotoninergique centrale et non rétinienne. Cette section fait un rappel du résultat obtenu à l'ERG avec les souris Tph2-KI et discute des mécanismes potentiels qui pourraient être à l'origine de ce résultat, et ce, en lien avec les anomalies de l'ERG qui ont été retrouvées dans le TAS.

Puisque le polymorphisme de Tph2 retrouvé chez les souris Tph2-KI est associé à la dépression [47], l'hypothèse émise au départ était que ces souris allaient présenter les mêmes anomalies de l'ERG qui ont été observées chez les personnes atteintes du TAS lors de la période dépressive, c'est-à-dire une diminution de la sensibilité du système des bâtonnets, une diminution de l'amplitude de l'onde b des cônes et une augmentation de la latence de l'onde b des cônes. Cependant, cette hypothèse a été confirmée partiellement puisque la présente étude rapporte seulement une augmentation de la latence de l'onde b des cônes chez les souris Tph2-KI en comparaison avec les souris WT, et ce, à presque toutes les intensités lumineuses utilisées (figure 3.2). Cela suggère qu'une diminution de la sérotonine centrale pourrait être à l'origine de l'augmentation de la latence de l'onde b des cônes qui a été observée chez les personnes atteintes du TAS durant la phase dépressive [128].

Cette étude est la première à démontrer qu'une diminution de la neurotransmission sérotoninergique centrale augmente la latence de l'onde b des cônes. Jusqu'alors, il était connu que seule la sérotonine rétinienne pouvait influencer l'ERG d'après ce qui a été démontré dans certaines études pharmacologiques [231, 242]. Cependant, il est difficile de tirer des conclusions claires de ces études puisqu'elles ont utilisé différentes doses d'agents pharmacologiques sur des espèces variées. En résumé, une étude a rapporté que la déplétion de sérotonine rétinienne chez le pigeon provoque une augmentation de l'amplitude de l'onde b ainsi qu'une diminution de la latence de l'onde b des cônes et des bâtonnets [242]. Cependant, il a été démontré que le chat répond d'une manière différente puisque l'injection intravitréale de sérotonine mène à une augmentation de l'amplitude de l'onde b en condition scotopique, et ce, sans modifier la latence des ondes [231].

Au niveau de la rétine, des études ont rapporté que la sérotonine est impliquée dans la fréquence de décharge des cellules ganglionnaires, l'adaptation à la lumière et la vasoconstriction. En effet, au niveau des neurones de la rétine, il a été démontré que les cellules ganglionnaires sont la principale cible de la sérotonine rétinienne puisque celle-ci augmente la décharge des cellules ganglionnaires à centre OFF et diminue la décharge des cellules ganglionnaires à centre ON chez le chat. Il a d'ailleurs été suggéré que ces mécanismes permettraient une meilleure adaptation à la lumière [241]. De plus, il a été observé que la sérotonine favorise la vasoconstriction dans la rétine chez les bovins [238] et les singes [239] en plus de provoquer de l'ischémie rétinienne chez les rats [240]. D'ailleurs, chez l'humain, il a été rapporté que l'application topique d'un antagoniste du récepteur 5-HT<sub>2R</sub> dans les artères ciliaires postérieures augmente le flot sanguin [328]. Cet effet de la sérotonine sur la vasoconstriction des vaisseaux sanguins pourrait d'ailleurs être à l'origine des anomalies de l'ERG qui ont été observées dans les études pharmacologiques préalablement citées [231, 242] puisqu'il a été rapporté que l'amplitude de l'onde b peut être influencée par la vasoconstriction des vaisseaux sanguins [325].

Il faut se rappeler que, dans les deux études pharmacologiques citées précédemment qui portent sur l'impact de la sérotonine sur l'ERG [231, 242], c'est l'expression de la sérotonine rétinienne qui a été altérée directement et qui a provoqué des changements dans l'amplitude de l'onde b de l'ERG. Or, tel que préalablement mentionné, c'est Tph1 qui est responsable de la synthèse de la sérotonine dans la rétine [327]. Cela dit, chez les souris Tph2-KI, il est normal que le contenu tissulaire en sérotonine dans la rétine demeure inchangé et cela suggère que c'est la diminution de la sérotonine centrale qui serait à l'origine de l'augmentation de la latence de l'onde b des cônes observée chez ces souris. Parmi les mécanismes potentiels qui pourraient expliquer ce phénomène, on peut penser qu'il pourrait y avoir une diminution de l'apport en sérotonine dans la rétine qui proviendrait directement du cerveau via les axones rétinopétaux [236]. Cependant, le fait que le contenu tissulaire en sérotonine dans la rétine des souris Tph2-KI est inchangé révèle que cette hypothèse est peu probable. Par contre, on peut suspecter qu'il pourrait y avoir une légère variation sérotoninergique dans la rétine et que sa détection irait alors au-delà des limites des méthodes existantes. Également, l'anomalie de l'ERG chez les souris Tph2-KI pourrait être modulée par des changements physiologiques périphériques. À ce jour, les phénotypes qui ont été observés chez ces souris sont principalement comportementaux, émotionnels et cognitifs, mais des études ont

démontré que les souris Tph2-KI présentent une réduction de la prolactine plasmatique en réponse à l'administration de fenfluramine, ainsi qu'une diminution de la température corporelle suite à l'administration d'un agoniste des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> [329]. Cela dit, il pourrait y avoir un mécanisme périphérique toujours inconnu qui serait à l'origine de l'augmentation de la latence de l'onde b des cônes chez les souris Tph2-KI. Bref, afin d'investiguer ces modèles, il serait intéressant de caractériser les changements périphériques, comme des dysfonctions hormonales, chez les souris Tph2-KI qui pourraient avoir un impact indirect sur l'ERG et, plus particulièrement, sur la latence de l'onde b des cônes.

Il faut aussi garder en tête que la sérotonine est le précurseur de la mélatonine. Ainsi, un changement au niveau de l'expression de Tph (1 ou 2), qui est l'enzyme limitante de la synthèse de la sérotonine, pourrait mener à un dysfonctionnement de ces molécules. Or, il importe de spécifier que c'est l'isoforme Tph1 qui est exprimé dans la glande pinéale et qui est donc impliqué dans la synthèse de la mélatonine centrale [330]. Cela dit, la sécrétion de la mélatonine chez les souris Tph2-KI ne serait pas altérée par leur polymorphisme, donc on peut suggérer que l'anomalie de l'ERG observée chez les souris Tph2-KI ne serait pas associée à un changement au niveau de la sécrétion de cette hormone. Cependant, il faut tenir compte que des dysfonctions circadiennes ont été rapportées chez les souris Tph2-KI. En effet, nous avons observé que les souris Tph2-KI se synchronisent plus lentement à un cycle lumière/noirceur inversé que les souris WT (résultats non montrés). De plus, il a été démontré que les souris Tph2-KI présentent des anomalies du sommeil à ondes lentes [331]. Tout compte fait, on peut suspecter que la sécrétion normale de mélatonine chez ces souris pourrait être altérée par ces dysfonctions circadiennes, ce qui pourrait être à l'origine de leur anomalie observée à l'ERG.

Somme toute, afin de confirmer les résultats obtenus avec les souris Tph2-KI, il serait intéressant de mesurer les fonctions rétinienne chez des patients qui portent la même mutation génétique de Tph2 [47] et de comparer les résultats entre l'humain et l'animal. De plus, dans le but de mieux comprendre l'implication des isoformes de Tph dans l'ERG, il serait profitable d'étudier l'ERG d'autres modèles animaux comme les souris knockout pour Tph1 et/ou Tph2 [332]. Puisque c'est Tph1 qui est exprimée dans la rétine et dans la glande pinéale [327], les souris Tph1-KO permettraient de déterminer l'impact d'une diminution de la sérotonine et/ou de la mélatonine dans la

rétine et dans le cerveau sur l'ERG. Pour sa part, l'étude des souris Tph2-KO serait un complément à la présente expérimentation pour confirmer si une diminution de la sérotonine centrale affecte l'ERG. Enfin, il serait intéressant d'évaluer si l'injection de 5-HTP peut normaliser l'ERG des souris Tph2-KI.

En somme, les résultats obtenus sur les souris Tph2-KI démontrent qu'une diminution de la neurotransmission sérotoninergique centrale affecte l'ERG, et ce, même si le contenu tissulaire en sérotonine dans la rétine demeure inchangé. À la lumière de ces observations, il est possible de suggérer qu'une diminution de l'expression de la sérotonine centrale serait partiellement responsable des anomalies de l'ERG qui ont été retrouvées chez les personnes atteintes du TAS puisque seule la latence de l'onde b des cônes est augmentée lorsque la sérotonine centrale est réduite. Cela dit, il est évident que d'autres mécanismes et d'autres molécules entrent en jeu dans les anomalies de l'ERG qui ont été observées durant la phase dépressive du TAS et que ceux-ci pourraient être reliés au système dopaminergique.

### **Implication de la dopamine centrale sur l'ERG**

Afin d'investiguer l'implication d'une augmentation de la neurotransmission de la dopamine centrale sur l'ERG, le deuxième modèle animal utilisé dans cette étude est la souris DAT-KO qui s'avère un modèle d'hyperdopaminergie centrale constante [58]. En fait, il a été suggéré qu'une augmentation de l'activité dopaminergique centrale pourrait être impliquée dans certaines maladies psychiatriques, dont le TAS. Par exemple, il a été observé que les personnes atteintes du TAS ont une plus grande fréquence de clignements oculaires [120, 121] et une diminution de la sécrétion de prolactine [124, 125], ce qui s'avère des indices d'une hyperfonction dopaminergique centrale [122, 123]. De plus, une diminution de la disponibilité du transporteur de la dopamine a été observée dans le striatum gauche des personnes atteintes du TAS [119]. Cette section fait un résumé du résultat obtenu à l'ERG chez les souris DAT-KO en lien avec ce qui a été rapporté chez les personnes atteintes du TAS et discute des mécanismes qui pourraient potentiellement être à l'origine de ces observations.

À la lumière des expérimentations précédentes sur les souris DAT-KO [57, 58], celles-ci s'avèrent un modèle de choix pour l'étude de l'implication d'une augmentation de la

neurotransmission dopaminergique centrale en lien avec le TAS. En effet, en raison de l'absence du DAT chez ces souris, il y a une inhibition de la recapture de la dopamine dans le neurone présynaptique, donc la dopamine s'accumule dans la fente synaptique. D'ailleurs, dans le striatum, il a été rapporté que le niveau de dopamine extracellulaire est augmenté de cinq fois, tandis que le contenu tissulaire en dopamine est diminué d'environ 95 % par rapport à celui des souris WT [333, 334]. Or, malgré la présence d'un changement drastique de la concentration de dopamine extracellulaire centrale chez ces souris, la présente étude ne rapporte aucun changement dans le contenu tissulaire en dopamine dans la rétine (figure 3.4). En tenant compte que le contenu tissulaire en dopamine reflète le niveau de stockage intraneuronal et est associé au niveau de la dopamine extracellulaire [334], on peut en déduire que si le contenu tissulaire en dopamine est inchangé dans la rétine des souris DAT-KO, le niveau de dopamine extracellulaire rétinien est lui aussi inchangé chez ces souris. Comme les souris DAT-KO sont un modèle d'hyperdopaminergie, c'est l'augmentation de la concentration de la dopamine extracellulaire dans le striatum qui est rapportée dans la présente étude. Cela dit, les souris DAT-KO représentent un outil pour investiguer l'impact d'une augmentation de la neurotransmission dopaminergique centrale sur l'ERG telle que suggérée dans le TAS.

À partir de l'étude sur l'effet positif d'un antagoniste dopaminergique sur la sensibilité rétinienne chez le chat [230], l'hypothèse émise au départ était que les souris DAT-KO présenteraient une diminution de la sensibilité de l'ERG des bâtonnets. En effet, la présente étude démontre que la seule anomalie de l'ERG observée chez les souris DAT-KO est une diminution de la sensibilité du système des bâtonnets (de 0,16 unités log) telle que mesurée avec le paramètre du logK qui est dérivé des amplitudes de l'onde b (figure 3.5). Ce qui est intéressant ici, c'est qu'une réduction de la sensibilité des bâtonnets de 0,13 unités log a été rapportée chez les personnes atteintes du TAS [128]. Cela suggère que la diminution de la sensibilité des bâtonnets qui a été observée durant la période dépressive chez les personnes atteintes du TAS pourrait être causée par une augmentation de la neurotransmission dopaminergique centrale, ce qui va dans le sens des hypothèses précédemment émises. Or, la présente expérimentation est la première à démontrer que la dopamine centrale a un impact négatif sur la sensibilité des bâtonnets mesurée à partir de l'onde b de l'ERG, mais des études pharmacologiques ont rapporté qu'une dysfonction dopaminergique rétinienne peut aussi moduler l'amplitude de l'onde b de l'ERG. À titre d'exemple, il a été démontré au moyen d'une

fonction logarithmique que l'application de fluphenazine, qui est un antagoniste dopaminergique, dans des yeux perfusés de chat provoque une augmentation de la sensibilité des bâtonnets [230]. De plus, toujours chez le chat, il a été rapporté que la destruction des cellules dopaminergiques de la rétine par la neurotoxine 6-hydroxydopamine (6-OHDA) mène à l'augmentation de l'amplitude de l'onde b dans les conditions scotopique, mésopique et photopique [231]. Cependant, dans cette dernière étude, une seule intensité lumineuse a été utilisée dans chacune des conditions, ce qui ne permet pas d'analyser la dynamique de l'impact d'une déplétion de dopamine rétinienne sur l'ERG. Or, si plus d'intensités lumineuses avaient été utilisées, on peut suspecter que le paramètre du logK aurait peut-être été altéré. À la lumière de ces résultats pharmacologiques, on peut conclure que la dopamine rétinienne provoque un impact négatif sur l'amplitude de l'onde b de l'ERG.

Ces observations sur la diminution de l'amplitude de l'onde b de l'ERG par la dopamine rétinienne reflètent bien les rôles physiologiques de ce neurotransmetteur dans la rétine. En effet, l'un des principaux rôles de la dopamine rétinienne est de découpler les jonctions entre les cellules horizontales [229]. D'ailleurs, il est connu que l'organisation synaptique du système des bâtonnets est très divergente par rapport à celle du système des cônes puisque les cellules bipolaires des bâtonnets reçoivent les afférences des cellules horizontales [41]. Cela dit, on peut suggérer que l'altération par la dopamine de l'amplification du signal des bâtonnets par les cellules horizontales pourrait se traduire par une diminution de l'amplitude de l'onde b des bâtonnets. De plus, il faut garder en tête que l'onde b de l'ERG reflète particulièrement l'activité des cellules bipolaires et une étude électrophysiologique a rapporté un effet négatif de la dopamine sur ce type de cellules rétinienne. En fait, chez des yeux perfusés de roussette, qui est un type de poisson, il a été démontré que l'application de petites quantités de dopamine provoque une hyperpolarisation des cellules bipolaires ON des bâtonnets et réduit ainsi leur réponse à des stimulations lumineuses. Cet effet de la dopamine a d'ailleurs été associé à une diminution de l'amplitude de l'onde b de l'ERG des bâtonnets chez cette espèce. Les auteurs de cette étude ont donc suggéré qu'il existerait une voie sélective dopaminergique qui agirait directement sur les cellules bipolaires ON des bâtonnets et qui pourrait affecter la sensibilité du système scotopique de la rétine [335].

Il faut cependant tenir compte que les résultats qui ont été observés dans les expérimentations pharmacologiques précédemment citées sont le fruit d'une dysfonction

dopaminergique directement dans la rétine. Or, la diminution de la sensibilité du système des bâtonnets chez les souris DAT-KO provient d'un changement dans la dopamine centrale puisque le contenu tissulaire en dopamine dans la rétine de ces souris est inchangé. L'hypothèse la plus plausible pour expliquer ce changement de l'ERG chez ces souris implique une variation périphérique de la prolactine. En fait, il a été démontré que les souris DAT-KO présentent un dysfonctionnement de l'hypophyse qui provoque une diminution de la sécrétion de prolactine par cette glande [336]. La prolactine est aussi synthétisée par la rétine, ce qui suggère un rôle de cette hormone dans la physiologie rétinienne [337]. D'ailleurs, il a été rapporté que, chez les femmes enceintes, la présence d'un niveau de prolactine élevé dans le sang est associée à une augmentation de l'amplitude de l'onde b de l'ERG [338]. Cependant, le rôle de la prolactine dans la rétine demeure nébuleux et de plus amples études sont de mise afin de déterminer si la prolactine peut moduler les paramètres de l'ERG comme la sensibilité rétinienne. En tenant compte de ce changement hormonal chez les souris DAT-KO, il se pourrait donc que la diminution de la sensibilité des bâtonnets soit simplement causée par un dysfonctionnement de l'hypophyse et ainsi par une diminution de la sécrétion de prolactine qui découle de leur mutation génétique. Or, ce qui est intéressant ici c'est qu'une diminution de la prolactine a aussi été rapportée chez les personnes atteintes du TAS [124, 125]. Il faut considérer le fait que la dopamine régule négativement cette hormone [123], donc il est possible de spéculer qu'une augmentation de l'activité dopaminergique centrale dans le TAS serait associée à une réduction de la production de prolactine qui provoquerait une diminution de la sensibilité du système des bâtonnets semblable à celle qui a été observée à l'ERG chez les patients atteints de ce trouble. Afin de valider cette hypothèse, il serait intéressant d'injecter de la prolactine aux souris DAT-KO et de vérifier si cela normalise l'ERG.

À ce jour, le traitement de choix pour le TAS est la luminothérapie et il a été démontré que l'ERG des personnes atteintes du TAS se normalise suite à un traitement de quatre semaines de luminothérapie [128]. Or, il faut garder en tête qu'il a été rapporté que la production de dopamine dans la rétine est augmentée à la lumière [339] et, considérant l'impact négatif de la dopamine rétinienne (et centrale) sur l'ERG, il serait contradictoire de spéculer que l'effet normalisateur et thérapeutique de la luminothérapie passerait par la dopamine rétinienne. Cependant, étant donné que la rétine est en constante interaction avec le cerveau, on peut suggérer que la luminothérapie pourrait non pas avoir un effet rétinien sur la dopamine, mais bien central, et ce, indirectement via

l'augmentation de la sérotonine centrale. En fait, il a été démontré que, dans le système limbique, la sérotonine et la dopamine agissent comme antagonistes [340]. De plus, il a été rapporté que le niveau de sérotonine centrale est plus élevé lors des jours ensoleillés en comparaison avec les jours plus sombres [104]. Cela dit, on peut spéculer que la réduction de la photopériode à l'automne diminuerait le niveau de sérotonine centrale et favoriserait ainsi l'apparition des symptômes dépressifs caractéristiques du TAS. Pour sa part, la luminothérapie stimulerait la production de sérotonine afin de contrer ces symptômes. En d'autres termes, une augmentation de la production de sérotonine centrale par la luminothérapie pourrait diminuer l'expression de la dopamine centrale et ainsi normaliser la sensibilité du système des bâtonnets.

Enfin, puisque les souris DAT-KO sont souvent utilisées comme un modèle animal du TDAH, il pourrait être intéressant de mesurer un ERG chez des personnes atteintes de ce trouble. D'ailleurs, la luminothérapie a été proposée comme traitement chez des adultes atteints du TDAH et il a été démontré que cette thérapie mène à l'amélioration des symptômes de ce trouble [341]. Cette étude a aussi révélé que la luminothérapie avance la phase circadienne des sujets atteints du TDAH, dont 40 % d'entre eux étaient des types du soir. À la lumière de ces résultats, il est possible de spéculer qu'en plus d'engendrer un réalignement de la phase circadienne, la luminothérapie pourrait exercer son effet thérapeutique en augmentant la production de sérotonine centrale qui, à son tour, inhiberait la dopamine centrale. Somme toute, si un résultat d'ERG semblable à celui des souris DAT-KO était retrouvé chez ces personnes, cela pourrait représenter une signature biologique de ce trouble en plus de renforcer les présentes observations qui démontrent que les anomalies de l'ERG sont des biomarqueurs des dysfonctions monoaminergiques centrales.

Finalement, l'étude de l'ERG des souris DAT-KO démontre qu'une augmentation de la dopamine extracellulaire centrale affecte l'ERG, et ce, même s'il n'y a aucun changement dans le contenu tissulaire en dopamine dans la rétine. Ces observations suggèrent que la diminution de la sensibilité du système des bâtonnets qui a été rapportée chez les personnes atteintes du TAS durant la phase dépressive pourrait être associée à une augmentation de la neurotransmission dopaminergique centrale. Cependant, le phénotype de l'ERG observé chez les souris DAT-KO permet d'expliquer partiellement les anomalies de l'ERG qui ont été rapportées dans le TAS, ce qui favorise l'élaboration d'un modèle multifactoriel du TAS qui sera discuté à la toute fin de cette section.

## Implication des récepteurs dopaminergiques D1R et D2R sur l'ERG

En tenant compte que la dopamine semble impliquée dans l'étiologie des maladies psychiatriques et que plusieurs médicaments utilisés en psychiatrie agissent sur les récepteurs dopaminergiques D1R et D2R [62, 65], le but de cette expérimentation était d'étudier l'implication de ces récepteurs dans l'ERG. Pour ce faire, les souris D1R-KO et D2R-KO ont été utilisées afin de déterminer si les anomalies de l'ERG qui ont été rapportées dans les maladies psychiatriques peuvent être à l'origine d'une diminution de la biodisponibilité de ces récepteurs de la dopamine dans la rétine. L'hypothèse de départ était que les souris D1R-KO et D2R-KO présenteraient une diminution de l'amplitude de l'onde b des cônes et des bâtonnets puisqu'il a été démontré que des antagonistes de D1R [232, 233, 312] et D2R [233-235] provoquent ces phénotypes à l'ERG. Or, cette hypothèse a été confirmée partiellement et les résultats de cette étude sont discutés dans cette section.

Au moment où les expérimentations sur les souris D1R-KO étaient en cours, un article a été publié sur l'implication du récepteur D1R dans le système scotopique seulement [342]. En résumé, cette publication a démontré que les souris D1R-KO présentent une diminution de l'amplitude de l'onde b des bâtonnets, ce qui corrobore l'un des résultats présentés dans cette étude. D'ailleurs, les auteurs de cette publication ont relaté que la réponse scotopique des cellules bipolaires est favorisée par des courants chlore via les récepteurs GABA<sub>c</sub>, et ce, sous le contrôle des récepteurs dopaminergiques D1R. Or, aucune mesure sur le système des cônes n'a été présentée dans cette publication.

En plus de reproduire le résultat d'une diminution de l'amplitude de l'onde b des bâtonnets chez les souris D1R-KO [342], la présente étude démontre que le système des cônes est aussi affecté par l'absence du récepteur D1R. En effet, on rapporte la présence d'une diminution de l'amplitude de l'onde b et une augmentation de la latence de l'onde b des cônes chez les souris D1R-KO. D'ailleurs, ces résultats ont été reproduits récemment par une autre équipe et les auteurs de cette publication ont aussi démontré la présence d'une diminution de l'amplitude des potentiels oscillatoires (OPs) en condition photopique [343]. Or, dans la présente thèse, seule la contribution relative des OPs à l'amplitude de l'onde b est rapportée et aucun changement n'est constaté chez les

souris D1R-KO. Cependant, pour parvenir à ce résultat, l'amplitude des OPs a été mesurée et il a été démontré que celle-ci est diminuée en condition photopique et scotopique (résultats non montrés). Considérant que l'amplitude de l'onde b ainsi que celle des OPs sont toutes les deux réduites chez les souris D1R-KO, il va de soi que la contribution relative des OPs à l'amplitude de l'onde b demeure inchangée chez ces souris, ce qui va dans le sens des résultats publiés dernièrement [343]. Les données obtenues avec les souris D1R-KO corroborent aussi ce qui a été démontré dans certaines études pharmacologiques. En fait, chez l'humain, il a été rapporté que le blocage des récepteurs D1 provoque une diminution de l'amplitude de l'onde b et des OPs du système des bâtonnets [233]. De plus, chez le poisson rouge, il a été observé qu'un antagoniste du récepteur D1R, réduit l'amplitude de l'onde b des cônes [312], tandis que, chez le lapin, c'est plutôt l'amplitude de l'onde b des cônes et des bâtonnets qui a été diminuée par le blocage du récepteur D1R [232].

À la lumière de ces résultats, on peut conclure que la perte du récepteur D1R, à la fois dans le cerveau et dans la rétine, affecte plusieurs paramètres de l'ERG comme l'amplitude de l'onde b des cônes et des bâtonnets de même que la latence de l'onde b des cônes. D'ailleurs, pour faire un lien avec les anomalies de l'ERG observées chez les patients atteints de maladies psychiatriques, il a été démontré que certains de ces paramètres de l'ERG sont aussi changés durant la phase dépressive du TAS, comme une diminution de l'amplitude de l'onde b des cônes et une augmentation de la latence de l'onde b des cônes [128]. Cependant, en tenant compte que la souris D1R-KO est un modèle animal qui s'apparente moins au TAS, il est peu probable qu'une diminution de la biodisponibilité de D1R dans la rétine et dans le cerveau soit à l'origine des anomalies de l'ERG dans le TAS. Or, la diminution de l'amplitude de l'onde b des bâtonnets se rapproche plus de ce qui a été observé chez les enfants à haut risque de développer une maladie psychiatrique (HRs) [283]. En fait, la présente étude rapporte une diminution de l'amplitude de l'onde b des bâtonnets de 20 % chez les souris D1R-KO, tandis qu'il a été observé que ce paramètre est diminué de 23 % chez les HRs. D'ailleurs, une étude a démontré qu'un changement de la signalisation par le récepteur D1R dans le cortex préfrontal est associé à des déficits de la mémoire de travail chez les patients atteints de schizophrénie [344], et des altérations dans la mémoire épisodique verbale et visuelle ont aussi été observées chez les HRs [345]. Cela dit, un dysfonctionnement de la signalisation dopaminergique par D1R pourrait expliquer le déficit des bâtonnets observé chez les HRs plutôt que les anomalies rapportées chez les personnes atteintes du TAS. Cependant, cette hypothèse demeure incomplète

puisque aucune anomalie du système des cônes n'a été observée chez les HRs, contrairement à ce qui a été démontré chez les souris D1R-KO.

La souris D2R-KO représente le dernier modèle animal utilisé dans le cadre de cette étude dans le but d'étudier l'implication du récepteur dopaminergique D2R dans l'ERG. En fait, l'hypothèse émise au départ était que les souris D2R présenteraient une diminution de l'amplitude de l'onde b des systèmes des cônes et des bâtonnets puisqu'il a été rapporté que des agents pharmacologiques qui agissent comme antagonistes du récepteur D2R diminuent l'amplitude de l'onde b de ces systèmes [233-235]. Cependant, dans la présente étude, aucune différence n'est observée entre les souris D2R-KO et WT pour chacun des paramètres de l'ERG. Or, la seule différence de l'ERG rapportée chez ces souris se trouve au niveau de la contribution relative des OPs à l'amplitude de l'onde b des cônes, où cette contribution est plus élevée chez les souris D2R-KO. Malgré leur origine toujours nébuleuse, il a été suggéré que les OPs reflètent l'activité des cellules amacrines et bipolaires de la rétine [277]. Considérant le fait que les cellules amacrines sont les principales cellules dopaminergiques de la rétine, les résultats présentés ici suggèrent que leur activité pourrait être régulée en partie par le récepteur D2R. Toutefois, puisqu'aucun changement dans les OPs n'a été observé chez les patients atteints de maladies psychiatriques [282, 346], la biodisponibilité de D2R dans la rétine ne semble donc pas être à l'origine des anomalies de l'ERG retrouvées dans les autres troubles mentaux.

Contrairement aux résultats observés chez les souris Tph2-KI et DAT-KO qui présentent une dysfonction monoaminergique centrale, les observations rapportées chez les souris D1R-KO et D2R-KO sont le fruit d'une altération des récepteurs dopaminergiques à la fois dans la rétine et dans le cerveau. Or, d'après les résultats présentés dans cette étude, on observe que les anomalies de l'ERG qui ont été observées chez les personnes atteintes du TAS s'apparentent d'avantage à un reflet d'une dysfonction sérotoninergique centrale et/ou dopaminergique centrale qu'à une altération dans la biodisponibilité rétinienne des récepteurs dopaminergiques D1R et D2R. Cependant, les résultats présentés ici permettent de bien analyser l'impact isolé sur l'ERG de la perte de l'un de ces récepteurs et, ainsi, de mieux décrire leur implication dans la physiologie rétinienne contrairement à la plupart des études pharmacologiques qui utilisent une ou plusieurs drogues qui présentent une affinité pour ces deux récepteurs.

## Avantages et limites de cette étude

Au cours des dernières années, de nombreuses expérimentations pharmacologiques ont permis de mieux comprendre l'implication des monoamines dans la physiologie rétinienne. Cependant, la variété des espèces étudiées et des doses de médicaments utilisées ont souvent mené à des résultats contradictoires. L'avantage d'utiliser des modèles animaux pour ce type d'étude repose sur le fait que les observations reflètent les conséquences d'une dysfonction ciblée d'un gène d'intérêt et non pas de changements aigus causés par un agent pharmacologique. Aussi, considérant le fait que les drogues agissent rarement sur une seule molécule [304], les modèles animaux ont donc plus de chances de refléter l'impact direct qui découle des changements fonctionnels de la molécule d'intérêt. Également, les modèles animaux se rapprochent plus de ce qui est retrouvé chez les patients, c'est-à-dire qu'il se produit des changements compensatoires dans leur organisme pour s'adapter à l'altération de la fonction d'un gène [347].

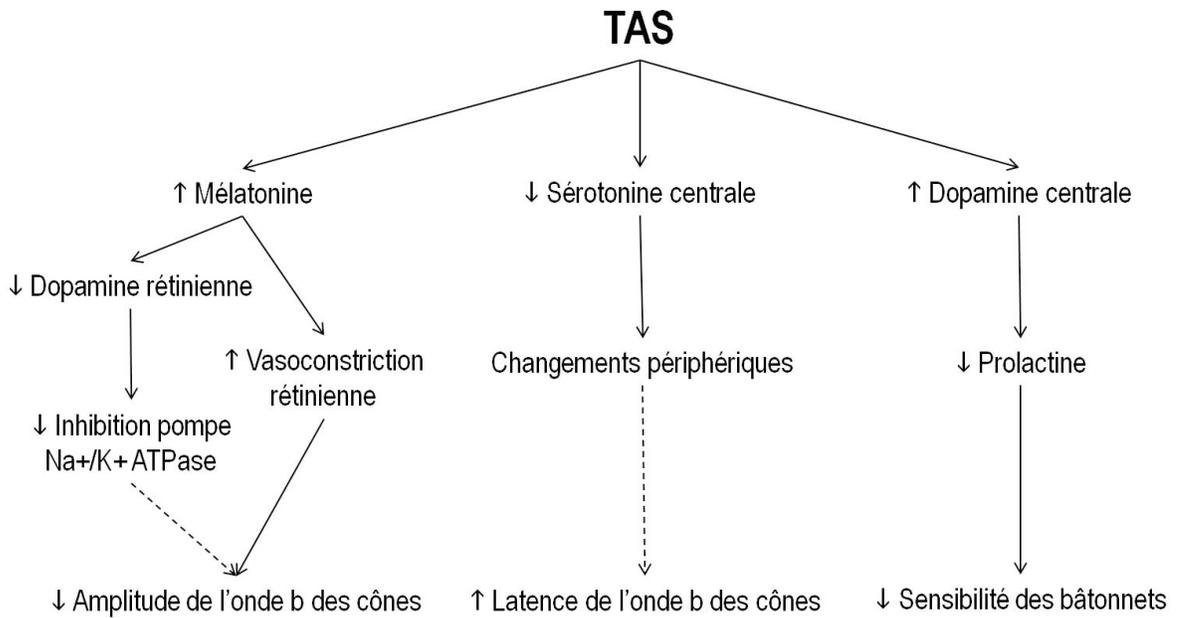
Cependant, il ne faut pas négliger le fait qu'il s'agit d'une étude translationnelle, c'est-à-dire que les résultats obtenus chez la souris sont extrapolés chez l'humain. Il importe aussi de spécifier que, contrairement aux humains, les souris sont des animaux nocturnes et que, pour cette espèce, la lumière est un signal négatif qui provoque de la peur et de l'anxiété [348]. Cela dit, il serait inapproprié de tester les hypothèses de luminothérapie sur les souris puisque l'ERG pourrait alors refléter un déséquilibre des neurotransmetteurs centraux causé par la peur et l'anxiété de l'animal. De plus, le système nerveux central humain est beaucoup plus complexe que celui de la souris et les mécanismes physiologiques pourraient différer d'une structure à l'autre ainsi que d'une espèce à l'autre. Or, bien que plusieurs aspects biologiques doivent être pris en compte dans les approches translationnelles, les modèles animaux restent indispensables à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les maladies psychiatriques.

Ces affirmations sont à considérer dans l'analyse des résultats de toutes les études présentées dans cette thèse. Somme toute, cette étude est la première à démontrer que l'ERG peut refléter une dysfonction sérotoninergique ou dopaminergique centrale, ce qui suggère que les anomalies de l'ERG qui ont été retrouvées dans le TAS pourraient être partiellement causées par des changements dans l'expression de ces monoamines dans le cerveau. De plus, cette étude renforce

l'hypothèse que les anomalies de l'ERG pourraient servir de biomarqueurs pour investiguer la neurotransmission du cerveau et ainsi devenir un outil de choix pour l'étude des maladies psychiatriques.

### **Le modèle multifactoriel du TAS**

Les anomalies de l'ERG qui ont été observées dans le TAS sont une diminution de la sensibilité des bâtonnets, une réduction de l'amplitude maximale de l'onde b des cônes et une augmentation de la latence de l'onde b des cônes. Or, ce qui est intéressant ici, c'est que ces anomalies de l'ERG ont toutes été reproduites dans les expérimentations présentés jusqu'ici dans cette thèse. En effet, cette thèse démontre que : i) l'ingestion de la mélatonine diminue l'amplitude de l'onde b des cônes chez le chien, ii) la diminution de la sérotonine centrale augmente la latence de l'onde b des cônes chez les souris Tph2-KI et iii) l'augmentation de la dopamine extracellulaire centrale diminue la sensibilité du système des bâtonnets chez les souris DAT-KO. En somme, ces observations suggèrent fortement que les anomalies de l'ERG qui ont été observées dans le TAS ont une origine multifactorielle qui impliquerait à la fois la mélatonine, la sérotonine centrale et la dopamine centrale telle que résumée dans la figure 6.1.



**Figure 6.1.** Résumé du modèle multifactoriel du TAS ainsi que des mécanismes potentiels qui pourraient être à l'origine des anomalies de l'ERG observées chez les personnes atteintes de ce trouble. Les flèches en pointillé représentent des hypothèses à vérifier.

### 6.1.3. Étude de l'implication de GSK3 sur l'ERG

Dernièrement, chez les HRs, un nouvel endophénotype a été observé et celui-ci consiste en une diminution du Vmax des bâtonnets, en plus de la présence de tendances pour une diminution de l'amplitude de l'onde a des cônes et une augmentation de la latence de l'onde b des bâtonnets [283]. Également, il a été démontré que les patients atteints de schizophrénie présentent aussi une diminution de l'amplitude de l'onde b des bâtonnets [281], en plus d'une diminution de l'amplitude de l'onde a des cônes et des bâtonnets [202]. Dans la troisième étude présentée dans cette thèse, l'objectif était de déterminer si ces anomalies de l'ERG peuvent être associées à l'expression d'un facteur de risque pour la schizophrénie et/ou le trouble bipolaire, c'est-à-dire l'expression de GSK3. Il faut garder en tête que plusieurs études ont démontré une suractivation de GSK3 chez les patients atteints de schizophrénie et du trouble bipolaire [17, 138, 141] et que certaines drogues utilisées en psychiatrie, dont le lithium, agissent directement sur cette protéine en l'inhibant [77]. Cela dit, l'hypothèse de départ était qu'une augmentation de l'expression de GSK3 chez la souris provoquerait les mêmes anomalies de l'ERG que celles qui ont été observées chez les patients atteints de

schizophrénie et cette hypothèse a été confirmée en partie. Cette section fait un résumé des résultats obtenus et présente des mécanismes physiologiques potentiels qui pourraient être à l'origine de ces observations et qui portent sur le métabolisme du glucose et de la vascularisation rétinienne.

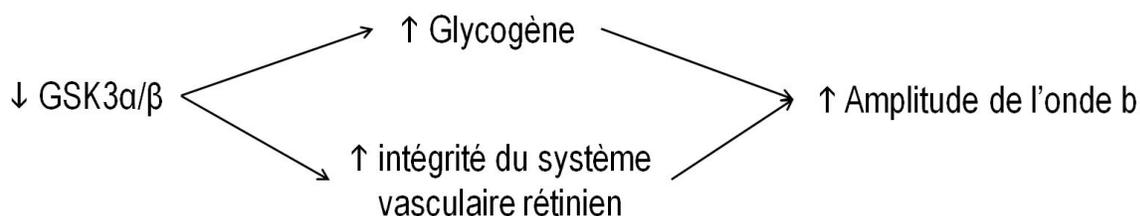
Cette étude est la première à démontrer une association entre l'expression des deux isozymes de GSK3 et l'amplitude de l'onde b de l'ERG, et ce, grâce à trois modèles animaux différents. Tout d'abord, il y a les souris prpGSK3 $\beta$  qui sont un modèle animal qui s'apparente aux maladies psychiatriques puisque ces souris surexpriment GSK3 $\beta$  dans les neurones de différentes structures cérébrales de même que dans la rétine (figure 4.2). Le principal résultat de cette étude démontre que les souris prpGSK3 $\beta$  présentent la même anomalie de l'ERG que celle qui a été rapportée chez les HRs, c'est-à-dire une diminution de l'amplitude de l'onde b des bâtonnets [283]. De plus, les mêmes tendances que celles qui ont été observées chez les HRs sont retrouvées chez les souris prpGSK3 $\beta$ , c'est-à-dire une diminution de l'amplitude de l'onde a des cônes et une augmentation de la latence de l'onde b des bâtonnets [283]. Ces observations permettent de suggérer qu'il pourrait y avoir une surexpression de GSK3 $\beta$  chez les HRs avant même que la maladie se développe. Le fait que les souris GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> (qui ont une diminution de l'expression de GSK3 $\beta$  et qui s'avèrent ainsi un modèle animal contraire aux souris prpGSK3 $\beta$ ) présentent une augmentation de l'amplitude de l'onde b des bâtonnets (figure 4.5) confirme une association entre ce paramètre de l'ERG et l'expression de GSK3 $\beta$ .

La présente étude rapporte aussi une implication de GSK3 $\alpha$  dans la modulation de l'amplitude de l'onde b des cônes et des bâtonnets, telle qu'observée avec les souris GSK3 $\alpha$ -KO. Or, cela démontre que cet isozyme de GSK3 est le seul qui peut influencer l'amplitude de l'onde a des cônes (figure 4.7). Ce résultat est très intéressant puisqu'une tendance pour une diminution de l'amplitude de l'onde a des cônes a été rapportée chez les HRs [283] et des études sur l'ERG dans la schizophrénie ont aussi démontré la présence d'une réduction de ce paramètre chez les patients [202, 281]. Considérant qu'une surexpression de GSK3 $\alpha$  a été observée dans les lymphocytes périphériques de patients atteints de schizophrénie [141], on peut suggérer que cet isozyme serait impliqué dans la diminution de l'amplitude de l'onde a des cônes chez ces patients.

Cette étude sur les fonctions rétiniennes des souris qui présentent un dysfonctionnement de l'un ou l'autre des isozymes de GSK3 révèle que cette protéine est impliquée dans la modulation de certains paramètres de l'ERG. Cependant, les mécanismes physiologiques sous-jacents aux présentes observations demeurent spéculatifs et très peu d'études ont investigué le rôle et la localisation de GSK3 dans la rétine. L'une des hypothèses plausibles passerait par le glycogène qui représente une ressource énergétique pour les cellules [349]. En effet, il a été démontré que GSK3 inhibe la glycogène synthase (GS) qui est une enzyme de synthèse qui convertit le glucose en glycogène. Cela dit, une inhibition de GSK3 provoque une stimulation de la synthèse du glycogène, donc une augmentation de la réserve d'énergie des cellules. En ce qui concerne l'ERG, aucune étude n'a démontré, à ce jour, une association entre le niveau de glycogène dans la rétine et l'amplitude des ondes de l'ERG, mais une expérimentation sur le chat a rapporté que l'amplitude de l'onde b est augmentée lorsque le niveau de glucose plasmatique est élevé [350]. Il a d'ailleurs été démontré dernièrement que GSK3 et GS sont exprimées dans les cellules de Müller ainsi que dans les couches plexiformes interne et externe de la rétine chez le rat [351]. À la lumière de ces résultats et considérant que les cellules de Müller contribuent à l'amplitude de l'onde b de l'ERG, on peut suggérer qu'une augmentation de la synthèse du glycogène causée par l'inhibition de GSK3 dans les cellules de la rétine pourrait être associée à l'augmentation de l'amplitude de l'onde b de l'ERG observée chez les souris GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> et GSK3 $\alpha$ -KO. La situation contraire pourrait aussi s'appliquer aux souris prpGSK3 $\beta$  où une surexpression de GSK3 $\beta$  dans les neurones de la rétine provoquerait une réduction de la synthèse du glycogène et mènerait conséquemment à une diminution de l'amplitude de l'onde b. Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de mesurer la concentration de glycogène rétinien des modèles animaux ici présentés pour vérifier si celle-ci est changée par les altérations d'expression de GSK3.

D'ailleurs, en ce qui concerne le métabolisme du glucose, on peut faire un lien direct avec le diabète. En fait, des études ont démontré que l'incidence du diabète de type 2 est d'environ trois fois plus élevée chez les patients atteints de schizophrénie en comparaison avec la population en général [352, 353]. Tel que cité précédemment, une surexpression de GSK3 a été observée chez les patients atteints de schizophrénie [17, 138, 141] et il a été rapporté que l'expression des isozymes de GSK3 est aussi élevée chez les personnes diabétiques [354]. D'ailleurs, il a été démontré que GSK3 interfère avec la signalisation de l'insuline en supprimant l'action du substrat 1 du récepteur de

l'insuline, ce qui supporte l'implication de GSK3 dans le diabète [354]. Dans un même ordre d'idées, il est connu que les personnes atteintes du diabète risquent de développer une rétinopathie diabétique. Cette atteinte rétinienne se caractérise, entre autres, par une augmentation de la néovascularisation, une perméabilisation des vaisseaux sanguins et une ischémie [355]. Il a aussi été démontré que les personnes atteintes de schizophrénie présentent des anomalies de la microvascularisation rétinienne, dont des veinules plus larges qui reflètent une réduction de l'alimentation en oxygène dans la rétine [356]. Par ailleurs, il semble y avoir une association entre l'expression de GSK3 et l'intégrité du système vasculaire rétinien puisqu'une étude a rapporté que, dans un modèle de rétinopathie ischémique, l'inhibition de GSK3 $\beta$  restaure considérablement l'intégrité du réseau vasculaire de la rétine en plus de réduire grandement l'hypoxie [357]. De plus, tel que cité précédemment, il a été observé que l'amplitude de l'onde b des cônes et des bâtonnets est diminuée dans un modèle ischémique suite à une occlusion de la veine rétinienne centrale [325]. Cela dit, il est possible de suggérer que l'inhibition de GSK3 $\beta$  améliorerait l'intégrité du réseau vasculaire de la rétine, ce qui pourrait provoquer une augmentation de l'amplitude de l'onde b, tel qu'observé chez les souris GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup>. La figure 6.2 fait un résumé des mécanismes physiologiques qui ont été spéculés pour expliquer l'association entre l'expression de GSK3 et l'amplitude de l'onde b de l'ERG.



**Figure 6.2.** Résumé des mécanismes physiologiques qui pourraient être à l'origine de l'augmentation de l'amplitude de l'onde b observée chez les souris GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> et GSK3 $\alpha$ -KO. En ce qui concerne l'hypothèse du glycogène, le modèle contraire peut s'appliquer aux souris prpGSK3 $\beta$  chez qui une augmentation de GSK3 $\beta$  neuronale provoque une diminution de l'amplitude de l'onde b de l'ERG des bâtonnets.

Afin de vérifier ces hypothèses chez l'animal, certaines expérimentations pourraient être effectuées. Tout d'abord, pour valider si les anomalies de l'ERG observées chez les modèles animaux utilisés dans la présente étude étaient associées à un changement anatomique causé par leur mutation génétique, il serait intéressant d'analyser le nombre de neurones rétiens ainsi que l'intégrité du réseau vasculaire de la rétine de ces souris. De plus, il serait profitable d'effectuer une

étude avec des inhibiteurs de GSK3, comme le lithium, afin de valider si l'inhibition pharmacologique de cette protéine provoque des anomalies de l'ERG semblables à ce qui est observé chez les souris GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> et GSK3 $\alpha$ -KO. En plus des expérimentations chez l'animal, l'élaboration d'une étude corrélatrice entre l'expression des isozymes de GSK3 et l'amplitude de l'onde b de l'ERG chez l'humain pourrait devenir un complément inestimable pour confirmer les résultats rapportés dans la présente étude. En effet, il serait intéressant d'étudier une cohorte de patients atteints de schizophrénie, d'enfants à haut risque de développer une maladie psychiatrique et des sujets contrôles, et de mesurer à la fois leur ERG et l'expression des isozymes de GSK3 ainsi que d'autres molécules qui y sont reliées comme Akt1, la forme phosphorylée de GSK3, le glucose ainsi que le glycogène, et ce, dans le but de corréler l'expression de ces molécules avec les changements dans les paramètres de l'ERG.

Somme toute, les résultats de la présente étude démontrent que certains paramètres de l'ERG, dont l'amplitude de l'onde b des bâtonnets, sont associés à l'expression de l'un ou l'autre des isozymes de GSK3 chez la souris. À la lumière des données rapportées dans les études précédentes de cette thèse, il semble que la dopamine centrale, la sérotonine centrale, la mélatonine et GSK3, bien qu'elles soient toutes reliées directement ou indirectement, modulent les paramètres de l'ERG différemment. Par exemple, la voie de signalisation Akt/GSK3 passe par le récepteur dopaminergique D2R et aucun changement de l'ERG n'est décelé chez les souris D2R-KO. Or, une altération de l'expression de GSK3, qui se trouve en aval de D2R dans la cascade de signalisation, peut influencer l'amplitude de l'onde b des cônes ou des bâtonnets de l'ERG. De plus, chez les souris Tph2-KI, il a été démontré que la diminution de l'expression de sérotonine centrale est accompagnée d'une augmentation de l'expression de GSK3 $\beta$  [48]. Cependant, aucune anomalie de l'ERG n'est commune aux souris Tph2-KI et aux souris prpGSK3 $\beta$ , suggérant ainsi que les changements des paramètres de l'ERG observés chez ces modèles animaux seraient indépendants et qu'ils résulteraient respectivement d'une dysfonction dans la sérotonine centrale et dans GSK3 $\beta$  neuronale.

En résumé, la présente étude rapporte que l'expression de GSK3 peut moduler certains paramètres de l'ERG. Le résultat principal de cette expérimentation démontre que les souris prpGSK3 $\beta$  (qui ont une surexpression de GSK3 $\beta$  neuronale) présentent le même phénotype à l'ERG que ce qui a été rapporté chez les HRs, c'est-à-dire une diminution de l'amplitude de l'onde b des

bâtonnets. Cette observation renforce l'hypothèse que GSK3 $\beta$  est un facteur de risque pour la schizophrénie et le trouble bipolaire, et que cette molécule pourrait être surexprimée avant même le début de la maladie et, ainsi, être à l'origine du déficit du système des bâtonnets qui a été observé chez les HRs. À la lumière de ce résultat, on peut conclure que l'ERG est un outil permettant de révéler la présence d'un facteur de risque, comme une surexpression de GSK3, et pourrait alors devenir un biomarqueur servant à prédire un pronostic pour la schizophrénie et le trouble bipolaire.

#### **6.1.4. Étude de l'implication de GSK3 dans l'horloge biologique**

La voie dite « non visuelle » de la rétine permet de réguler l'horloge biologique, et des études ont démontré la présence de dysfonctions circadiennes chez les patients atteints de maladies psychiatriques [188, 189]. De plus, il a été rapporté que le stabilisateur d'humeur lithium qui est couramment utilisé en psychiatrie module les rythmes circadiens [191-194]. De ce fait, l'inhibition directe qu'il exerce sur GSK3 [77] a été suggérée comme mécanisme pour expliquer son effet sur l'horloge biologique. La dernière étude présentée dans cette thèse avait pour objectif d'investiguer si l'inhibition génétique de GSK3 $\beta$  reproduisait le phénotype circadien qui a été observé suite à la prise de lithium chez les rongeurs, c'est-à-dire une augmentation de la période locomotrice circadienne. Pour ce faire, l'activité locomotrice circadienne des souris haploinsuffisantes pour GSK3 $\beta$  (GSK3 $\beta^{+/-}$ ) a été étudiée puisque leur mutation génétique reproduit l'effet direct du lithium, soit une diminution de l'expression de GSK3 $\beta$ . Cette section présente un résumé des résultats en plus de discuter des limitations de l'étude et de proposer un mécanisme biologique potentiellement à l'origine du phénotype circadien observé chez les souris GSK3 $\beta^{+/-}$ .

Le principal résultat obtenu dans cette étude confirme l'hypothèse de départ et révèle qu'une diminution de l'expression de GSK3 $\beta$ , telle qu'observée chez les souris GSK3 $\beta^{+/-}$ , provoque un rallongement de la période d'activité locomotrice circadienne. Ce résultat va dans le sens des autres études qui ont rapporté que la période locomotrice circadienne est plus longue suite à l'inhibition pharmacologique de GSK3 $\beta$  par le lithium chez les rongeurs [191-193] ou à l'inhibition génétique de sa protéine équivalente SHAGGY chez la drosophile [358]. De plus, aucun changement dans le niveau d'activité locomotrice chez les souris GSK3 $\beta^{+/-}$  n'est observé.

La mesure de l'activité locomotrice circadienne chez les rongeurs n'est pas toujours facile. En fait, au cours de la majorité des expériences, certains problèmes récurrents sont rencontrés. D'une part, ce ne sont pas toutes les souris qui apprennent correctement comment se servir de la roue et qui aiment l'utiliser. Les résultats de la période d'habituation, qui représente la première semaine d'enregistrement, révèlent souvent des problèmes d'utilisation de la roue de la part de certaines souris et les données qui en découlent ne peuvent pas être comptabilisées pour l'analyse puisqu'elles représentent un biais dans l'étude. D'autre part, plus les sessions d'enregistrement sont longues, plus les cages deviennent sales et le risque que les roues se bloquent augmente. Dans des expériences précédentes, les cages avaient été nettoyées après quelques semaines d'enregistrement et cela avait provoqué des artéfacts d'activité locomotrice puisque les souris avaient été dérangées durant la journée, soit durant leur période de repos. Cela dit, il a donc été décidé de ne plus nettoyer les cages en milieu d'expérience, mais plutôt de vérifier quotidiennement si les roues se bloquaient et de les débloquent si c'était le cas. Somme toute, ces inconvénients font en sorte que seulement une partie des résultats obtenus peut être utilisée pour l'analyse. Dans le cas de la présente étude, malgré le petit nombre de souris utilisées ( $n = 5$ ), un phénotype circadien significatif est tout de même rapporté. Cependant, on observe une grande variabilité des mesures du niveau d'activité locomotrice et il est probable que des différences significatives auraient pu être décelées si un plus grand nombre de souris avait été étudié, même si une étude précédente a révélé un niveau d'activité locomotrice semblable entre les souris  $GSK3\beta^{+/-}$  et WT [74].

La présente étude est exclusivement comportementale et aucune mesure biochimique n'a été effectuée pour analyser l'expression des composantes de l'horloge biologique chez les souris  $GSK3\beta^{+/-}$ . Cependant, il est possible de spéculer sur les mécanismes à l'origine de ce phénotype circadien grâce aux études précédemment effectuées *in vitro* et *in vivo*. En fait, il a été démontré que  $GSK3\beta$  phosphoryle directement la protéine PER2 afin que celle-ci entre dans le noyau cellulaire. Cela dit, une diminution de l'expression de  $GSK3\beta$  retarderait le transfert nucléaire de PER2 et causerait ainsi un délai de phase [359]. De plus, une étude a rapporté que suite à un traitement au lithium *in vitro*, il se produit une dégradation rapide de Rev-erba et une activation du gène Bmal1, ce qui suggère que Rev-erba serait une cible moléculaire du lithium et de  $GSK3\beta$  [360]. Enfin, il a été démontré que la protéine BMAL1 est aussi une cible moléculaire de  $GSK3\beta$  [361]. Bref, afin de mieux comprendre le rôle de  $GSK3\beta$  dans la physiologie circadienne, il serait intéressant d'étudier

l'expression des composantes de l'horloge biologique à différents temps circadiens chez les souris  $GSK3\beta^{+/-}$  afin de dresser un portrait des cibles moléculaires de cette protéine et de leurs patrons d'expression. Aussi, pour compléter les résultats de la présente étude, il serait profitable d'étudier la période circadienne intrinsèque des souris  $prpGSK3\beta$  pour valider si une surexpression génétique de  $GSK3\beta$  provoque l'effet contraire de ce qui est observé chez les souris  $GSK3\beta^{+/-}$ , c'est-à-dire un raccourcissement de la période locomotrice circadienne intrinsèque.

Tel que rapporté dans l'étude précédente, les souris  $GSK3\beta^{+/-}$  ont aussi des anomalies de l'ERG, comme une augmentation de l'amplitude de l'onde b des cônes et des bâtonnets ainsi qu'une augmentation de la latence de l'onde b des bâtonnets. Or, en tenant compte que les paramètres de l'ERG présentent un rythme circadien chez plusieurs espèces, il est possible de suspecter que les anomalies de l'ERG observées chez les souris  $GSK3\beta^{+/-}$  pourraient aussi avoir une composante circadienne étant donné que leur période intrinsèque est plus longue que les souris WT. Cependant, afin de minimiser cette probabilité, les ERGs ont tous été mesurés entre 9 h et 16 h sous des conditions lumineuses uniformes et aucune différence dans les paramètres de l'ERG n'a été observée entre les souris de même génotype, et ce, peu importe le moment de l'enregistrement. Malgré tout, il serait intéressant de dresser le portrait des variations circadiennes de l'ERG des souris  $GSK3\beta^{+/-}$  (et  $prpGSK3\beta$ ) en mesurant les fonctions rétinienne à divers moments de la journée dans le but de valider la présence ou non d'une variation circadienne des paramètres de l'ERG.

En conclusion, les résultats de la présente étude démontrent que  $GSK3\beta$  est une composante importante de l'horloge biologique intrinsèque et, puisque cette protéine est une cible moléculaire du lithium, elle semble être impliquée dans le phénotype circadien qui a été observé chez les rongeurs suite à un traitement avec ce stabilisateur d'humeur. De plus, sachant que des désordres circadiens ont été décrits chez des patients atteints de maladies psychiatriques, dont le trouble bipolaire, et que  $GSK3\beta$  est impliquée dans ce trouble, cette protéine pourrait devenir une cible moléculaire de prédilection pour contrer les dysfonctions circadiennes retrouvées chez les patients atteints de cette maladie.

## 6.2. Applications et voies futures

Bien que plusieurs anomalies des fonctions rétinienne aient été décrites chez des patients ou des enfants à risque de maladies psychiatriques depuis plusieurs années, aucune étude n'avait investigué les origines potentielles de ces anomalies. Cette thèse est d'ailleurs la première à décrire des mécanismes qui pourraient expliquer la présence de ces anomalies de l'ERG, ce qui représente une contribution scientifique hautement importante pour l'utilisation éventuelle de l'ERG comme outil pour investiguer les maladies psychiatriques. Les observations rapportées dans cette thèse représentent des connaissances novatrices qui peuvent s'appliquer à plusieurs domaines, dont la chronobiologie, l'ophtalmologie et la psychiatrie.

### 6.2.1. La mélatonine exogène comme régulateur de l'horloge biologique

Dans plusieurs pays, la mélatonine est en vente libre dans les pharmacies à des doses variant de 0,03 à 85 mg [42]. Bien que certaines propriétés antioxydantes lui aient été conférées [362], la mélatonine est particulièrement utilisée pour traiter l'insomnie et contrer le décalage horaire. Étant reconnue comme *l'hormone du sommeil*, l'une des pratiques courantes pour ajuster l'horloge biologique suite à un décalage horaire est de s'exposer à une forte lumière le matin et d'ingérer de la mélatonine le soir pour favoriser le sommeil. Or, les résultats présentés dans cette thèse révèlent qu'une forte dose de mélatonine exogène exerce un impact négatif considérable sur les fonctions du système des cônes de même qu'une légère diminution des fonctions du système des bâtonnets. Toutefois, plusieurs aspects sur cette hormone demeurent inconnus, dont : i) la durée de l'effet de la mélatonine sur le système rétinien, ii) la présence ou non d'un effet toxique de la mélatonine sur la rétine et iii) les effets à long terme de la prise de mélatonine exogène sur la rétine.

À la lumière des résultats présentés ici, l'utilisation de la mélatonine exogène doit se faire avec la plus petite dose disponible sur le marché, et ce, dans des conditions de nécessité seulement. Après tout, la mélatonine est déjà naturellement sécrétée dans le corps et l'utilisation d'une forte dose représente un changement physiologique drastique pour l'organisme. Bien que plusieurs études lui aient conféré de nombreux aspects positifs [363, 364], les résultats présentés dans cette thèse ne sont pas les premiers à démontrer un impact négatif de la mélatonine exogène sur le système

rétinien [315]. Étant donné l'absence de supervision quant à la prise de cette hormone et l'augmentation du phénomène d'automédication dans la société, il importe de sensibiliser la population que la prise des composés pharmacologiques en vente libre peut aussi avoir des effets négatifs et que certaines précautions doivent être prises. Cela dit, puisque les effets périphériques de la mélatonine exogène sur l'organisme demeurent encore mal connus, il importe que la mélatonine soit utilisée dans des situations où cela est vraiment nécessaire, et ce, à une dose optimale.

## **6.2.2. Les anomalies de l'ERG comme biomarqueurs des maladies psychiatriques**

Les résultats présentés dans la deuxième étude de cette thèse sont les premiers à démontrer que l'ERG peut refléter les désordres de la neurotransmission centrale retrouvés dans les maladies psychiatriques. Cette découverte est d'une grande importance puisqu'il s'agit de la première démonstration que l'ERG permet d'étudier indirectement les variations de la neurochimie centrale, plus particulièrement de la sérotonine et de la dopamine. Quant à la troisième étude présentée dans cette thèse, elle relate la première association entre l'expression d'un facteur de risque pour les maladies psychiatriques, soit l'expression de GSK3, et la modulation de certains paramètres de l'ERG. Tous ensemble, ces résultats supportent le fait que les anomalies de l'ERG peuvent être utilisées comme signatures biologiques des maladies psychiatriques.

Cette thèse est un premier pas dans la compréhension de l'origine des anomalies de l'ERG qui ont été observées chez les patients atteints de maladies psychiatriques. Les résultats présentés permettent de suggérer l'implication de la mélatonine, de la dopamine centrale et de la sérotonine centrale dans les anomalies de l'ERG qui ont été observées dans le TAS, ce qui supporte les hypothèses antérieures sur ce trouble. Aussi, l'observation qu'une augmentation de l'expression de GSK3 $\beta$  chez la souris provoque la même anomalie de l'ERG que celle qui a été observée chez les HRs renforce l'hypothèse que cette protéine serait un facteur de risque pour les maladies psychiatriques et qu'elle serait impliquée dans la modulation de l'ERG. Par ailleurs, de plus amples expérimentations sur la caractérisation de l'ERG sur des modèles animaux de maladies psychiatriques différents pourraient sans doute faire la lumière sur d'autres origines potentielles des anomalies de l'ERG qui ont été observées chez les patients atteints de troubles mentaux. Enfin, dans le but de valider les observations sur les animaux présentées dans cette thèse, il serait bénéfique de

corrélér l'expression de la dopamine centrale, de la sérotonine centrale, de la mélatonine et de GSK3 avec les changements de l'ERG qui ont été observés chez les patients atteints du TAS, de la schizophrénie ou d'autres troubles psychiatriques.

La recherche de nouveaux biomarqueurs en psychiatrie s'avère une priorité dans ce domaine pour aider à établir un pronostic, faciliter et compléter le diagnostic et, finalement, mieux orienter le choix de la thérapie. À la lumière des résultats présentés ici et de la littérature scientifique, on peut suggérer que les anomalies de l'ERG pourraient être utilisées comme biomarqueurs des maladies psychiatriques puisqu'elles permettent soit i) de prédire un pronostic grâce à la diminution de l'amplitude de l'onde b des bâtonnets chez les HRs et ii) de compléter le diagnostic, car il est possible de distinguer les personnes atteintes des personnes saines selon des changements dans certains paramètres de l'ERG. Toutefois, tel que cité précédemment, de plus amples études avec un plus grand nombre de sujets et utilisant des protocoles standardisés sont de mise pour mieux caractériser et valider les anomalies de l'ERG qui ont été rapportées chez les patients atteints de maladies psychiatriques. Finalement, afin d'optimiser son utilisation dans un contexte psychiatrique, les anomalies de l'ERG pourraient être utilisées en complément à d'autres biomarqueurs, comme des signatures génétiques ou protéomiques, mais des études supplémentaires sont nécessaires pour corrélér et associer ces biomarqueurs avec les troubles psychiatriques. Somme toute, d'après les présentes observations, l'ERG peut servir d'outil pour investiguer les changements de la neurotransmission monoaminergique centrale ainsi que d'un indicateur de l'expression de GSK3 neuronale.

### **6.2.3. GSK3 $\beta$ comme cible thérapeutique des troubles de l'horloge biologique**

De nombreuses perturbations des rythmes circadiens comprenant, entre autres, des troubles du sommeil, des altérations de la sécrétion de certaines hormones et de la température corporelle ont été décrites chez les patients atteints de maladies psychiatriques, dont le trouble bipolaire et la schizophrénie [365]. De plus, il a été démontré qu'un traitement des symptômes dépressifs par la privation de sommeil donne des résultats intéressants lorsqu'il est combiné à une prise d'antidépresseurs ou de stabilisateurs d'humeur ainsi qu'à de la luminothérapie [190]. Cela dit, des

études ont suggéré que les protéines impliquées dans la régulation de l'horloge biologique interne joueraient un rôle dans certaines maladies psychiatriques [188, 189].

Le meilleur exemple à donner est celui de GSK3 $\beta$ . Son implication dans la pathophysiologie des maladies psychiatriques, particulièrement du trouble bipolaire et de la schizophrénie, a été démontrée à maintes reprises et de nombreux résultats, dont ceux présentés dans le quatrième article de cette thèse, supportent un rôle de cette protéine dans la régulation des rythmes circadiens. L'implication de GSK3 $\beta$  a aussi été suggérée dans le sommeil puisqu'il a été rapporté que le lithium peut provoquer des changements dans les phases du sommeil, c'est-à-dire une diminution de la durée du sommeil paradoxal et une augmentation de la durée du sommeil à ondes lentes [366]. Or, plus d'études sont nécessaires pour vérifier si ces changements dans les phases du sommeil engendrent des désordres de la consolidation de la mémoire chez les patients, comme ce qui a été observé chez le rat suite à la prise de lithium [367]. De plus, chez les patients dépressifs, il a été démontré que la prise de lithium combinée à une privation de sommeil débutant tôt dans la journée (éveil de 2 h à 22 h) provoque une réponse antidépressive qui dure jusqu'à 30 jours [368]. Cela dit, on peut suggérer que l'inhibition de GSK3 $\beta$  par le lithium pourrait avoir rallongé la période circadienne des patients et ainsi avoir contribué à un effet accru du traitement par la privation de sommeil.

Il va de soi qu'une hygiène de sommeil est indispensable à une bonne qualité de vie, particulièrement pour contrer les troubles de l'humeur. D'après les résultats présentés dans cette thèse, qui supportent les observations précédentes sur l'implication de GSK3 $\beta$  dans l'horloge biologique, on peut suggérer que cette protéine pourrait devenir une cible thérapeutique pharmacologique de premier choix pour le développement de nouveaux médicaments servant à contrer les perturbations circadiennes.

## CONCLUSION

Les données présentées dans cette thèse permettent de faire une association entre l'expression de certaines molécules impliquées dans les troubles psychiatriques et la présence d'anomalies des fonctions rétiniennes et de la régulation des rythmes circadiens chez les personnes atteintes ou à risque de ces maladies. En plus de contribuer à l'avancement des connaissances scientifiques dans plusieurs domaines, cette thèse permet de renforcer plusieurs hypothèses émises auparavant. Par exemple, le fait que la mélatonine module négativement les fonctions du système des cônes supporte l'hypothèse qu'un déséquilibre de la sécrétion de la mélatonine serait partiellement à l'origine des anomalies de l'ERG qui ont été observées dans le TAS. De plus, la caractérisation des fonctions rétiniennes chez les souris Tph2-KI et DAT-KO relate la première démonstration que l'ERG peut refléter les dysfonctions de la neurotransmission monoaminergique centrale qui ont été suggérées dans le TAS. Ceci étant dit, la mesure des fonctions rétiniennes par l'ERG s'avère un miroir de la neurochimie du cerveau. Également, le fait que la même anomalie de l'ERG ait été retrouvée à la fois chez les enfants à haut risque génétique de développer la schizophrénie ou la maladie bipolaire et chez les souris prpGSK3 $\beta$  (qui ont une surexpression de GSK3 $\beta$  neuronale) renforce l'hypothèse que GSK3 est un facteur de risque pour les maladies psychiatriques, en plus d'être impliquée dans la modulation des fonctions rétiniennes. Enfin, les observations sur la période circadienne allongée des souris GSK3 $\beta$ <sup>+/-</sup> confirment un rôle de GSK3 $\beta$  dans la régulation de l'horloge biologique interne et suggère son implication dans les effets circadiens du lithium.

En somme, la présence d'une association entre certaines molécules impliquées dans les troubles psychiatriques et la modulation des paramètres de l'ERG suggère que les anomalies de l'ERG pourraient éventuellement servir de biomarqueurs pour ces maladies. Puisqu'il s'agit d'une technique non invasive, peu coûteuse et de courte durée, l'ERG pourrait permettre d'investiguer plus en profondeur les origines moléculaires ou neurodéveloppementales qui caractérisent les maladies psychiatriques. Lorsque les mécanismes sous-jacents aux anomalies des fonctions rétiniennes qui ont été observées chez les patients atteints de maladies psychiatriques seront mieux compris, l'ERG pourrait servir d'outil complémentaire au pronostic et au diagnostic des maladies du cerveau.



## BIBLIOGRAPHIE

1. Parent, A., *Histoire du Cerveau - De l'Antiquité aux neurosciences*. 2009, Québec: Les Presses de l'Université Laval.
2. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Fifth Edition (DSM-5)*. 2013: American Psychiatric Association.
3. Santé Canada - Santé mentale, maladie mentale <http://www.hc-sc.gc.ca/hl-vs/iyh-vsv/diseases-maladies/mental-fra.php>. 2006.
4. Agid, Y., et al., *How can drug discovery for psychiatric disorders be improved?* Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(3): p. 189-201.
5. Singh, I. and N. Rose, *Biomarkers in psychiatry*. Nature, 2009. **460**(7252): p. 202-7.
6. Clement, S., et al., *Mass media interventions for reducing mental health-related stigma*. Cochrane Database Syst Rev, 2013. **7**: p. CD009453.
7. Martins-de-Souza, D., *Biomarkers for psychiatric disorders: where are we standing?* Dis Markers, 2013. **35**(1): p. 1-2.
8. Schmitt, A., et al., *The impact of environmental factors in severe psychiatric disorders*. Front Neurosci, 2014. **8**: p. 19.
9. Leeman, R.F. and M.N. Potenza, *A targeted review of the neurobiology and genetics of behavioural addictions: an emerging area of research*. Can J Psychiatry, 2013. **58**(5): p. 260-73.
10. Sawa, A. and S.H. Snyder, *Schizophrenia: neural mechanisms for novel therapies*. Mol Med, 2003. **9**(1-2): p. 3-9.
11. Beaulieu, J.M., *A role for Akt and glycogen synthase kinase-3 as integrators of dopamine and serotonin neurotransmission in mental health*. J Psychiatry Neurosci, 2012. **37**(1): p. 7-16.
12. Henry, N.L. and D.F. Hayes, *Cancer biomarkers*. Mol Oncol, 2012. **6**(2): p. 140-6.
13. *Biomarkers for Psychiatric Disorders*. 2008, Springer.
14. Bahn, S., et al., *Challenges of introducing new biomarker products for neuropsychiatric disorders into the market*. Int Rev Neurobiol, 2011. **101**: p. 299-327.
15. Filiou, M.D. and C.W. Turck, *General overview: biomarkers in neuroscience research*. Int Rev Neurobiol, 2011. **101**: p. 1-17.
16. Benson, P.J., et al., *Simple viewing tests can detect eye movement abnormalities that distinguish schizophrenia cases from controls with exceptional accuracy*. Biol Psychiatry, 2012. **72**(9): p. 716-24.
17. Emamian, E.S., et al., *Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3beta signaling in schizophrenia*. Nat Genet, 2004. **36**(2): p. 131-7.
18. Bunney, W.E., et al., *Microarray technology: a review of new strategies to discover candidate vulnerability genes in psychiatric disorders*. Am J Psychiatry, 2003. **160**(4): p. 657-66.
19. Pich, E.M., G. Vargas, and E. Domenici, *Biomarkers for antipsychotic therapies*. Handb Exp Pharmacol, 2012(212): p. 339-60.
20. Patel, S., *Role of proteomics in biomarker discovery and psychiatric disorders: current status, potentials, limitations and future challenges*. Expert Rev Proteomics, 2012. **9**(3): p. 249-65.
21. Pryce, C.R. and E. Seifritz, *A translational research framework for enhanced validity of mouse models of psychopathological states in depression*. Psychoneuroendocrinology, 2011. **36**(3): p. 308-29.

22. Mirnics, K., et al., *Molecular characterization of schizophrenia viewed by microarray analysis of gene expression in prefrontal cortex*. *Neuron*, 2000. **28**(1): p. 53-67.
23. De Smaele, E., E. Ferretti, and A. Gulino, *MicroRNAs as biomarkers for CNS cancer and other disorders*. *Brain Res*, 2010. **1338**: p. 100-11.
24. Martins-de-Souza, D., et al., *Proteomic approaches to unravel the complexity of schizophrenia*. *Expert Rev Proteomics*, 2012. **9**(1): p. 97-108.
25. Ma, D., P.C. Guest, and S. Bahn, *Metabonomic studies of schizophrenia and psychotropic medications: focus on alterations in CNS energy homeostasis*. *Bioanalysis*, 2009. **1**(9): p. 1615-26.
26. Anticevic, A., et al., *Connectivity, Pharmacology, and Computation: Toward a Mechanistic Understanding of Neural System Dysfunction in Schizophrenia*. *Front Psychiatry*, 2013. **4**: p. 169.
27. Atluri, G., et al., *Complex biomarker discovery in neuroimaging data: Finding a needle in a haystack*. *Neuroimage Clin*, 2013. **3**: p. 123-131.
28. Meyer-Lindenberg, A., et al., *Genetic evidence implicating DARPP-32 in human frontostriatal structure, function, and cognition*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(3): p. 672-82.
29. Yener, G.G. and E. Basar, *Brain oscillations as biomarkers in neuropsychiatric disorders: following an interactive panel discussion and synopsis*. *Suppl Clin Neurophysiol*, 2013. **62**: p. 343-63.
30. Farzan, F., et al., *Evidence for gamma inhibition deficits in the dorsolateral prefrontal cortex of patients with schizophrenia*. *Brain*, 2010. **133**(Pt 5): p. 1505-14.
31. Kim, D.J., et al., *Disturbed resting state EEG synchronization in bipolar disorder: A graph-theoretic analysis*. *Neuroimage Clin*, 2013. **2**: p. 414-23.
32. Yeap, S., et al., *Visual sensory processing deficits in patients with bipolar disorder revealed through high-density electrical mapping*. *J Psychiatry Neurosci*, 2009. **34**(6): p. 459-64.
33. Vialatte, F.B., et al., *Steady-state visually evoked potentials: focus on essential paradigms and future perspectives*. *Prog Neurobiol*, 2010. **90**(4): p. 418-38.
34. Rosburg, T., N.N. Boutros, and J.M. Ford, *Reduced auditory evoked potential component N100 in schizophrenia--a critical review*. *Psychiatry Res*, 2008. **161**(3): p. 259-74.
35. Mukundan, C.R., *Middle latency components of evoked potential responses in schizophrenics*. *Biol Psychiatry*, 1986. **21**(11): p. 1097-100.
36. Spencer, K.M., et al., *Abnormal neural synchrony in schizophrenia*. *J Neurosci*, 2003. **23**(19): p. 7407-11.
37. Yeap, S., et al., *Visual sensory processing deficits in Schizophrenia and their relationship to disease state*. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2008. **258**(5): p. 305-16.
38. Lavoie, J., M. Maziade, and M. Hebert, *The brain through the retina: The flash electroretinogram as a tool to investigate psychiatric disorders*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2013. **48C**: p. 129-134.
39. Blier, P., *Neurotransmitter targeting in the treatment of depression*. *J Clin Psychiatry*, 2013. **74 Suppl 2**: p. 19-24.
40. Carlsson, A., N. Waters, and M.L. Carlsson, *Neurotransmitter interactions in schizophrenia-therapeutic implications*. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 1999. **249 Suppl 4**: p. 37-43.
41. Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., LaMantia, A.S., McNamara, J.O., Williams, S.M., *Neuroscience: Third Edition*, ed. I. Sinauer Associates. 2004, Sunderland, Massachusetts.
42. Arent, J., *Melatonin and the mammalian pineal gland*. 1995, London: Chapman & Hall.

43. Gaspar, P. and C. Lillesaar, *Probing the diversity of serotonin neurons*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2012. **367**(1601): p. 2382-94.
44. Hoyer, D. and P. Schoeffer, *5-HT receptors: subtypes and second messengers*. J Recept Res, 1991. **11**(1-4): p. 197-214.
45. Yocca, F.D. and S. Maayani, *5-HT receptors linked to adenylyl cyclase activity in mammalian brain*. Ann N Y Acad Sci, 1990. **600**: p. 212-23.
46. Labasque, M., et al., *Constitutive activity of serotonin 2C receptors at G protein-independent signaling: modulation by RNA editing and antidepressants*. Mol Pharmacol, 2010. **78**(5): p. 818-26.
47. Zhang, X., et al., *Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression*. Neuron, 2005. **45**(1): p. 11-6.
48. Beaulieu, J.M., et al., *Role of GSK3 beta in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(4): p. 1333-8.
49. Del'guidice, T., et al., *Stimulation of 5-HT Receptors Improves Cognitive Deficits Induced by Human Tryptophan Hydroxylase 2 Loss of Function Mutation*. Neuropsychopharmacology, 2013.
50. Roeper, J., *Dissecting the diversity of midbrain dopamine neurons*. Trends Neurosci, 2013. **36**(6): p. 336-42.
51. Money, K.M. and G.D. Stanwood, *Developmental origins of brain disorders: roles for dopamine*. Front Cell Neurosci, 2013. **7**: p. 260.
52. Beaulieu, J.M. and R.R. Gainetdinov, *The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors*. Pharmacol Rev, 2011. **63**(1): p. 182-217.
53. Holmes, A., J.E. Lachowicz, and D.R. Sibley, *Phenotypic analysis of dopamine receptor knockout mice; recent insights into the functional specificity of dopamine receptor subtypes*. Neuropharmacology, 2004. **47**(8): p. 1117-34.
54. Ralph-Williams, R.J., et al., *Differential effects of direct and indirect dopamine agonists on prepulse inhibition: a study in D1 and D2 receptor knock-out mice*. J Neurosci, 2002. **22**(21): p. 9604-11.
55. Emamian, E.S., *AKT/GSK3 signaling pathway and schizophrenia*. Front Mol Neurosci, 2012. **5**: p. 33.
56. Leo, D. and R.R. Gainetdinov, *Transgenic mouse models for ADHD*. Cell Tissue Res, 2013. **354**(1): p. 259-71.
57. Giros, B., et al., *Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter*. Nature, 1996. **379**(6566): p. 606-12.
58. Gainetdinov, R.R., et al., *Re-evaluation of the role of the dopamine transporter in dopamine system homeostasis*. Brain Res Brain Res Rev, 1998. **26**(2-3): p. 148-53.
59. Del'guidice, T., et al., *Dissociations between cognitive and motor effects of psychostimulants and atomoxetine in hyperactive DAT-KO mice*. Psychopharmacology (Berl), 2013.
60. Morice, E., et al., *Parallel loss of hippocampal LTD and cognitive flexibility in a genetic model of hyperdopaminergia*. Neuropsychopharmacology, 2007. **32**(10): p. 2108-16.
61. Ralph, R.J., et al., *Prepulse inhibition deficits and perseverative motor patterns in dopamine transporter knock-out mice: differential effects of D1 and D2 receptor antagonists*. J Neurosci, 2001. **21**(1): p. 305-13.
62. Creese, I., D.R. Burt, and S.H. Snyder, *Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs*. Science, 1976. **192**(4238): p. 481-3.
63. Carlsson, A., K. Fuxe, and U. Ungerstedt, *The effect of imipramine on central 5-hydroxytryptamine neurons*. J Pharm Pharmacol, 1968. **20**(2): p. 150-1.

64. Glowinski, J. and J. Axelrod, *Inhibition of Uptake of Tritiated-Noradrenaline in the Intact Rat Brain by Imipramine and Structurally Related Compounds*. *Nature*, 1964. **204**: p. 1318-9.
65. Beaulieu, J.M., R.R. Gainetdinov, and M.G. Caron, *Akt/GSK3 signaling in the action of psychotropic drugs*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2009. **49**: p. 327-47.
66. Alessi, D.R. and P. Cohen, *Mechanism of activation and function of protein kinase B*. *Curr Opin Genet Dev*, 1998. **8**(1): p. 55-62.
67. Cross, D.A., et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B*. *Nature*, 1995. **378**(6559): p. 785-9.
68. Kaidanovich-Beilin, O. and J.R. Woodgett, *GSK-3: Functional Insights from Cell Biology and Animal Models*. *Front Mol Neurosci*, 2011. **4**: p. 40.
69. Beaulieu, J.M., et al., *Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(14): p. 5099-104.
70. Beaulieu, J.M., et al., *Paradoxical striatal cellular signaling responses to psychostimulants in hyperactive mice*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(43): p. 32072-80.
71. Beaulieu, J.M., et al., *An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior*. *Cell*, 2005. **122**(2): p. 261-73.
72. Bychkov, E., et al., *Dopamine depletion and subsequent treatment with L-DOPA, but not the long-lived dopamine agonist pergolide, enhances activity of the Akt pathway in the rat striatum*. *J Neurochem*, 2007. **102**(3): p. 699-711.
73. Beaulieu, J.M., et al., *Regulation of Akt signaling by D2 and D3 dopamine receptors in vivo*. *J Neurosci*, 2007. **27**(4): p. 881-5.
74. Beaulieu, J.M., et al., *A beta-arrestin 2 signaling complex mediates lithium action on behavior*. *Cell*, 2008. **132**(1): p. 125-36.
75. Li, X., et al., *In vivo regulation of glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) by serotonergic activity in mouse brain*. *Neuropsychopharmacology*, 2004. **29**(8): p. 1426-31.
76. Beaulieu, J.M., *Not only lithium: regulation of glycogen synthase kinase-3 by antipsychotics and serotonergic drugs*. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2007. **10**(1): p. 3-6.
77. Beaulieu, J.M. and M.G. Caron, *Looking at lithium: molecular moods and complex behaviour*. *Mol Interv*, 2008. **8**(5): p. 230-41.
78. O'Brien, W.T., et al., *Glycogen synthase kinase-3beta haploinsufficiency mimics the behavioral and molecular effects of lithium*. *J Neurosci*, 2004. **24**(30): p. 6791-8.
79. Kaidanovich-Beilin, O., et al., *Abnormalities in brain structure and behavior in GSK-3alpha mutant mice*. *Mol Brain*, 2009. **2**: p. 35.
80. Kim, W.Y. and W.D. Snider, *Functions of GSK-3 Signaling in Development of the Nervous System*. *Front Mol Neurosci*, 2011. **4**: p. 44.
81. Hoeflich, K.P., et al., *Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation*. *Nature*, 2000. **406**(6791): p. 86-90.
82. O'Brien, W.T., et al., *Glycogen synthase kinase-3 is essential for beta-arrestin-2 complex formation and lithium-sensitive behaviors in mice*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(9): p. 3756-62.
83. Rosenthal, N.E., et al., *Seasonal affective disorder. A description of the syndrome and preliminary findings with light therapy*. *Arch Gen Psychiatry*, 1984. **41**(1): p. 72-80.
84. Partonen, T., *Seasonal Affective Disorder: Practice and Research*. Vol. 311. 2001, New York: Oxford University Press.
85. Partonen, T. and J. Lonnqvist, *Moclobemide and fluoxetine in treatment of seasonal affective disorder*. *J Affect Disord*, 1996. **41**(2): p. 93-9.

86. Lam, R.W., et al., *The Can-SAD study: a randomized controlled trial of the effectiveness of light therapy and fluoxetine in patients with winter seasonal affective disorder*. Am J Psychiatry, 2006. **163**(5): p. 805-12.
87. Oren, D.A., et al., *Exposure to ambient light in patients with winter seasonal affective disorder*. Am J Psychiatry, 1994. **151**(4): p. 591-3.
88. Guillemette, J., et al., *Natural bright light exposure in the summer and winter in subjects with and without complaints of seasonal mood variations*. Biol Psychiatry, 1998. **44**(7): p. 622-8.
89. Graw, P., et al., *Winter and summer outdoor light exposure in women with and without seasonal affective disorder*. J Affect Disord, 1999. **56**(2-3): p. 163-9.
90. Hebert, M., M. Dumont, and J. Paquet, *Seasonal and diurnal patterns of human illumination under natural conditions*. Chronobiol Int, 1998. **15**(1): p. 59-70.
91. Hebert, M., et al., *Electroretinography in patients with winter seasonal affective disorder*. Psychiatry Res, 2004. **127**(1-2): p. 27-34.
92. Mann, J.J., *Role of the serotonergic system in the pathogenesis of major depression and suicidal behavior*. Neuropsychopharmacology, 1999. **21**(2 Suppl): p. 99S-105S.
93. Christensen, L., *The effect of carbohydrates on affect*. Nutrition, 1997. **13**(6): p. 503-14.
94. Rosenthal, N.E., et al., *Psychobiological effects of carbohydrate- and protein-rich meals in patients with seasonal affective disorder and normal controls*. Biol Psychiatry, 1989. **25**(8): p. 1029-40.
95. Moscovitch, A., et al., *A placebo-controlled study of sertraline in the treatment of outpatients with seasonal affective disorder*. Psychopharmacology (Berl), 2004. **171**(4): p. 390-7.
96. Pjrek, E., et al., *Therapeutic effects of escitalopram and reboxetine in seasonal affective disorder: a pooled analysis*. J Psychiatr Res, 2009. **43**(8): p. 792-7.
97. O'Rourke, D., et al., *Treatment of seasonal depression with d-fenfluramine*. J Clin Psychiatry, 1989. **50**(9): p. 343-7.
98. Levitan, R.D., et al., *Hormonal and subjective responses to intravenous m-chlorophenylpiperazine in women with seasonal affective disorder*. Arch Gen Psychiatry, 1998. **55**(3): p. 244-9.
99. Ghadirian, A.M., B.E. Murphy, and M.J. Gendron, *Efficacy of light versus tryptophan therapy in seasonal affective disorder*. J Affect Disord, 1998. **50**(1): p. 23-7.
100. Lam, R.W., et al., *L-tryptophan augmentation of light therapy in patients with seasonal affective disorder*. Can J Psychiatry, 1997. **42**(3): p. 303-6.
101. Neumeister, A., et al., *Effects of tryptophan depletion vs catecholamine depletion in patients with seasonal affective disorder in remission with light therapy*. Arch Gen Psychiatry, 1998. **55**(6): p. 524-30.
102. Neumeister, A., et al., *Effects of tryptophan depletion in fully remitted patients with seasonal affective disorder during summer*. Psychol Med, 1998. **28**(2): p. 257-64.
103. Leyton, M., et al., *Depressive relapse following acute tryptophan depletion in patients with major depressive disorder*. J Psychopharmacol, 2000. **14**(3): p. 284-7.
104. Lambert, G.W., et al., *Effect of sunlight and season on serotonin turnover in the brain*. Lancet, 2002. **360**(9348): p. 1840-2.
105. Gonzalez, M.M. and G. Aston-Jones, *Light deprivation damages monoamine neurons and produces a depressive behavioral phenotype in rats*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(12): p. 4898-903.
106. Praschak-Rieder, N., et al., *Seasonal variation in human brain serotonin transporter binding*. Arch Gen Psychiatry, 2008. **65**(9): p. 1072-8.

107. Nolte, I., et al., *Pineal volume and circadian melatonin profile in healthy volunteers: an interdisciplinary approach*. J Magn Reson Imaging, 2009. **30**(3): p. 499-505.
108. Bartness, T.J. and B.D. Goldman, *Mammalian pineal melatonin: a clock for all seasons*. Experientia, 1989. **45**(10): p. 939-45.
109. Morgan, P.J., et al., *How does the melatonin receptor decode a photoperiodic signal in the pars tuberalis?* Adv Exp Med Biol, 1999. **460**: p. 165-74.
110. Tzischinsky, O. and P. Lavie, *Melatonin possesses time-dependent hypnotic effects*. Sleep, 1994. **17**(7): p. 638-45.
111. Lewy, A.J., et al., *Light suppresses melatonin secretion in humans*. Science, 1980. **210**(4475): p. 1267-9.
112. McIntyre, I.M., et al., *Melatonin, cortisol and prolactin response to acute nocturnal light exposure in healthy volunteers*. Psychoneuroendocrinology, 1992. **17**(2-3): p. 243-8.
113. Wehr, T.A., et al., *A circadian signal of change of season in patients with seasonal affective disorder*. Arch Gen Psychiatry, 2001. **58**(12): p. 1108-14.
114. Schlager, D.S., *Early-morning administration of short-acting beta blockers for treatment of winter depression*. Am J Psychiatry, 1994. **151**(9): p. 1383-5.
115. Lewy, A.J., et al., *Melatonin treatment of winter depression: a pilot study*. Psychiatry Res, 1998. **77**(1): p. 57-61.
116. Eastman, C.I., et al., *The circadian rhythm of temperature during light treatment for winter depression*. Biol Psychiatry, 1993. **34**(4): p. 210-20.
117. Wirz-Justice, A. and R. Richter, *Seasonality in biochemical determinations: a source of variance and a clue to the temporal incidence of affective illness*. Psychiatry Res, 1979. **1**(1): p. 53-60.
118. Schwartz, P.J., N.E. Rosenthal, and T.A. Wehr, *Serotonin 1A receptors, melatonin, and the proportional control thermostat in patients with winter depression*. Arch Gen Psychiatry, 1998. **55**(10): p. 897-903.
119. Neumeister, A., et al., *Dopamine transporter availability in symptomatic depressed patients with seasonal affective disorder and healthy controls*. Psychol Med, 2001. **31**(8): p. 1467-73.
120. Depue, R.A., et al., *Effect of phototherapy on spontaneous eye blink rate in subjects with seasonal affective disorder*. Am J Psychiatry, 1988. **145**(11): p. 1457-9.
121. Barbato, G., et al., *Spontaneous eye blink rate in winter seasonal affective disorder*. Psychiatry Res, 1993. **47**(1): p. 79-85.
122. Taylor, J.R., et al., *Spontaneous blink rates correlate with dopamine levels in the caudate nucleus of MPTP-treated monkeys*. Exp Neurol, 1999. **158**(1): p. 214-20.
123. Shim, J.C., et al., *Adjunctive treatment with a dopamine partial agonist, aripiprazole, for antipsychotic-induced hyperprolactinemia: a placebo-controlled trial*. Am J Psychiatry, 2007. **164**(9): p. 1404-10.
124. Depue, R.A., et al., *Seasonal and mood independence of low basal prolactin secretion in premenopausal women with seasonal affective disorder*. Am J Psychiatry, 1989. **146**(8): p. 989-95.
125. Oren, D.A., et al., *Circadian profiles of cortisol, prolactin, and thyrotropin in seasonal affective disorder*. Biol Psychiatry, 1996. **39**(3): p. 157-70.
126. Lam, R.W., et al., *Electroretinography in seasonal affective disorder*. Psychiatry Res, 1992. **43**(1): p. 55-63.

127. Hebert, M., M. Dumont, and P. Lachapelle, *Electrophysiological evidence suggesting a seasonal modulation of retinal sensitivity in subsyndromal winter depression*. J Affect Disord, 2002. **68**(2-3): p. 191-202.
128. Lavoie, M.P., et al., *Evidence of a biological effect of light therapy on the retina of patients with seasonal affective disorder*. Biol Psychiatry, 2009. **66**(3): p. 253-8.
129. Durand, V.M., *Psychopathologie: Une perspective multidimensionnelle*. 2002, Paris: De Boeck
130. Svrakic, D.M., et al., *Risk architecture of schizophrenia: the role of epigenetics*. Curr Opin Psychiatry, 2013. **26**(2): p. 188-95.
131. Gejman, P.V., A.R. Sanders, and J. Duan, *The role of genetics in the etiology of schizophrenia*. Psychiatr Clin North Am, 2010. **33**(1): p. 35-66.
132. Chagnon, Y.C., et al., *Differential RNA expression between schizophrenic patients and controls of the dystrobrevin binding protein 1 and neuregulin 1 genes in immortalized lymphocytes*. Schizophr Res, 2008. **100**(1-3): p. 281-90.
133. Hashimoto, R., et al., *Expression analysis of neuregulin-1 in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia*. Mol Psychiatry, 2004. **9**(3): p. 299-307.
134. Law, A.J., et al., *Neuregulin 1 transcripts are differentially expressed in schizophrenia and regulated by 5' SNPs associated with the disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(17): p. 6747-52.
135. Petryshen, T.L., et al., *Support for involvement of neuregulin 1 in schizophrenia pathophysiology*. Mol Psychiatry, 2005. **10**(4): p. 366-74, 328.
136. Keri, S., et al., *Neuregulin 1-stimulated phosphorylation of AKT in psychotic disorders and its relationship with neurocognitive functions*. Neurochem Int, 2009. **55**(7): p. 606-9.
137. Sei, Y., et al., *Neuregulin1-induced cell migration is impaired in schizophrenia: association with neuregulin1 and catechol-o-methyltransferase gene polymorphisms*. Mol Psychiatry, 2007. **12**(10): p. 946-57.
138. Amar, S., et al., *Possible involvement of post-dopamine D2 receptor signalling components in the pathophysiology of schizophrenia*. Int J Neuropsychopharmacol, 2008. **11**(2): p. 197-205.
139. Souza, R.P., et al., *Association study of GSK3 gene polymorphisms with schizophrenia and clozapine response*. Psychopharmacology (Berl), 2008. **200**(2): p. 177-86.
140. Park, S.W., et al., *Genetic association of BDNF val66met and GSK-3beta-50T/C polymorphisms with tardive dyskinesia*. Psychiatry Clin Neurosci, 2009. **63**(4): p. 433-9.
141. Glatt, S.J., et al., *Comparative gene expression analysis of blood and brain provides concurrent validation of SELENBP1 up-regulation in schizophrenia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(43): p. 15533-8.
142. Benedetti, F., et al., *Temporal lobe grey matter volume in schizophrenia is associated with a genetic polymorphism influencing glycogen synthase kinase 3-beta activity*. Genes Brain Behav, 2010. **9**(4): p. 365-71.
143. Sawamura, N. and A. Sawa, *Disrupted-in-schizophrenia-1 (DISC1): a key susceptibility factor for major mental illnesses*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1086**: p. 126-33.
144. Mathieson, I., M.R. Munafo, and J. Flint, *Meta-analysis indicates that common variants at the DISC1 locus are not associated with schizophrenia*. Mol Psychiatry, 2012. **17**(6): p. 634-41.
145. O'Donovan, M.C., et al., *Identification of loci associated with schizophrenia by genome-wide association and follow-up*. Nat Genet, 2008. **40**(9): p. 1053-5.
146. Blackwood, D.H. and W.J. Muir, *Clinical phenotypes associated with DISC1, a candidate gene for schizophrenia*. Neurotox Res, 2004. **6**(1): p. 35-41.

147. Callicott, J.H., et al., *Variation in DISC1 affects hippocampal structure and function and increases risk for schizophrenia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(24): p. 8627-32.
148. Cannon, T.D., et al., *Association of DISC1/TRAX haplotypes with schizophrenia, reduced prefrontal gray matter, and impaired short- and long-term memory*. Arch Gen Psychiatry, 2005. **62**(11): p. 1205-13.
149. Prata, D.P., et al., *Effect of disrupted-in-schizophrenia-1 on pre-frontal cortical function*. Mol Psychiatry, 2008. **13**(10): p. 915-7, 909.
150. Carless, M.A., et al., *Impact of DISC1 variation on neuroanatomical and neurocognitive phenotypes*. Mol Psychiatry, 2011. **16**(11): p. 1096-104, 1063.
151. Jaaro-Peled, H., et al., *Neurodevelopmental mechanisms of schizophrenia: understanding disturbed postnatal brain maturation through neuregulin-1-ErbB4 and DISC1*. Trends Neurosci, 2009. **32**(9): p. 485-95.
152. Mao, Y., et al., *Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3beta/beta-catenin signaling*. Cell, 2009. **136**(6): p. 1017-31.
153. Carlsson, A., *Does dopamine play a role in schizophrenia?* Psychol Med, 1977. **7**(4): p. 583-97.
154. Carlsson, A., *Antipsychotic drugs, neurotransmitters, and schizophrenia*. Am J Psychiatry, 1978. **135**(2): p. 165-73.
155. Davis, K.L., et al., *Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization*. Am J Psychiatry, 1991. **148**(11): p. 1474-86.
156. Knable, M.B. and D.R. Weinberger, *Dopamine, the prefrontal cortex and schizophrenia*. J Psychopharmacol, 1997. **11**(2): p. 123-31.
157. Weinberger, D.R., *Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia*. Arch Gen Psychiatry, 1987. **44**(7): p. 660-9.
158. Abi-Dargham, A., *Do we still believe in the dopamine hypothesis? New data bring new evidence*. Int J Neuropsychopharmacol, 2004. **7 Suppl 1**: p. S1-5.
159. Coyle, J.T., *Glutamate and schizophrenia: beyond the dopamine hypothesis*. Cell Mol Neurobiol, 2006. **26**(4-6): p. 365-84.
160. Krystal, J.H., A. Anand, and B. Moghaddam, *Effects of NMDA receptor antagonists: implications for the pathophysiology of schizophrenia*. Arch Gen Psychiatry, 2002. **59**(7): p. 663-4.
161. Krystal, J.H., et al., *Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses*. Arch Gen Psychiatry, 1994. **51**(3): p. 199-214.
162. Neill, J.C., et al., *Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: focus on NMDA receptor antagonism*. Pharmacol Ther, 2010. **128**(3): p. 419-32.
163. Laruelle, M., L.S. Kegeles, and A. Abi-Dargham, *Glutamate, dopamine, and schizophrenia: from pathophysiology to treatment*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **1003**: p. 138-58.
164. Blum, B.P. and J.J. Mann, *The GABAergic system in schizophrenia*. Int J Neuropsychopharmacol, 2002. **5**(2): p. 159-79.
165. Riley, B.P., et al., *Haplotype transmission disequilibrium and evidence for linkage of the CHRNA7 gene region to schizophrenia in Southern African Bantu families*. Am J Med Genet, 2000. **96**(2): p. 196-201.
166. Geoffroy, P.A., B. Etain, and J. Houenou, *Gene X Environment Interactions in Schizophrenia and Bipolar Disorder: Evidence from Neuroimaging*. Front Psychiatry, 2013. **4**: p. 136.

167. Brown, A.S., *The environment and susceptibility to schizophrenia*. Prog Neurobiol, 2011. **93**(1): p. 23-58.
168. Susser, E., et al., *Schizophrenia after prenatal famine. Further evidence*. Arch Gen Psychiatry, 1996. **53**(1): p. 25-31.
169. Hultman, C.M., et al., *Prenatal and perinatal risk factors for schizophrenia, affective psychosis, and reactive psychosis of early onset: case-control study*. BMJ, 1999. **318**(7181): p. 421-6.
170. Geddes, J.R. and S.M. Lawrie, *Obstetric complications and schizophrenia: a meta-analysis*. Br J Psychiatry, 1995. **167**(6): p. 786-93.
171. Bradbury, T.N. and G.A. Miller, *Season of birth in schizophrenia: a review of evidence, methodology, and etiology*. Psychol Bull, 1985. **98**(3): p. 569-94.
172. Lewis, G., et al., *Schizophrenia and city life*. Lancet, 1992. **340**(8812): p. 137-40.
173. Marcelis, M., et al., *Urbanization and psychosis: a study of 1942-1978 birth cohorts in The Netherlands*. Psychol Med, 1998. **28**(4): p. 871-9.
174. Andreasson, S., et al., *Cannabis and schizophrenia. A longitudinal study of Swedish conscripts*. Lancet, 1987. **2**(8574): p. 1483-6.
175. Morgan, C. and H. Fisher, *Environment and schizophrenia: environmental factors in schizophrenia: childhood trauma--a critical review*. Schizophr Bull, 2007. **33**(1): p. 3-10.
176. Geddes, J.R. and D.J. Miklowitz, *Treatment of bipolar disorder*. Lancet, 2013. **381**(9878): p. 1672-82.
177. Cousins, D.A., K. Butts, and A.H. Young, *The role of dopamine in bipolar disorder*. Bipolar Disord, 2009. **11**(8): p. 787-806.
178. Stockmeier, C.A., *Involvement of serotonin in depression: evidence from postmortem and imaging studies of serotonin receptors and the serotonin transporter*. J Psychiatr Res, 2003. **37**(5): p. 357-73.
179. Diazgranados, N., et al., *A randomized add-on trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant bipolar depression*. Arch Gen Psychiatry, 2010. **67**(8): p. 793-802.
180. Li, X., M.A. Frye, and R.C. Shelton, *Review of pharmacological treatment in mood disorders and future directions for drug development*. Neuropsychopharmacology, 2012. **37**(1): p. 77-101.
181. Nakata, K., et al., *DISC1 splice variants are upregulated in schizophrenia and associated with risk polymorphisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(37): p. 15873-8.
182. Lipska, B.K., et al., *Expression of DISC1 binding partners is reduced in schizophrenia and associated with DISC1 SNPs*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(8): p. 1245-58.
183. Nicodemus, K.K., et al., *Biological validation of increased schizophrenia risk with NRG1, ERBB4, and AKT1 epistasis via functional neuroimaging in healthy controls*. Arch Gen Psychiatry, 2010. **67**(10): p. 991-1001.
184. Maziade, M., et al., *Shared and specific susceptibility loci for schizophrenia and bipolar disorder: a dense genome scan in Eastern Quebec families*. Mol Psychiatry, 2005. **10**(5): p. 486-99.
185. Maziade, M., et al., *Shared neurocognitive dysfunctions in young offspring at extreme risk for schizophrenia or bipolar disorder in eastern quebec multigenerational families*. Schizophr Bull, 2009. **35**(5): p. 919-30.
186. Merette, C., et al., *Replication of linkage with bipolar disorder on chromosome 16p in the Eastern Quebec population*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2008. **147B**(6): p. 737-44.

187. Van Snellenberg, J.X. and T. de Candia, *Meta-analytic evidence for familial coaggregation of schizophrenia and bipolar disorder*. Arch Gen Psychiatry, 2009. **66**(7): p. 748-55.
188. McClung, C.A., *Circadian genes, rhythms and the biology of mood disorders*. Pharmacol Ther, 2007. **114**(2): p. 222-32.
189. Mansour, H.A., T.H. Monk, and V.L. Nimgaonkar, *Circadian genes and bipolar disorder*. Ann Med, 2005. **37**(3): p. 196-205.
190. Bunney, J.N. and S.G. Potkin, *Circadian abnormalities, molecular clock genes and chronobiological treatments in depression*. Br Med Bull, 2008. **86**: p. 23-32.
191. Iwahana, E., et al., *Effect of lithium on the circadian rhythms of locomotor activity and glycogen synthase kinase-3 protein expression in the mouse suprachiasmatic nuclei*. Eur J Neurosci, 2004. **19**(8): p. 2281-7.
192. Iwahana, E., et al., *Differential effect of lithium on the circadian oscillator in young and old hamsters*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **354**(3): p. 752-6.
193. LeSauter, J. and R. Silver, *Lithium lengthens the period of circadian rhythms in lesioned hamsters bearing SCN grafts*. Biol Psychiatry, 1993. **34**(1-2): p. 75-83.
194. Li, J., et al., *Lithium impacts on the amplitude and period of the molecular circadian clockwork*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33292.
195. Kaladchibachi, S.A., et al., *Glycogen synthase kinase 3, circadian rhythms, and bipolar disorder: a molecular link in the therapeutic action of lithium*. J Circadian Rhythms, 2007. **5**: p. 3.
196. Strakowski, S.M., et al., *The functional neuroanatomy of bipolar disorder: a consensus model*. Bipolar Disord, 2012. **14**(4): p. 313-25.
197. Altshuler, L., et al., *Increased amygdala activation during mania: a functional magnetic resonance imaging study*. Am J Psychiatry, 2005. **162**(6): p. 1211-3.
198. Blumberg, H.P., et al., *Preliminary evidence for medication effects on functional abnormalities in the amygdala and anterior cingulate in bipolar disorder*. Psychopharmacology (Berl), 2005. **183**(3): p. 308-13.
199. Blumberg, H.P., et al., *A functional magnetic resonance imaging study of bipolar disorder: state- and trait-related dysfunction in ventral prefrontal cortices*. Arch Gen Psychiatry, 2003. **60**(6): p. 601-9.
200. Townsend, J.D., et al., *Deficits in inferior frontal cortex activation in euthymic bipolar disorder patients during a response inhibition task*. Bipolar Disord, 2012. **14**(4): p. 442-50.
201. Chepenik, L.G., et al., *Functional connectivity between ventral prefrontal cortex and amygdala at low frequency in the resting state in bipolar disorder*. Psychiatry Res, 2010. **182**(3): p. 207-10.
202. Balogh, Z., G. Benedek, and S. Keri, *Retinal dysfunctions in schizophrenia*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2008. **32**(1): p. 297-300.
203. Sinn, R. and J. Wittbrodt, *An eye on eye development*. Mech Dev, 2013. **130**(6-8): p. 347-58.
204. *Adler's physiology of the eye - 11th ed.*, ed. S. Elsevier. 2011.
205. Hu, D.N., J.D. Simon, and T. Sarna, *Role of ocular melanin in ophthalmic physiology and pathology*. Photochem Photobiol, 2008. **84**(3): p. 639-44.
206. Strauss, O., *The retinal pigment epithelium in visual function*. Physiol Rev, 2005. **85**(3): p. 845-81.
207. Bok, D., *The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision*. J Cell Sci Suppl, 1993. **17**: p. 189-95.

208. Nguyen-Legros, J. and D. Hicks, *Renewal of photoreceptor outer segments and their phagocytosis by the retinal pigment epithelium*. *Int Rev Cytol*, 2000. **196**: p. 245-313.
209. Masland, R.H., *The neuronal organization of the retina*. *Neuron*, 2012. **76**(2): p. 266-80.
210. Stockman, A. and L.T. Sharpe, *Into the twilight zone: the complexities of mesopic vision and luminous efficiency*. *Ophthalmic Physiol Opt*, 2006. **26**(3): p. 225-39.
211. Okano, T., Y. Fukada, and T. Yoshizawa, *Molecular basis for tetrachromatic color vision*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 1995. **112**(3): p. 405-14.
212. Baylor, D., *How photons start vision*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(2): p. 560-5.
213. Korenbrot, J.I., *Speed, sensitivity, and stability of the light response in rod and cone photoreceptors: facts and models*. *Prog Retin Eye Res*, 2012. **31**(5): p. 442-66.
214. Wu, S.M., *Synaptic organization of the vertebrate retina: general principles and species-specific variations: the Friedenwald lecture*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010. **51**(3): p. 1263-74.
215. Ahnelt, P.K. and H. Kolb, *The mammalian photoreceptor mosaic-adaptive design*. *Prog Retin Eye Res*, 2000. **19**(6): p. 711-77.
216. Smith, S.J. and G.J. Augustine, *Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release*. *Trends Neurosci*, 1988. **11**(10): p. 458-64.
217. Schmitz, Y. and P. Witkovsky, *Dependence of photoreceptor glutamate release on a dihydropyridine-sensitive calcium channel*. *Neuroscience*, 1997. **78**(4): p. 1209-16.
218. Korenbrot, J.I. and T.I. Rebrik, *Tuning outer segment Ca<sup>2+</sup> homeostasis to phototransduction in rods and cones*. *Adv Exp Med Biol*, 2002. **514**: p. 179-203.
219. Lagnado, L., *Signal amplification: let's turn down the lights*. *Curr Biol*, 2002. **12**(6): p. R215-7.
220. Govardovskii, V.I., P.D. Calvert, and V.Y. Arshavsky, *Photoreceptor light adaptation. Untangling desensitization and sensitization*. *J Gen Physiol*, 2000. **116**(6): p. 791-4.
221. Dizhoor, A., *Site-directed and natural mutations in studying functional domains in guanylyl cyclase activating proteins (GCAPs)*. *Adv Exp Med Biol*, 2002. **514**: p. 291-301.
222. Koch, K.W., *Control of photoreceptor proteins by Ca<sup>2+</sup>*. *Cell Calcium*, 1995. **18**(4): p. 314-21.
223. Makino, C.L., et al., *Recoverin regulates light-dependent phosphodiesterase activity in retinal rods*. *J Gen Physiol*, 2004. **123**(6): p. 729-41.
224. Matthews, G., *Synaptic mechanisms of bipolar cell terminals*. *Vision Res*, 1999. **39**(15): p. 2469-76.
225. Famiglietti, E.V., Jr. and H. Kolb, *Structural basis for ON-and OFF-center responses in retinal ganglion cells*. *Science*, 1976. **194**(4261): p. 193-5.
226. Sand, A., T.M. Schmidt, and P. Kofuji, *Diverse types of ganglion cell photoreceptors in the mammalian retina*. *Prog Retin Eye Res*, 2012. **31**(4): p. 287-302.
227. Nguyen-Legros, J., et al., *Immunocytochemical localization of dopamine D1 receptors in the retina of mammals*. *Vis Neurosci*, 1997. **14**(3): p. 545-51.
228. Doi, M., et al., *Impaired light masking in dopamine D2 receptor-null mice*. *Nat Neurosci*, 2006. **9**(6): p. 732-4.
229. Witkovsky, P., *Dopamine and retinal function*. *Doc Ophthalmol*, 2004. **108**(1): p. 17-40.
230. Schneider, T. and E. Zrenner, *The effect of fluphenazine on rod-mediated retinal responses*. *Doc Ophthalmol*, 1987. **65**(3): p. 287-96.
231. Skrandies, W. and H. Wassle, *Dopamine and serotonin in cat retina: electroretinography and histology*. *Exp Brain Res*, 1988. **71**(2): p. 231-40.
232. Huppe-Gourgues, F., et al., *Effects of the intravitreal administration of dopaminergic ligands on the b-wave amplitude of the rabbit electroretinogram*. *Vision Res*, 2005. **45**(2): p. 137-45.

233. Holopigian, K., et al., *The effects of dopamine blockade on the human flash electroretinogram*. Doc Ophthalmol, 1994. **86**(1): p. 1-10.
234. Kuppenova, P. and S. Belcheva, *Effects of haloperidol, methylergometrine and phentolamine on the frog ERG*. Experientia, 1981. **37**(8): p. 852-4.
235. Wioland, N., G. Rudolf, and N. Bonaventure, *Electrooculographic and electroretinographic study in the chicken after dopamine and haloperidol*. Doc Ophthalmol, 1990. **75**(2): p. 175-80.
236. Gastinger, M.J., et al., *Retinopetal axons in mammals: emphasis on histamine and serotonin*. Curr Eye Res, 2006. **31**(7-8): p. 655-67.
237. Lima, L. and M. Urbina, *Serotonergic projections to the retina of rat and goldfish*. Neurochem Int, 1998. **32**(2): p. 133-41.
238. Delaey, C. and J. Van de Voorde, *Retinal arterial tone is controlled by a retinal-derived relaxing factor*. Circ Res, 1998. **83**(7): p. 714-20.
239. Hayreh, S.S., *Retinal and optic nerve head ischemic disorders and atherosclerosis: role of serotonin*. Prog Retin Eye Res, 1999. **18**(2): p. 191-221.
240. Boerrigter, R.M., J.V. Siertsema, and I.P. Kema, *Serotonin (5-HT) and the rat's eye. Some pilot studies*. Doc Ophthalmol, 1992. **82**(1-2): p. 141-50.
241. Thier, P. and H. Wassle, *Indoleamine-mediated reciprocal modulation of on-centre and off-centre ganglion cell activity in the retina of the cat*. J Physiol, 1984. **351**: p. 613-30.
242. Porciatti, V., et al., *Serotonin depletion modifies the pigeon electroretinogram*. Doc Ophthalmol, 1989. **72**(1): p. 93-100.
243. *Le cerveau à tous les niveaux!* <http://lecerveau.mcgill.ca/index.php>.
244. Gachon, F., et al., *The mammalian circadian timing system: from gene expression to physiology*. Chromosoma, 2004. **113**(3): p. 103-12.
245. Schwartz, W.J., R.A. Gross, and M.T. Morton, *The suprachiasmatic nuclei contain a tetrodotoxin-resistant circadian pacemaker*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(6): p. 1694-8.
246. Takahashi, J.S., L.H. Pinto, and M.H. Vitaterna, *Forward and reverse genetic approaches to behavior in the mouse*. Science, 1994. **264**(5166): p. 1724-33.
247. Lucas, R.J., et al., *Regulation of the mammalian pineal by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors*. Science, 1999. **284**(5413): p. 505-7.
248. Freedman, M.S., et al., *Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors*. Science, 1999. **284**(5413): p. 502-4.
249. Czeisler, C.A., et al., *Suppression of melatonin secretion in some blind patients by exposure to bright light*. N Engl J Med, 1995. **332**(1): p. 6-11.
250. Klerman, E.B., et al., *Photic resetting of the human circadian pacemaker in the absence of conscious vision*. J Biol Rhythms, 2002. **17**(6): p. 548-55.
251. Panda, S., et al., *Illumination of the melanopsin signaling pathway*. Science, 2005. **307**(5709): p. 600-4.
252. Morin, L.P., *Neuroanatomy of the extended circadian rhythm system*. Exp Neurol, 2013. **243**: p. 4-20.
253. Zawilka, J.B., D.J. Skene, and J. Arendt, *Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms*. Pharmacol Rep, 2009. **61**(3): p. 383-410.
254. Hofstra, W.A. and A.W. de Weerd, *How to assess circadian rhythm in humans: a review of literature*. Epilepsy Behav, 2008. **13**(3): p. 438-44.
255. Saper, C.B., et al., *The hypothalamic integrator for circadian rhythms*. Trends Neurosci, 2005. **28**(3): p. 152-7.

256. Tan, D.X., et al., *Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin*. J Pineal Res, 2003. **34**(1): p. 75-8.
257. Rohde, B.H., M.A. McLaughlin, and L.Y. Chiou, *Existence and role of endogenous ocular melatonin*. J Ocul Pharmacol, 1985. **1**(3): p. 235-43.
258. Mhatre, M.C., A.S. van Jaarsveld, and R.J. Reiter, *Melatonin in the lacrimal gland: first demonstration and experimental manipulation*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. **153**(3): p. 1186-92.
259. Bernard, M., et al., *Avian melatonin synthesis: photic and circadian regulation of serotonin N-acetyltransferase mRNA in the chicken pineal gland and retina*. J Neurochem, 1997. **68**(1): p. 213-24.
260. Wiechmann, A.F., et al., *Direct modulation of rod photoreceptor responsiveness through a Mel(1c) melatonin receptor in transgenic Xenopus laevis retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003. **44**(10): p. 4522-31.
261. Reme, C.E., A. Wirz-Justice, and M. Terman, *The visual input stage of the mammalian circadian pacemaking system: I. Is there a clock in the mammalian eye?* J Biol Rhythms, 1991. **6**(1): p. 5-29.
262. Miranda-Anaya, M., P.A. Bartell, and M. Menaker, *Circadian rhythm of iguana electroretinogram: the role of dopamine and melatonin*. J Biol Rhythms, 2002. **17**(6): p. 526-38.
263. Peters, J.L. and V.M. Cassone, *Melatonin regulates circadian electroretinogram rhythms in a dose- and time-dependent fashion*. J Pineal Res, 2005. **38**(3): p. 209-15.
264. Birch, D.G., E.L. Berson, and M.A. Sandberg, *Diurnal rhythm in the human rod ERG*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1984. **25**(2): p. 236-8.
265. Birch, D.G., M.A. Sandberg, and E.L. Berson, *Diurnal rhythm in the human rod ERG. Relationship to cyclic lighting*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1986. **27**(2): p. 268-70.
266. Hankins, M.W., R.J. Jones, and K.H. Ruddock, *Diurnal variation in the b-wave implicit time of the human electroretinogram*. Vis Neurosci, 1998. **15**(1): p. 55-67.
267. Hankins, M.W., et al., *Diurnal daylight phase affects the temporal properties of both the b-wave and d-wave of the human electroretinogram*. Brain Res, 2001. **889**(1-2): p. 339-43.
268. Manglapus, M.K., et al., *Dopamine mediates circadian rhythms of rod-cone dominance in the Japanese quail retina*. J Neurosci, 1999. **19**(10): p. 4132-41.
269. Lavoie, J., et al., *Circadian variation in the electroretinogram and the presence of central melatonin*. Doc Ophthalmol, 2010. **120**(3): p. 265-72.
270. Berninger, T.A. and G.B. Arden, *The pattern electroretinogram*. Eye (Lond), 1988. **2 Suppl**: p. S257-83.
271. Hood, D.C., et al., *The multifocal electroretinogram*. J Neuroophthalmol, 2003. **23**(3): p. 225-35.
272. Arden, G.B. and P.A. Constable, *The electro-oculogram*. Prog Retin Eye Res, 2006. **25**(2): p. 207-48.
273. Lavoie, J., et al., *The Electroretinogram as a Biomarker of Central Dopamine and Serotonin: Potential Relevance to Psychiatric Disorders*. Biol Psychiatry, 2013.
274. Dawson, W.W., G.L. Trick, and C.A. Litzkow, *Improved electrode for electroretinography*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1979. **18**(9): p. 988-91.
275. Stockton, R.A. and M.M. Slaughter, *B-wave of the electroretinogram. A reflection of ON bipolar cell activity*. J Gen Physiol, 1989. **93**(1): p. 101-22.
276. Newman, E.A. and L.L. Odette, *Model of electroretinogram b-wave generation: a test of the K+ hypothesis*. J Neurophysiol, 1984. **51**(1): p. 164-82.

277. Wachtmeister, L., *Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal*. Prog Retin Eye Res, 1998. **17**(4): p. 485-521.
278. Naka, K.I. and W.A. Rushton, *S-potentials from colour units in the retina of fish (Cyprinidae)*. J Physiol, 1966. **185**(3): p. 536-55.
279. Hebert, M., P. Lachapelle, and M. Dumont, *Reproducibility of electroretinograms recorded with DTL electrodes*. Doc Ophthalmol, 1995. **91**(4): p. 333-42.
280. Gerbaldo, H., et al., *Abnormal electroretinography in schizophrenic patients with a history of sun gazing*. Neuropsychobiology, 1992. **25**(2): p. 99-101.
281. Warner, R., et al., *Retinal function as a marker for cell membrane omega-3 fatty acid depletion in schizophrenia: a pilot study*. Biol Psychiatry, 1999. **45**(9): p. 1138-42.
282. Marmor, M.F., et al., *Oscillatory potentials as a marker for dopaminergic disease*. Doc Ophthalmol, 1988. **69**(3): p. 255-61.
283. Hebert, M., et al., *Retinal response to light in young nonaffected offspring at high genetic risk of neuropsychiatric brain disorders*. Biol Psychiatry, 2010. **67**(3): p. 270-4.
284. McPartland, J.C. and K.A. Pelphrey, *The implications of social neuroscience for social disability*. J Autism Dev Disord, 2012. **42**(6): p. 1256-62.
285. Ritvo, E.R., et al., *Electroretinograms in autism: a pilot study of b-wave amplitudes*. Am J Psychiatry, 1988. **145**(2): p. 229-32.
286. Realmuto, G., et al., *Electroretinograms (ERGs) in four autistic probands and six first-degree relatives*. Can J Psychiatry, 1989. **34**(5): p. 435-9.
287. Ross, H.E., F.B. Glaser, and T. Germanson, *The prevalence of psychiatric disorders in patients with alcohol and other drug problems*. Arch Gen Psychiatry, 1988. **45**(11): p. 1023-31.
288. McLane, N.J. and D.M. Carroll, *Ocular manifestations of drug abuse*. Surv Ophthalmol, 1986. **30**(5): p. 298-313.
289. Reis, R.A., et al., *Dopaminergic signaling in the developing retina*. Brain Res Rev, 2007. **54**(1): p. 181-8.
290. Salamone, J.D. and M. Correa, *The mysterious motivational functions of mesolimbic dopamine*. Neuron, 2012. **76**(3): p. 470-85.
291. Roy, M., D. Smelson, and A. Roy, *Longitudinal study of blue cone retinal function in cocaine-withdrawn patients*. Biol Psychiatry, 1997. **41**(2): p. 252-3.
292. Roy, M., et al., *Reduced blue cone electroretinogram in cocaine-withdrawn patients*. Arch Gen Psychiatry, 1997. **54**(2): p. 153-6.
293. Roy, M., et al., *Reduced blue cone electroretinogram in withdrawn cocaine dependent patients: a replication*. Biol Psychiatry, 1997. **42**(7): p. 631-3.
294. Roy, M., D.A. Smelson, and A. Roy, *Abnormal electroretinogram in cocaine-dependent patients. Relationship to craving*. Br J Psychiatry, 1996. **168**(4): p. 507-11.
295. Smelson, D.A., et al., *Electroretinogram in withdrawn cocaine-dependent subjects. Relationship to cue-elicited craving*. Br J Psychiatry, 1998. **172**: p. 537-9.
296. Roy, A., M. Roy, and D.A. Smelson, *Risperidone, ERG and cocaine craving*. Am J Addict, 1998. **7**(1): p. 90.
297. Roy, A., et al., *Blue cone electroretinogram amplitudes are related to dopamine function in cocaine-dependent patients*. Psychiatry Res, 2003. **117**(2): p. 191-5.
298. Smelson, D.A., et al., *Electroretinogram and cue-elicited craving in withdrawn cocaine-dependent patients: a replication*. Am J Drug Alcohol Abuse, 2001. **27**(2): p. 391-7.

299. Gonzalez Perez, J., et al., *Intraocular motility, electrophysiological tests and visual fields in drug addicts*. *Ophthalmic Physiol Opt*, 1995. **15**(5): p. 493-8.
300. Jagadeesh, J.M., H.C. Lee, and M. Salazar-Bookaman, *Influence of chlorpromazine on the rabbit electroretinogram*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1980. **19**(12): p. 1449-56.
301. Mizota, A. and E. Adachi-Usami, *Electroretinographic effects of haloperidol on the mouse retina*. *Doc Ophthalmol*, 1993. **85**(2): p. 151-60.
302. Nakatsuka, K. and D.I. Hamasaki, *Destruction of the indoleamine-accumulating amacrine cells alters the ERG of rabbits*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1985. **26**(8): p. 1109-16.
303. Perossini, M. and P. Fornaro, *Electroretinographic effects induced in humans by psychopharmacologic agents*. *Doc Ophthalmol*, 1990. **75**(1): p. 1-6.
304. Roth, B.L., D.J. Sheffler, and W.K. Kroeze, *Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia*. *Nat Rev Drug Discov*, 2004. **3**(4): p. 353-9.
305. Gouras, P., *Electroretinography: Some basic principles*. *Invest Ophthalmol*, 1970. **9**(8): p. 557-69.
306. Birch, D.G. and J.L. Anderson, *Standardized full-field electroretinography. Normal values and their variation with age*. *Arch Ophthalmol*, 1992. **110**(11): p. 1571-6.
307. Britton, R.J., et al., *The area of the neuroretinal rim of the optic nerve in normal eyes*. *Am J Ophthalmol*, 1987. **103**(4): p. 497-504.
308. Palin, O., *The influence of the axial length of the eye on the size of the recorded B-potential in the clinical single-flash electroretinogram*. *Acta Ophthalmologica (Suppl)*, 1969. **101**: p. 1-48.
309. Raymond, V., et al., *Potent antidopaminergic activity of estradiol at the pituitary level on prolactin release*. *Science*, 1978. **200**(4346): p. 1173-5.
310. Gagne, A.M., et al., *Assessing the impact of non-dilating the eye on full-field electroretinogram and standard flash response*. *Doc Ophthalmol*, 2010. **121**(3): p. 167-75.
311. Lewy, A.J., et al., *The phase shift hypothesis for the circadian component of winter depression*. *Dialogues Clin Neurosci*, 2007. **9**(3): p. 291-300.
312. Kim, D.Y. and C.S. Jung, *Gap junction contributions to the goldfish electroretinogram at the photopic illumination level*. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2012. **16**(3): p. 219-24.
313. Siwak, C.T., et al., *Locomotor activity rhythms in dogs vary with age and cognitive status*. *Behav Neurosci*, 2003. **117**(4): p. 813-24.
314. Dunlap, K.L., et al., *Seasonal and diurnal melatonin production in exercising sled dogs*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2007. **147**(4): p. 863-7.
315. Gagne, A.M., et al., *Impact of oral melatonin on the electroretinogram cone response*. *J Circadian Rhythms*, 2009. **7**: p. 14.
316. Rufiange, M., M. Dumont, and P. Lachapelle, *Correlating retinal function with melatonin secretion in subjects with an early or late circadian phase*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002. **43**(7): p. 2491-9.
317. Varela Lopez, O., et al., *Effects of hypercapnia on the electroretinogram in sevoflurane and isoflurane anaesthetized dogs*. *Doc Ophthalmol*, 2010. **121**(1): p. 9-20.
318. Rosolen, S.G., et al., *The ERG of the beagle dog: evidence associating a post b-wave negativity with the Tapetum lucidum*. *Doc Ophthalmol*, 2005. **110**(2-3): p. 145-53.
319. Dong, C.J. and J.S. McReynolds, *The relationship between light, dopamine release and horizontal cell coupling in the mudpuppy retina*. *J Physiol*, 1991. **440**: p. 291-309.

320. Shulman, L.M. and D.A. Fox, *Dopamine inhibits mammalian photoreceptor Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity via a selective effect on the alpha3 isozyme*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(15): p. 8034-9.
321. Stirling, C.E. and P.V. Sarthy, *Localization of the Na-K pump in turtle retina*. J Neurocytol, 1985. **14**(1): p. 33-47.
322. Wetzel, R.K., E. Arystarkhova, and K.J. Sweadner, *Cellular and subcellular specification of Na,K-ATPase alpha and beta isoforms in the postnatal development of mouse retina*. J Neurosci, 1999. **19**(22): p. 9878-89.
323. Regrigny, O., et al., *Melatonin improves cerebral circulation security margin in rats*. Am J Physiol, 1998. **275**(1 Pt 2): p. H139-44.
324. Savaskan, E., et al., *Distribution of melatonin MT1 receptor immunoreactivity in human retina*. J Histochem Cytochem, 2002. **50**(4): p. 519-26.
325. Williamson, T.H., D. Keating, and M. Bradnam, *Electroretinography of central retinal vein occlusion under scotopic and photopic conditions: what to measure?* Acta Ophthalmol Scand, 1997. **75**(1): p. 48-53.
326. Huemer, K.H., et al., *Effects of dopamine on human retinal vessel diameter and its modulation during flicker stimulation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(1): p. H358-63.
327. Liang, J., et al., *Diurnal rhythms of tryptophan hydroxylase 1 and 2 mRNA expression in the rat retina*. Neuroreport, 2004. **15**(9): p. 1497-500.
328. Cellini, M. and R. Caramazza, *Color doppler imaging of ocular blood flow after topical ketanserin*. Ophthalmologica, 1999. **213**(5): p. 286-9.
329. Jacobsen, J.P., I.O. Medvedev, and M.G. Caron, *The 5-HT deficiency theory of depression: perspectives from a naturalistic 5-HT deficiency model, the tryptophan hydroxylase 2Arg439His knockin mouse*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2012. **367**(1601): p. 2444-59.
330. Walther, D.J. and M. Bader, *A unique central tryptophan hydroxylase isoform*. Biochem Pharmacol, 2003. **66**(9): p. 1673-80.
331. Pinard, C., J. Beaulieu, and I. Timofeev. *Serotonin Modulates the Slow Oscillation in Prefrontal Cortical Neurons of Anesthetised Mice*. in *Fifth Annual Canadian Neuroscience Meeting*. 2011. Quebec City, Quebec.
332. Savelieva, K.V., et al., *Genetic disruption of both tryptophan hydroxylase genes dramatically reduces serotonin and affects behavior in models sensitive to antidepressants*. PLoS One, 2008. **3**(10): p. e3301.
333. Jones, S.R., et al., *Profound neuronal plasticity in response to inactivation of the dopamine transporter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(7): p. 4029-34.
334. Sotnikova, T.D., et al., *Dopamine-independent locomotor actions of amphetamines in a novel acute mouse model of Parkinson disease*. PLoS Biol, 2005. **3**(8): p. e271.
335. Shiells, R.A. and G. Falk, *Dopamine hyperpolarizes and reduces the light responses of rod ON-centre bipolar cells in the retina of the dogfish, Scyliorhinus canicula*. Neurosci Lett, 1985. **55**(3): p. 331-6.
336. Bosse, R., et al., *Anterior pituitary hypoplasia and dwarfism in mice lacking the dopamine transporter*. Neuron, 1997. **19**(1): p. 127-38.
337. Rivera, J.C., et al., *Expression and cellular localization of prolactin and the prolactin receptor in mammalian retina*. Exp Eye Res, 2008. **86**(2): p. 314-21.

338. De Luca Brunori, I., et al., *Evaluation of the central dopaminergic activity in gestational hyperprolactinaemia by means of the electroretinographic technique*. Clin Exp Obstet Gynecol, 1985. **12**(1-2): p. 13-5.
339. Xin, D. and S.A. Bloomfield, *Dark- and light-induced changes in coupling between horizontal cells in mammalian retina*. J Comp Neurol, 1999. **405**(1): p. 75-87.
340. Di Matteo, V., et al., *SB 242084, a selective serotonin<sub>2C</sub> receptor antagonist, increases dopaminergic transmission in the mesolimbic system*. Neuropharmacology, 1999. **38**(8): p. 1195-205.
341. Rybak, Y.E., et al., *An open trial of light therapy in adult attention-deficit/hyperactivity disorder*. J Clin Psychiatry, 2006. **67**(10): p. 1527-35.
342. Herrmann, R., et al., *Rod vision is controlled by dopamine-dependent sensitization of rod bipolar cells by GABA*. Neuron, 2011. **72**(1): p. 101-10.
343. He, Q., et al., *Dopamine d1 receptors regulate the light dependent development of retinal synaptic responses*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79625.
344. Goldman-Rakic, P.S., et al., *Targeting the dopamine D1 receptor in schizophrenia: insights for cognitive dysfunction*. Psychopharmacology (Berl), 2004. **174**(1): p. 3-16.
345. Maziade, M., et al., *Verbal and visual memory impairments among young offspring and healthy adult relatives of patients with schizophrenia and bipolar disorder: selective generational patterns indicate different developmental trajectories*. Schizophr Bull, 2011. **37**(6): p. 1218-28.
346. Schechter, G., et al., *Electroretinographic assessment in schizophrenia*. Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl, 1987. **40**: p. 746-51.
347. Eells, J.B., *The control of dopamine neuron development, function and survival: insights from transgenic mice and the relevance to human disease*. Curr Med Chem, 2003. **10**(10): p. 857-70.
348. Warthen, D.M., B.J. Wiltgen, and I. Provencio, *Light enhances learned fear*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(33): p. 13788-93.
349. Coffe, V., R.C. Carbajal, and R. Salceda, *Glycogen metabolism in the rat retina*. J Neurochem, 2004. **88**(4): p. 885-90.
350. Rungger-Brandle, E., H. Kolb, and G. Niemyer, *Histochemical demonstration of glycogen in neurons of the cat retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996. **37**(5): p. 702-15.
351. Perezleon, J.A., et al., *Immunohistochemical localization of glycogen synthase and GSK3beta: control of glycogen content in retina*. Neurochem Res, 2013. **38**(5): p. 1063-9.
352. Dixon, L., et al., *Prevalence and correlates of diabetes in national schizophrenia samples*. Schizophr Bull, 2000. **26**(4): p. 903-12.
353. Hagg, S., et al., *Prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance in patients treated with clozapine compared with patients treated with conventional depot neuroleptic medications*. J Clin Psychiatry, 1998. **59**(6): p. 294-9.
354. Cohen, P. and M. Goedert, *GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(6): p. 479-87.
355. Costa, P.Z. and R. Soares, *Neovascularization in diabetes and its complications. Unraveling the angiogenic paradox*. Life Sci, 2013. **92**(22): p. 1037-45.
356. Meier, M.H., et al., *Microvascular abnormality in schizophrenia as shown by retinal imaging*. Am J Psychiatry, 2013. **170**(12): p. 1451-9.
357. Hoang, M.V., L.E. Smith, and D.R. Senger, *Moderate GSK-3beta inhibition improves neovascular architecture, reduces vascular leakage, and reduces retinal hypoxia in a model of ischemic retinopathy*. Angiogenesis, 2010. **13**(3): p. 269-77.

358. Martinek, S., et al., *A role for the segment polarity gene shaggy/GSK-3 in the Drosophila circadian clock*. Cell, 2001. **105**(6): p. 769-79.
359. Iitaka, C., et al., *A role for glycogen synthase kinase-3beta in the mammalian circadian clock*. J Biol Chem, 2005. **280**(33): p. 29397-402.
360. Yin, L., et al., *Nuclear receptor Rev-erbalpha is a critical lithium-sensitive component of the circadian clock*. Science, 2006. **311**(5763): p. 1002-5.
361. Sahar, S., et al., *Regulation of BMAL1 protein stability and circadian function by GSK3beta-mediated phosphorylation*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8561.
362. Reiter, R.J., et al., *A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant*. J Pineal Res, 1995. **18**(1): p. 1-11.
363. Brzezinski, A., et al., *Effects of exogenous melatonin on sleep: a meta-analysis*. Sleep Med Rev, 2005. **9**(1): p. 41-50.
364. Buscemi, N., et al., *The efficacy and safety of exogenous melatonin for primary sleep disorders. A meta-analysis*. J Gen Intern Med, 2005. **20**(12): p. 1151-8.
365. Bersani, F.S., et al., *Sleep and biorythm disturbances in schizophrenia, mood and anxiety disorders: a review*. Riv Psichiatr, 2012. **47**(5): p. 365-75.
366. Billiard, M., *Lithium carbonate: effects on sleep patterns of normal and depressed subjects and its use in sleep-wake pathology*. Pharmacopsychiatry, 1987. **20**(5): p. 195-6.
367. Ota, S.M., et al., *Lithium prevents REM sleep deprivation-induced impairments on memory consolidation*. Sleep, 2013. **36**(11): p. 1677-84.
368. Szuba, M.P., et al., *Lithium sustains the acute antidepressant effects of sleep deprivation: preliminary findings from a controlled study*. Psychiatry Res, 1994. **51**(3): p. 283-95.