

ANTOINE HONE-BLANCHET

**MODULATION DE LA TRANSMISSION DOPAMINERGIQUE  
PAR LES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES ORPHELINS NURR1  
ET NUR77 : RÔLES DISTINCTS ET INTERACTIONS**

Mémoire présenté

à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de maîtrise en Neurobiologie  
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2012

© Antoine Hone-Blanchet, 2012

## RÉSUMÉ

Les récepteurs nucléaires orphelins Nurr1 et Nur77 sont des facteurs de transcription qui remplissent des fonctions différentes au sein des systèmes dopaminergiques adultes. Cela dit, ils sont tous deux impliqués dans les réponses comportementales imputables à ces systèmes. L'objectif de l'étude était de déterminer la possibilité d'une interaction fonctionnelle entre les deux récepteurs en comparant différentes souches de souris transgéniques. Nous avons observé que la suppression du gène Nur77 et la réduction partielle de Nurr1 mènent à l'expression d'un phénotype particulier chez les animaux Double Knockout (Nurr1 (+/-) ; Nur77 (-/-)) dans divers protocoles expérimentaux évaluant l'activité locomotrice en conditions basales ou sous l'influence d'agents pharmacologiques. Nous avons également mesuré les niveaux d'expression de certaines neuropeptides, l'enképhaline et la dynorphine, qui sont également modulés différemment chez les animaux Double Knockout dans un contexte de stimulation et de blocage des récepteurs dopaminergiques. Nos résultats suggèrent qu'une interaction fonctionnelle et dépendante du contexte entre Nurr1 et Nur77 existe.

## AVANT-PROPOS

En premier lieu, j'aimerais remercier le Dr. Claude Rouillard pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Cette expérience m'a permis d'acquérir des connaissances théoriques et pratiques dans un domaine scientifique qui me passionne. Merci pour votre confiance et vos conseils tout au long de la réalisation de ce projet. Votre constante disponibilité et votre expérience m'ont été très précieuses.

Merci aux assistantes de recherche, Joanie et Brigitte, qui m'ont patiemment appris les rudiments techniques de la recherche en laboratoire et qui m'ont épaulé dans les manipulations.

Merci à Céline, Marie-Pier et Alexandre, avec qui j'ai pu partager des échanges intéressants pour me guider vers la réussite de ce projet. Merci également à tous les étudiants et professionnels du centre de recherche du CHUL que j'ai pu côtoyer lors des deux dernières années. Votre compétence et votre attitude au travail étaient des plus stimulantes.

## Table des matières

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>II</b>
<b>AVANT-PROPOS</b> .....	<b>III</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>IV</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTE D'ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>VI</b>
<b>1.0 INTRODUCTION</b> .....	<b>2</b>
1.1 LA TRANSMISSION DOPAMINERGIQUE .....	2
1.1.1 <i>Synthèse et métabolisme de la dopamine</i> .....	2
1.1.2 <i>Les récepteurs dopaminergiques</i> .....	5
1.1.3 <i>Les voies signalétiques dopaminergiques</i> .....	6
1.1.4 <i>Les circuits dopaminergiques</i> .....	7
1.1.5 <i>Physiologie des ganglions de la base</i> .....	8
1.1.6 <i>Interactions entre les systèmes dopaminergiques et opioïdiques</i> .....	11
1.2 LES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES ORPHELINS.....	12
1.2.1 <i>Les récepteurs nucléaires</i> .....	13
1.2.2 <i>Les récepteurs nucléaires orphelins de la famille NR4A</i> .....	15
1.2.3 <i>Les rôles des Nurs en périphérie</i> .....	19
1.2.4 <i>Les récepteurs Nurs dans le système nerveux central</i> .....	23
1.3 LES OBJECTIFS DE L'ÉTUDE .....	31
<b>2.0 ARTICLE</b> .....	<b>34</b>
2.1 ABSTRACT .....	34
2.2 INTRODUCTION .....	36
2.3 MATERIALS AND METHODS.....	38
2.4 RESULTS .....	44
2.4.1 <i>Behavioral analyses</i> .....	44
2.4.2 <i>Biochemical analyses</i> .....	48
2.5 DISCUSSION .....	52
<b>3.0 DISCUSSION &amp; CONCLUSION</b> .....	<b>73</b>
3.1 ACTIVITÉ EXPLORATOIRE ET ACTIVITÉ LOCOMOTRICE SPONTANÉE .....	74
3.2 ACTIVITÉ LOCOMOTRICE INDUITE PAR L'AMPH .....	76
3.3 MODULATION DE L'EXPRESSION DES NEUROPEPTIDES ENK ET DYN APRÈS ADMINISTRATION D'AMPH .....	78
3.4 CATALEPSIE ET EXPRESSION DE L'ENK DANS LE STRIATUM APRÈS ADMINISTRATION D'UN ANTAGONISTE DOPAMINERGIQUE .....	80
3.5 CONCLUSION .....	81
<b>RÉFÉRENCES</b> .....	<b>82</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Mécanismes de synthèse et métabolisme de la dopamine	4
Figure 1.2 : La circuiterie des ganglions de la base	10
Figure 1.3 : Structure et organisation fonctionnelle des récepteurs nucléaires	15
Figure 1.4 : Mécanismes d'activité transcriptionnelle des NURS	18
Figure 1.5 : Effets des récepteurs nucléaires orphelins de la sous-famille NR4A	22
Figure 2.1 : Basal locomotor activity in an open field	58
Figure 2.2 : Basal locomotor activity in a wheel-running system	59
Figure 2.3 : Time course of AMPH-induced ambulatory activity	60
Figure 2.4 : AMPH-induced locomotor activity, vertical activity and non-ambulatory activity	61
Figure 2.5 : HAL-induced catalepsy	63
Figure 2.6 : Autoradiographic signal marking example	65
Figure 2.7 : AMPH-induced striatal ENK mRNA expression	66
Figure 2.8 : Autoradiographic signal marking example	67
Figure 2.9 : AMPH-induced DYN mRNA expression	68
Figure 2.10 : HAL-induced striatal ENK mRNA expression	70
Figure 2.11 : Autoradiographic signal marking example	71

## LISTE D'ABRÉVIATIONS

ADN:	Acide désoxyribonucléique
ADNc:	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPH:	Amphétamine
ARNm:	Acide ribonucléique messenger
AF-1:	Domaine d'activation de la transcription 1
AF-2:	Domaine d'activation de la transcription 2
AMPc:	Adénosine monophosphate cyclique
ATV:	Aire tegmentale ventrale
BDNF:	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
CA1:	Corne d'Ammon 1
CA2:	Corne d'Ammon 2
CA3:	Corne d'Ammon 3
CMH:	Complexe majeur d'histocompatibilité
COMT :	Catéchol-o-méthyltransférase
CREB :	Facteur de transcription CREB ( <i>Cyclic AMP response element-binding protein</i> )
CRH:	Hormone de libération de la corticotropine
DA:	Dopamine
DAT:	Transporteur de la dopamine ( <i>Dopamine transporter</i> )
DEPC :	Diéthyl pyrocarbonate
DBD:	Domaine de liaison à l'ADN ( <i>DNA-binding domain</i> )
DHA:	Acide docosahexaénoïque
DOPAC:	<i>3,4-dihydroxyphenylacetic acid</i>
DYN:	Dynorphine
ENK:	Enképhaline
ERK:	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
GABA:	Acide $\gamma$ -amino-butirique

GDNF :	<i>Glial cell-derived neurotrophic factor</i>
GPe:	Segment externe du globus pallidus
GPi:	Segment interne du globus pallidus
GR :	Récepteurs aux glucocorticoïdes
HAL :	Halopéridol
HPA:	Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien
HRE:	Élément de réponse aux hormones ( <i>Hormone Response Elements</i> )
HVA:	<i>3-methoxy-4-hydroxyphenylacetic (Homovanillic acid)</i>
KO:	<i>Knock out</i>
L-AADC:	Décarboxylase des acides amines aromatiques ( <i>L-aromatic amino acid decarboxylase</i> )
LDB:	Domaine de liaison du ligand ( <i>Ligand-binding domain</i> )
LIMK1 :	protéine kinase LIM de domaine 1
L-DOPA:	L-dihydroxy-phénylalanine
LPS:	Lipopolysaccharide
MAO :	Monoamine oxydase
NBRE:	<i>NGFI-B response element</i>
NurRE:	<i>Nur-responsive element</i>
NT:	Neurotensine
PFA :	Paraformaldéhyde
PKA:	Protéine kinase A
PKB:	Protéine kinase B
PKC:	Protéine kinase C
POMC:	Pro-opiomélanocortine
RSK:	Protéine kinase ribosomale S6
RXR:	Récepteur à l'acide rétinoïque
SN:	Substance noire
SNpc:	Substance noire pars compacta

SNpr:	Substance noire pars réticula
STDM:	Striatum dorsomédial
STDL:	Striatum dorsolatéral
STN:	Noyau sous-thalamique
STVM:	Striatum ventromédial
STVL:	Striatum ventrolatéral
TH:	Tyrosine hydroxylase
VMAT2:	Transporteur vésiculaire de type 2 des monoamines ( <i>Vesicular monoamine transporter 2</i> )
5-HT:	Sérotonine
6-OHDA:	6-hydroxy-dopamine



CHAPITRE 1  
INTRODUCTION

## **1.0 Introduction**

### **1.1 La transmission dopaminergique**

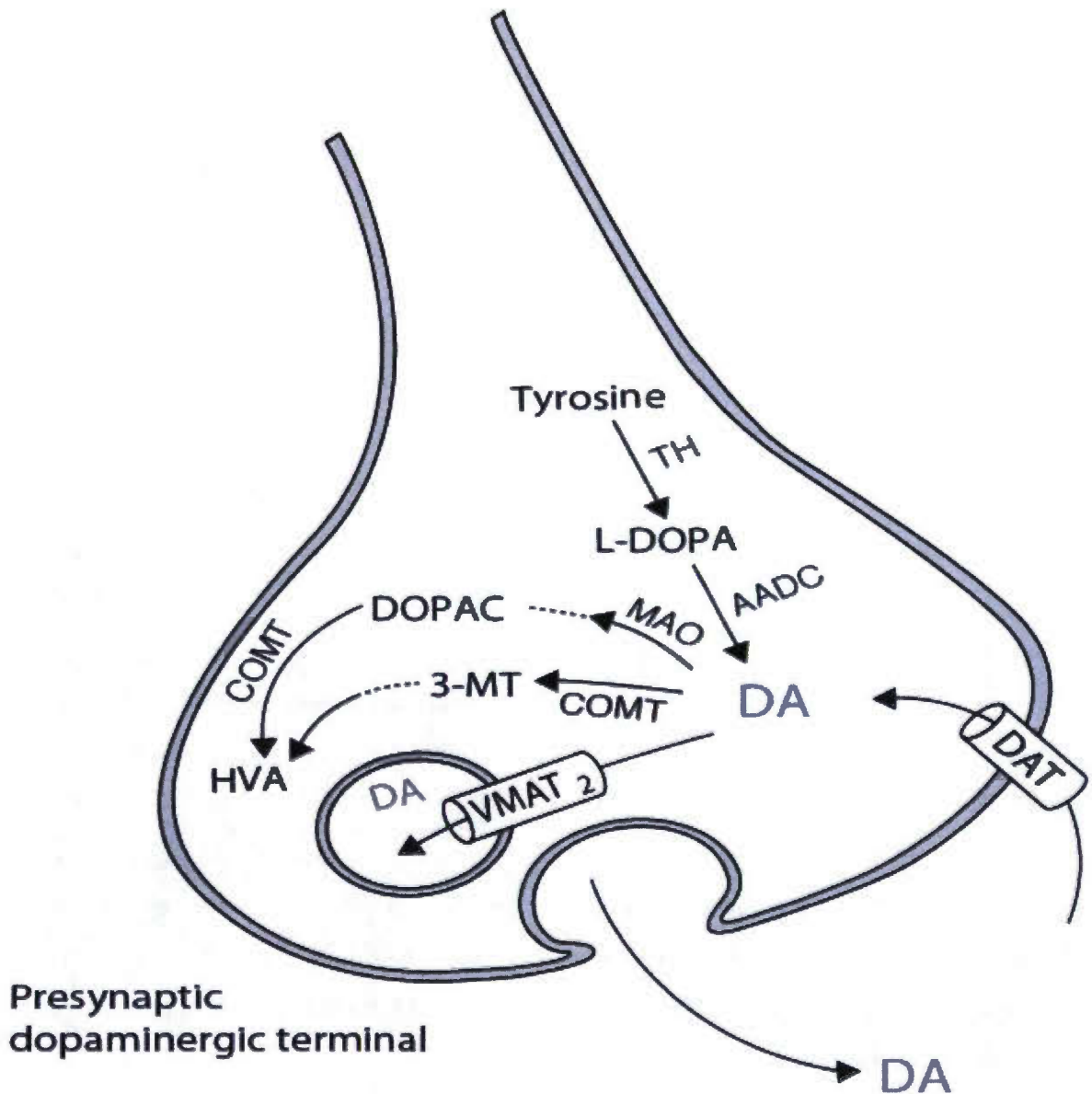
La dopamine est un neurotransmetteur de la famille des catécholamines, une amine biogénique et une hormone pituitaire. La dopamine est un des principaux neurotransmetteurs du cerveau humain (elle représente environ 80% des catécholamines) et participe de façon critique dans certains circuits spécifiques du mésencéphale (Vallone et al., 2000). Elle est également un intermédiaire dans la synthèse d'autres neurotransmetteurs tels que la noradrénaline et l'adrénaline. Elle est reconnue comme un neurotransmetteur/neuromédiateur depuis 1952. En comparaison à d'autres neurotransmetteurs du système nerveux central, son rôle est plus difficile à cerner étant donné qu'elle n'a pas de d'effet excitateur ou inhibiteur bien déterminé. Ce neurotransmetteur est impliqué dans une multitude de fonctions importantes. Les circuits dopaminergiques, décrits ultérieurement, sont particulièrement importants au niveau du contrôle moteur, de l'apprentissage et de la mémoire de travail, de la motivation, des processus de plaisir et de récompense et autres processus émotionnels et cognitifs.

#### **1.1.1 Synthèse et métabolisme de la dopamine**

La dopamine est synthétisée à partir de la tyrosine, suivant deux étapes impliquant des enzymes spécifiques. Premièrement, la tyrosine acheminée aux terminaisons nerveuses des neurones dopaminergiques est convertie en L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) par l'enzyme tyrosine hydroxylase (TH), dont l'activation est dépendante de la phosphorylation de son domaine par des protéines kinase. L'hydroxylation de la tyrosine est régulée par l'activation d'autorécepteurs et la compétition intra neuronale pour la liaison à la TH. Cette étape est ainsi qualifiée de limitante, malgré l'apport continu de tyrosine au cerveau. En second lieu, la L-DOPA est décarboxylée en dopamine par une autre enzyme présente dans le cytosol, la dopa-décarboxylase des acides aminés (AADC). La dopamine est ensuite stockée dans des vésicules spécialisées présentes dans le cytoplasme (Elsworth, 1997). Ces

vésicules contiennent une unité de transport vésiculaire monoamine (VMAT2) qui effectue le stockage de la dopamine. Ainsi, VMAT2 permet la diminution de la concentration intracellulaire de dopamine libre, ce qui prévient son inactivation enzymatique. Suivant la propagation d'un potentiel d'action le long du neurone dopaminergique, le changement du potentiel membranaire permet l'entrée d'ions calcium. Ces ions, en plus de stimuler l'hydroxylation de la tyrosine, sont essentiels dans la fusion des vésicules avec la membrane présynaptique. La dopamine est ensuite relâchée par exocytose dans la fente synaptique (pour revue, Samadi et al., 2007).

Toujours au niveau présynaptique, la dopamine inutilisée est récupérée par le transporteur à haute affinité spécifique pour la dopamine (DAT). Le DAT, dont le fonctionnement dépend des concentrations d'ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Na}^+$ , permet la recapture et la réutilisation ultérieure de la dopamine. Il remplit ainsi le rôle de régulateur du signal dopaminergique au sein de la synapse, en limitant la durée et l'amplitude du signal neurochimique (Mortensen and Amara, 2003). La dopamine qui ne sera pas réutilisée sera métabolisée par l'une des multiples enzymes cytoplasmiques présentes. Les deux plus importantes chez les mammifères sont la monoamine oxydase (MAO) et la catéchol O-méthyltransférase (COMT) (Elsworth, 1997). MAO-A, un sous-type de MAO présent sur la membrane externe mitochondriale, convertit les catécholamines en DOPAC (acide dihydroxyphenylacétique), qui sera métabolisé à son tour. COMT, une enzyme non spécifique extraneuronale, convertit la dopamine en acide homovanillique (HVA). Elle est davantage présente au niveau post-synaptique par rapport aux neurones dopaminergiques et dans les cellules gliales du système nerveux central (Eisenhofer, 2004; pour revue, Samadi et al., 2007) (Figure 1.1).



### Presynaptic dopaminergic terminal

**Figure 1.1 : Mécanismes de synthèse et de métabolisation de la dopamine.** La tyrosine acheminée aux boutons terminaux des neurones dopaminergiques est transformée en L-DOPA par l'enzyme TH, puis en DA par l'AADC. Le VMAT permet ensuite le stockage de la DA dans des vésicules qui se fusionneront avec la membrane présynaptique suivant le potentiel d'action. Le DAT agit comme régulateur de la transmission en limitant la diffusion de la DA dans la fente synaptique. Les enzymes MAO et COMT sont les principaux agents métaboliques des systèmes dopaminergiques et dégradent la DA en HVA (tiré de Samadi et al., 2007).

### 1.1.2 Les récepteurs dopaminergiques

La dopamine relâchée dans la fente synaptique va se lier à des récepteurs membranaires métabotropiques, couplés à une protéine G (Vallone et al., 2000). Jusqu'à présent, cinq types de récepteurs dopaminergiques ont été identifiés et ceux-ci peuvent être regroupés en deux familles ; la famille des récepteurs D<sub>1</sub> comprenant les récepteurs D<sub>1</sub> et D<sub>5</sub> et la famille des récepteurs D<sub>2</sub> comprenant les récepteurs D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> et D<sub>4</sub>. Cette subdivision est faite en fonction de leurs caractéristiques pharmacologiques. Les ligands dopaminergiques peuvent aisément discriminer les deux familles de récepteurs, par contre il leur est plus difficile de différencier les différents récepteurs appartenant à la même famille. Ainsi, un antagoniste D<sub>1</sub> tel que SCH-23390 a une affinité assez semblable aux récepteurs D<sub>5</sub> (Vallone et al., 2000). Par contre, il aura une affinité très faible pour les récepteurs de la famille D<sub>2</sub>. Il existe deux types de récepteurs D<sub>2</sub> ; D<sub>2-cour</sub>t (« D<sub>2-short</sub> » aussi appelé D<sub>2s</sub>) et D<sub>2-long</sub> (aussi appelé D<sub>2L</sub>), ce dernier possédant une chaîne de 29 acides aminés en plus dans sa structure. Les récepteurs D<sub>1</sub> sont exclusivement postsynaptiques alors que des récepteurs D<sub>2</sub> sont également présents en position pré-synaptique au niveau des fibres dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale et de la substance noire et en position postsynaptique au niveau des structures cibles des différents systèmes DAergiques (Vallone et al., 2000; pour revue, Samadi et al., 2007).

Le récepteur D<sub>2</sub> présynaptique est également appelé autorécepteur. Ce dernier permet de transmettre un message rétroactif au soma à partir des terminaisons situées sur dendrites des neurones dopaminergiques (Schmitz and Marand, 2003). L'activation de ces récepteurs inhibe temporairement le rythme de décharge du neurone présynaptique, via la modulation de la perméabilité des canaux calciques. Cette auto-inhibition permet de moduler le signal dopaminergique envoyé, en termes d'amplitude et de durée. Il est également reconnu que l'autorécepteur peut influencer de façon importante la synthèse même de la dopamine, en agissant sur la TH (Schmitz and Marand, 2003). Ainsi, l'auto-inhibition du neurone dopaminergique par les autorécepteurs se ferait en deux temps ; lors de la relâche de dopamine dans la synapse et à plus long terme, au niveau de la synthèse du neurotransmetteur (Schmitz and Marand, 2003).

### 1.1.3 Les voies signalétiques dopaminergiques

L'activation de récepteurs métabotropiques engendre une modification structurale du récepteur, principalement par la dissociation d'une sous-unité  $\alpha$  de la protéine G ( pour revue, Missale et al., 1998). Ainsi, la liaison de la dopamine aux récepteurs dopaminergiques active plusieurs voies signalétiques différentes au niveau intracellulaire postsynaptique. Les deux voies les mieux connues sont celles de l'adénylate cyclase (AMP cyclique ; AMPc) et des canaux calciques et potassiques ( $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^{+}$ ) ( pour revue, Vallone et al., 2000; Surmeier et al., 2010).

La stimulation des récepteurs  $D_1$  augmente la formation d'AMPc, un second messenger particulièrement impliqué dans l'activation de protéines kinase telles que la protéine kinase A (PKA). Cette dernière peut alors agir par phosphorylation sur diverses protéines cytoplasmiques qui moduleront certaines propriétés inhérentes au fonctionnement neuronal telle que la perméabilité membranaire ionique. De façon inverse, la stimulation des récepteurs  $D_2$  inhibe la formation d'AMPc (Vallone et al., 2000).

L'activation des récepteurs dopaminergiques est également liée à des modifications dans les courants calciques, déterminés par les canaux ioniques dépendants du voltage. Ainsi, l'activation de récepteurs  $D_1$  augmente les courants calciques de type L, ce qui augmente l'activité des récepteurs NMDA, des récepteurs ionotropiques non spécifiques (Surmeier et al., 2010). Au niveau des récepteurs  $D_2$ , leur activation régularise les courants potassiques sortant dans plusieurs types de neurones. De plus, leur activation mène à la réduction de l'activité des canaux calciques de type N. Il est intéressant de constater que cette modulation négative de l'apport intracellulaire en calcium vient directement limiter la synthèse de dopamine, le calcium étant important dans l'hydroxylation de la tyrosine. Les récepteurs  $D_2$  postsynaptiques exercent véritablement un contrôle significatif sur la neurotransmission dopaminergique subséquente (Vallone et al., 2000; Surmeier et al., 2010). Globalement, l'effet de la stimulation des récepteurs de la famille  $D_1$  est excitateur alors qu'elle est inhibitrice pour la famille des récepteurs  $D_2$ -like.

### 1.1.4 Les circuits dopaminergiques

Les neurones dopaminergiques du système nerveux central sont principalement présents dans le mésencéphale et le diencephale. Au niveau du mésencéphale, les projections dopaminergiques ont pour origine la substance noire (A9, selon la terminologie de Dalström & Fuxe), l'aire tegmentale ventrale (A10) et l'aire rétrobulbaire (A10). Ces projections innervent différentes cibles et forment ainsi trois circuits dopaminergiques mésencéphaliques définis. La voie nigrostriée origine de la substance noire pour atteindre le striatum (noyau caudé et putamen), l'une des structures principales des ganglions de la base. Cette voie est ainsi grandement impliquée dans le contrôle du comportement moteur (pour revue, Anderson, 2008). La dopamine relâchée dans le striatum permet la modulation de l'activité des voies striatopallidales directes et indirectes. Une lésion du circuit nigrostrié ou la dégénérescence de celui-ci mène à des symptômes hypokinétiques caractéristiques de la maladie de Parkinson.

La voie mésolimbique origine de l'aire tegmentale ventrale pour atteindre les aires limbiques (noyau accumbens, amygdale, septum). Ainsi, elle participe à la régulation des comportements dirigés vers un but, de la motivation de l'individu et du système de récompense. Ce circuit est particulièrement vulnérable à l'action d'agents pharmacologiques et de drogues d'abus telles que les psychostimulants. De ce fait, il est principalement impliqué dans le développement de la dépendance aux drogues. Ce circuit est également impliqué dans l'étiologie de la schizophrénie, la médication antipsychotique ciblant les neurones dopaminergiques mésolimbiques (Stahl, 2005). La voie mésocorticale origine de l'aire tegmentale ventrale pour atteindre différentes régions du cortex limbique et préfrontal. Ainsi, cette voie est impliquée dans les processus attentionnels et la mémoire de travail. En termes psychopathologiques, la voie mésocorticale est impliquée dans les symptômes cognitifs de la schizophrénie et dans le trouble déficitaire d'attention et hyperactivité (TDAH).

Au niveau du diencephale, les neurones dopaminergiques de l'hypothalamus dorsal et du thalamus central (A11) projettent vers la moelle épinière. Ils sont impliqués dans

l'intégration sensorielle et nociceptive. D'autres modestes populations de neurones dopaminergiques sont présentes dans la zona incerta (A13) et l'aire A14-15, mais leurs rôles sont moins connus. Finalement, la voie tubéroinfundibulaire origine du noyau arqué de l'hypothalamus (A12) et projette vers la glande pituitaire. Ainsi, le rôle de ces neurones est davantage axé sur la régulation hormonale (la prolactine, par exemple), caractéristique de l'hypothalamus ( pour revue, Samadi et al., 2007; Bolam et al., 2008; Anderson, 2008; Grace et al., 2008).

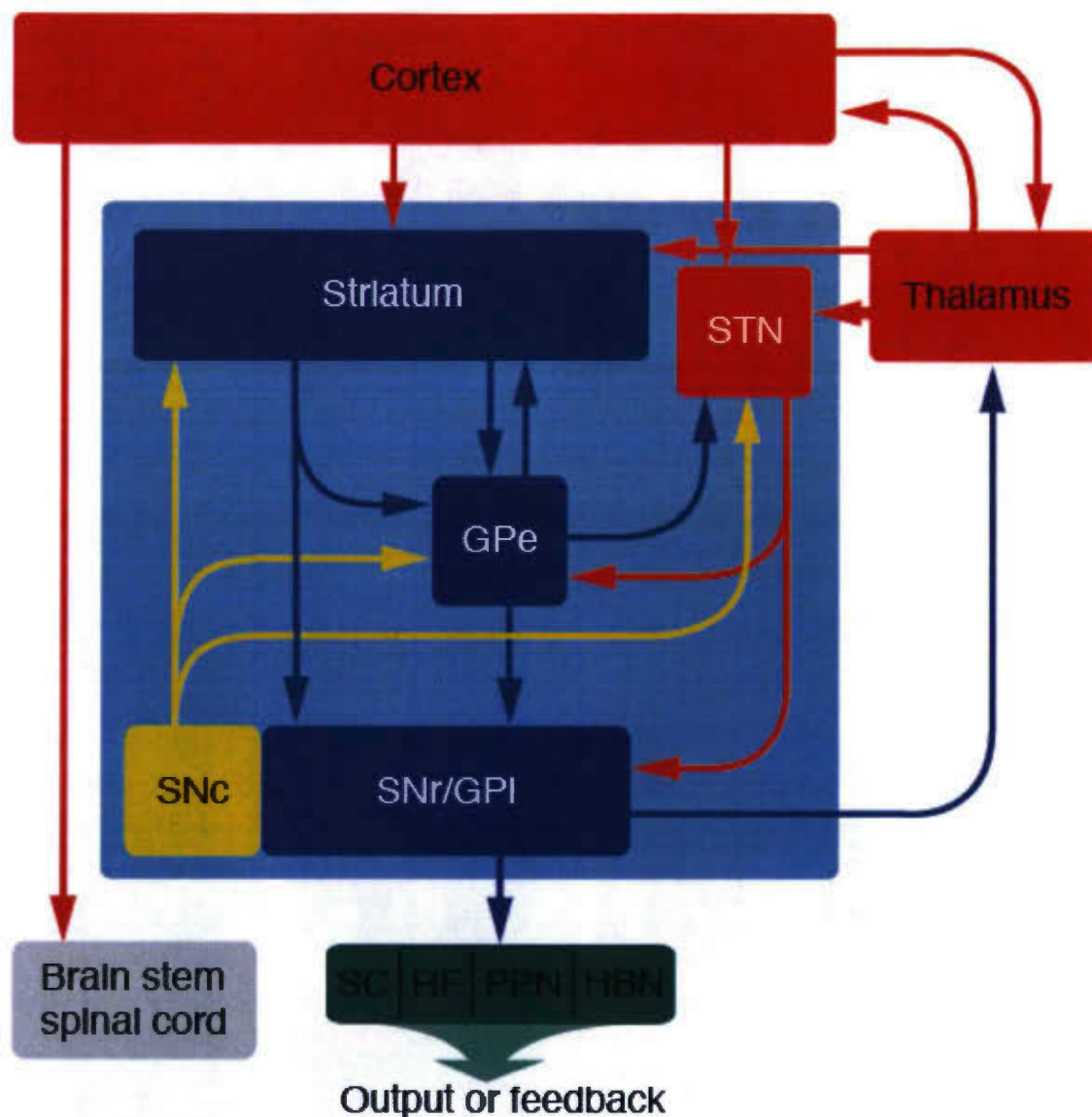
### **1.1.5 Physiologie des ganglions de la base**

Les ganglions de la base sont un circuit de noyaux sous corticaux dans lequel la dopamine vient jouer un rôle prépondérant. Au niveau dorsal, ils sont principalement formés du striatum, des segments interne et externe du globus pallidus (GPi/GPe), du noyau sous thalamique (STN) et de la substance noire, parties compacte (SNc) et réticulée (SNr). La partie ventrale des ganglions de la base est constituée du striatum ventral (le noyau accumbens), de la partie ventrale du globus pallidus et de l'aire tegmentale ventrale (ATV). Les ganglions de la base sont ainsi impliqués de façon explicite dans un large éventail de fonctions cognitives, motrices et mnésiques, sans oublier les fonctions limbiques assurées davantage par la partie ventrale du circuit. Environ 99% des neurones des ganglions de la base utilisent l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) comme neurotransmetteurs ; les seules exceptions étant les neurones du STN qui sont glutamatergiques et les neurones de la SNc et de l'ATV qui sont dopaminergiques. Les afférences des ganglions de la base proviennent du cortex et du thalamus ; elles sont glutamatergiques et ciblent le striatum et le STN. Leurs efférences sont le complexe SNr/GPi et le thalamus ( pour revue, Samadi et al., 2007; Bolam et al., 2008) (Figure 1.2).

Le complexe striatal est particulièrement important, étant donné son implication dans la transmission dopaminergique. Il est constitué de près de 97% de neurones épineux moyens qui utilisent le GABA comme neurotransmetteur. Ces neurones sont divisés en deux populations selon leurs propriétés neurochimiques et leurs projections respectives. Le premier groupe projette vers le complexe SNr/GPi, ce qui constitue la voie striatonigrale,



ou voie directe. Ces neurones expriment les récepteurs dopaminergiques D1 en plus de la dynorphine et de la substance P, des neuropeptides endogènes dont il sera question plus loin. La deuxième population de neurones striataux projette exclusivement vers le GPe. Ces neurones, qui forment ainsi la voie striatopallidale ou indirecte, expriment les récepteurs D2, les enképhalines et la neurotensine ( pour revue, Samadi et al., 2007). Il est important de noter que peu importe la voie directe ou indirecte, les neurones épineux moyens du striatum sont la cible principale des neurones dopaminergiques de la SNc. Ainsi, la dopamine relâchée par les neurones de la SNc exerce un contrôle modulateur indirect sur les influences excitatrices du cortex et du thalamus, ce qui souligne l'importance des systèmes dopaminergiques dans toutes les fonctions assurées par les ganglions de la base ( pour revue, Samadi et al., 2007; Bolam et al., 2008).



**Figure 1.2 : La circuiterie des ganglions de la base.** Les structures incluses dans la boîte bleutée sont les principaux noyaux des ganglions de la base, soit le striatum, le noyau sous-thalamique (STN), le globus pallidus externe (GPe), la substance noire compacte (SNc) et le complexe substance noire réticulée/globus pallidus interne (SNr/GPi). Les voies dopaminergiques sont représentées par les flèches jaunes et ont pour origine la SNc et l'ATV (absente de la figure). La voie nigrostriée, dont il est principalement question dans cette étude, relie la SNc et le striatum. Les voies directe (striato-nigrale) et indirecte (striato-pallidale), qui sont les voies de sorties du striatum, prennent leur origine au niveau du striatum et touchent respectivement le complexe SNr/GPi et le GPe en utilisant le GABA comme neurotransmetteur. Le cortex et le thalamus sont les principales entrées des ganglions de la base, les voies dopaminergiques jouant ainsi le rôle de modulateur du flux d'information thalamique et corticale (tiré de Bolam et al., 2008).

### 1.1.6 Interactions entre les systèmes dopaminergiques et opioïdiques

Dans la physiologie des ganglions de la base, l'interaction entre la transmission dopaminergique et les neuropeptides est d'une importance capitale. Les neuropeptides entrent dans une classe de messagers actifs largement présents dans le système nerveux central et périphérique (Kieffer, 2008; Bergquist and Ludwig, 2008). Plus de 100 neuropeptides sont connus à ce jour, ayant tous des propriétés particulières. Ces peptides sont stockés sous forme de précurseurs dans des vésicules plus larges que celles employés par les neurotransmetteurs conventionnels. Ces vésicules ne sont présentes qu'au niveau du cytoplasme et non pas dans l'axone et les terminaisons axonales. Les précurseurs sont convertis en peptides par diverses enzymes et relâchés par exocytose. Cette fusion de la vésicule et de la membrane plasmique est provoquée par l'augmentation de la concentration cytoplasmique présynaptique de calcium. Une stimulation à haute fréquence est essentielle pour la relâche des neuropeptides. Ainsi plusieurs dépolarisations du neurone sont nécessaires pour accumuler suffisamment de calcium intracellulaire et activer l'exocytose. Les peptides relâchés seront éventuellement détruits par des peptidases extracellulaires, dans un délai plus long que l'inactivation ou la recapture d'un neurotransmetteur. L'action des neuropeptides est donc plus lente et plus complexe à initier comme à terminer ( pour revue, Samadi et al., 2007; Kieffer, 2008; Bergquist and Ludwig, 2008).

Les enképhalines (ENK) sont des neuropeptides qui agissent avec les récepteurs mu- et delta-opioïdes, présents dans le striatum et le cortex. Les neurones dopaminergiques établissent des connections directes avec les neurones enképhalinerigiques du striatum qui expriment également les récepteurs dopaminergiques D2. La dynorphine (DYN), un autre neuropeptide, est co-localisée dans les neurones striataux qui expriment les récepteurs D1 et agit avec les récepteurs kappa-opioïdes. Encore une fois, les neurones dopaminergiques projettent directement vers cette population de neurones striataux. Ainsi, la dopamine relâchée active les récepteurs D1 et D2, ce qui influence la synthèse de neuropeptides différents selon la voie empruntée. Ces peptides interagissent à leur tour avec leurs récepteurs respectifs et modifient les propriétés cellulaires des neurones postsynaptiques

(Angulo, 1994). Les deux voies de sortie du striatum utilisent le GABA comme neurotransmetteur, mais ce sont leurs neuropeptides respectifs qui les différencient et qui déterminent l'équilibre neurochimique des ganglions de la base. Ainsi, la dopamine permet la régulation de cet équilibre dans deux sens opposés ; la déplétion en dopamine mène à une diminution dans l'expression de la DYN et une augmentation dans l'expression de l'ENK (pour revue, Samadi et al., 2007). Cette réponse exacerbée dépendante de la dopamine souligne l'interaction entre les systèmes dopaminergiques et opioïdiques au sein des ganglions de la base (Samadi et al., 2007; Kieffer, 2008).

## 1.2 Les récepteurs nucléaires orphelins

Les récepteurs nucléaires sont définis comme étant des récepteurs localisés au noyau et non sur la membrane cellulaire. Ils sont des facteurs de transcription activés par un ligand et leur activité peut être initiée par des signaux physiologiques, environnementaux et développementaux. Ces facteurs de transcription ciblent plusieurs gènes via certaines molécules lipophiles tels que les hormones et les acides gras (Bourguet and Germain, 2000). Les récepteurs nucléaires se lient à des séquences d'ADN spécifiques de régions régulatrices de divers gènes et modulent la transcription en réponse à la liaison à un ligand (Francis et al., 2003; Gronemeyer et al., 2004; Sladek, 2010). Ainsi, ils régularisent les propriétés intrinsèques et extrinsèques des cellules du système nerveux central (Benoit et al., 2004; Markov and Laudet, 2011). En fait, les récepteurs nucléaires sont parmi les seuls facteurs de transcription capables d'effectuer un lien direct entre les contraintes métaboliques de l'environnement et la régulation génique. Cela dit, certains de ces récepteurs n'ont pas encore de ligand identifié ou ont une conformation qui élimine la possibilité de lier un ligand ; ces récepteurs nucléaires sont dits orphelins (pour revue, Lévesque and Rouillard, 2007).

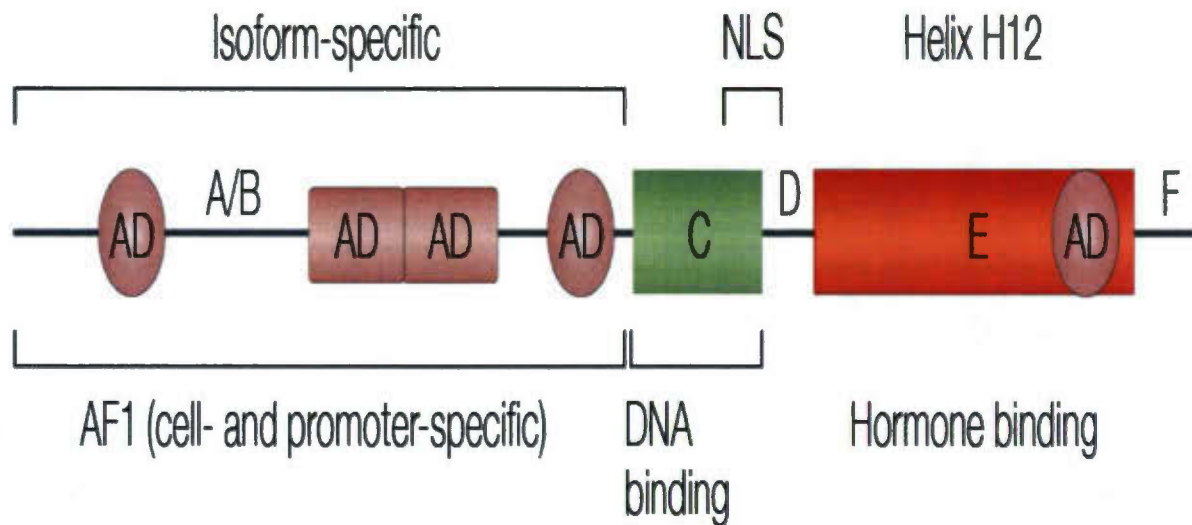
### 1.2.1 Les récepteurs nucléaires

Classiquement, les récepteurs nucléaires sont constitués de quatre parties spécifiques. Les deux plus évidentes sont le domaine de liaison à l'ADN (DBD) et le domaine de liaison à un ligand (LBD). Alors que le DBD reste relativement semblable d'un récepteur à l'autre, le LBD varie considérablement selon le type de récepteur et peut être classifié selon trois groupes. Dans le premier groupe, il peut être activé par un ligand hydrophobe tel que les stéroïdes, rétinoïdes et acides gras. Dans le second groupe, il peut être indépendant de tout ligand et ainsi être constitutionnellement activé. Son activité transcriptionnelle est ainsi liée à son état constamment actif. Finalement, dans le troisième groupe, il peut être impossible structurellement au LBD d'interagir avec un coactivateur ; le récepteur fonctionne alors uniquement à titre de répresseur (pour revue, Bridgham et al., 2010). Au niveau du LBD se situe une troisième région critique dans l'activation de l'activité transcriptionnelle, la 'fonction activatrice' AF-2 (Figure 1.3; Gronemeyer et al. 2004). Son activation est déterminée par le recrutement de protéines secondaires qui agissent à titre de coactivateur ou de corépresseur. Ainsi, ces protéines permettent la promotion ou la répression de la transcription d'ADN par le récepteur. La liaison d'un coactivateur permettra l'activation du récepteur, par l'activation de l'hélice AF-2 situé au niveau du terminal C (Benoit et al., 2004). Au niveau du terminal N du récepteur se situe la quatrième composante principale de sa structure : le domaine AF-1. Il s'agit, au même titre que AF-2, d'une 'fonction activatrice' du récepteur à l'exception que son activité transcriptionnelle est indépendante de la liaison à un cofacteur. Son activation n'influence pas la liaison d'un ligand sur le LBD et participe à la fonction constitutionnelle du récepteur nucléaire.

Le LBD est formé de 11 hélices, alors que son entrée est gardée par une douzième (H12). L'orientation de cette hélice est déterminée par les propriétés chimiques du ligand en approche. Sans ligand, ou dans le cas d'un ligand antagoniste, le LBD a une plus grande affinité à lier un corépresseur tels que NcoR et SMRT sur ses hélices H3 et H4. Ceci permet la création d'un complexe corépresseur qui inhibe l'activité transcriptionnelle. En effet, le recrutement de déacétylase d'histone favorise la condensation de chromatine au-

dessus du promoteur du gène ciblé, ce qui résulte en la répression de ce gène (Bourguet and Germain, 2000; Francis et al., 2003; Gronemeyer et al., 2004). Par ailleurs, la liaison à un agoniste induit un changement conformationnel du récepteur qui se traduit par la dissociation du complexe corépresseur et le recrutement d'un complexe coactivateur formé d'acétyltransférase d'histone (HAT) et d'un complexe de remodelisation de la chromatine (CRM) (Francis et al., 2003; Gronemeyer et al., 2004). Ce complexe coactivateur permet l'acétylation de l'histone, ce qui induit la décondensation de la chromatine et prépare le promoteur pour la transactivation (Bourguet and Germain, 2000). L'initiation de la transcription prend place dans la région régulatrice des gènes alors que le récepteur se lie à un élément de réponse aux hormones (*Hormones Response Element*, HRE). Cet élément est une séquence génomique précise qui reconnaît le DBD du récepteur. Le modèle de dimérisation du récepteur déterminera le HRE qui sera ciblé pour la transcription. En fait, les récepteurs nucléaires peuvent agir à titre de monomères, d'homodimères et d'hétérodimères avec le récepteur rétinoloïde X (RXR), toutes des configurations requérant un type de site de liaison à l'ADN différent. (Khorasanizadeh, 2001). Étant donnée la vaste gamme de configurations possibles, il est possible pour un seul récepteur nucléaire de régulariser la transcription de plusieurs gènes différents et ainsi de moduler différentes fonctions cellulaires.

Il est également important de mentionner la phosphorylation des récepteurs nucléaires en tant qu'un des modulateurs principaux de leur activité. Les domaines LBD, DBD et AF1 sont la cible de protéines kinases telles que Akt, MAPK, PKA, PKC et C-Jun N-Terminal kinase qui permettent la phosphorylation du récepteur (Rochette-Egly, 2003). Ceci permet la facilitation du recrutement d'un complexe coactivateur ou, à l'inverse, la dissociation du lien avec l'ADN et la terminaison du signal transcriptionnel. Ainsi, la phosphorylation du récepteur est une voie signalétique en soit qui influence son activité transcriptionnelle, indépendamment de la liaison à un ligand (Rochette-Egly, 2003).



**Figure 1.3 : Structure et organisation fonctionnelle des récepteurs nucléaires.** Le domaine AF1 est la fonction activatrice du récepteur et le domaine d'activation transcriptionnelle indépendante de la liaison à un ligand. Le domaine C est responsable de la liaison au brin d'ADN alors que le domaine E est orienté vers la liaison à un ligand. Ces deux derniers domaines sont communs à tous les récepteurs nucléaires, alors que les régions AF1, A/B, D et F sont plutôt variables (d'après Gronemeyer et al., 2004).

### 1.2.2 Les récepteurs nucléaires orphelins de la famille NR4A

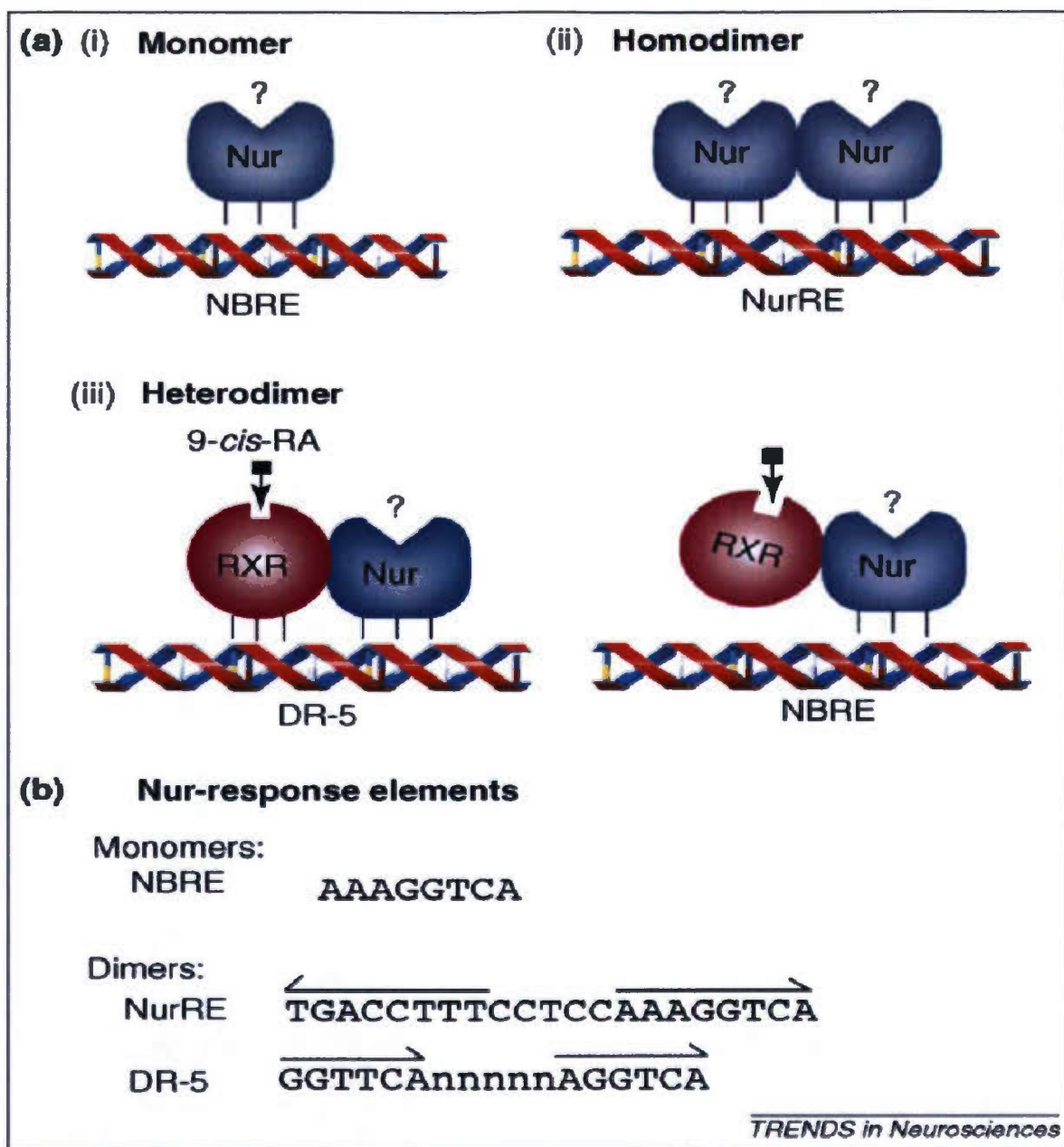
La famille NR4A, également appelée famille des Nurs, comprend les récepteurs nucléaires orphelins NR4A1 (Nur77), NR4A2 (Nurr1) et NR4A3 (Nor-1). En tant que récepteurs nucléaires orphelins, ils n'ont pas de domaine hydrophobe qui permet la liaison à un ligand (Maira et al., 1999). De ce fait, les Nurs peuvent être constitutionnellement activés, c'est-à-dire qu'ils peuvent être directement actifs en tant que médiateurs signalétiques et que contrairement à la pharmacologie traditionnelle, cette activation ne requiert pas la liaison d'un ligand sur le récepteur (Benoit et al., 2004). Les protéines kinases A et C, MAPK, la calcium-calcineurine et le facteur nucléaire kappa B (NF- $\kappa$ B) sont tous des voies de régulation des Nurs (Le and Chen, 2010). Les récepteurs Nurs sont structurellement semblables aux autres récepteurs nucléaires au niveau du DBD. Cela dit, la structure de leur terminal N et de leur domaine LBD diffère considérablement des autres récepteurs (Wansa et al., 2002). Le domaine de transactivation AF-1 est également très différent d'un Nur à l'autre ; le degré d'homologie entre Nurr1, Nur77 et Nor-1 étant de seulement 25% (Hui-Chen Hsu, 2004). Les Nurs peuvent se lier à l'ADN comme monomères ou homodimères à l'aide de l'élément de réponse NBRE (NGFI-B *responsive element*, NBRE) et de l'élément de réponse des Nurs (*Nur-responsive element*, NurRE) respectivement (pour revue, Lévesque and Rouillard, 2007).

Certaines particularités structurales permettent la différenciation des membres de la famille des Nurs. En ce qui a trait à Nur77, son LBD contient des signaux d'exportation nucléaire, qui permettent l'exportation de la protéine du noyau au cytoplasme. Le LBD de Nur77 et Nor-1 comprend une surface hydrophile, contrairement à la vaste majorité des récepteurs nucléaires (Maxwell and Muscat, 2006). Le LBD de Nurr1 est différent, alors qu'il est obstrué par des débris hydrophobes. Il adopte spontanément la forme d'un LBD conventionnellement activé par un ligand. Son domaine AF-2 permet donc constamment le recrutement de coactivateurs (Maxwell and Muscat, 2006). Le manque d'un site classique pour la liaison d'un coactivateur est une propriété générale des Nurs. En plus, Nur77 et Nurr1 peuvent former un hétérodimère avec d'autres récepteurs nucléaires hormonaux, tel RXR, qui peuvent lier des ligands hormonaux (Hui-Chen Hsu, 2004; Maxwell and Muscat, 2006; Le and Chen, 2010). Dans ce cas, ils agissent en tant que partenaires silencieux et peuvent lier le complexe hétérodimère au NBRE, ou se lier au DR-5, le site de réponse des



rétinoïdes ( pour revue, Lévesque and Rouillard, 2007) (Figure 1.4).

En plus d'être des facteurs de transcription, ils sont des gènes à réponse rapide (*Immediate early genes*, IEG) qui sont activés rapidement suite à un stimulus cellulaire dont la nature peut être variée. En fait, la perception de changements dans l'environnement cellulaire et la réponse rapide à ces changements représentent le créneau des membres de cette sous famille (pour revue, Lévesque and Rouillard, 2007). Ainsi, ils sont sollicités dans une panoplie de contextes physiologiques différents, au niveau du système nerveux central comme en périphérie.



**Figure 1.4 : Mécanismes d'activité transcriptionnelle des Nurs.** (a) Les récepteurs nucléaires de la famille NR4A peuvent agir en tant que i) monomères ii) homodimère et iii) hétérodimères avec un autre récepteur tel que RXR. Dans un tel cas, le complexe hétérodimérique peut se lier au site habituel (NBRE ; *Nur Binding Responsive Element*) ou sur le site DR-5. (b) Séquences d'ADN ciblées par les différentes formes de liaison des récepteurs nucléaires de la famille des Nurs. L'élément de réponse NurRE correspond à 2 répétitions inversées de la séquence NBRE tandis que l'élément de réponse DR5 spécifique aux rétinoïdes comprend 2 répétitions directes séparées par 5 nucléotides (tiré de Lévesque and Rouillard, 2007).

### 1.2.3 Les rôles des Nurs en périphérie

Les membres de la famille des Nurs répondent à de multiples stimuli d'origines diverses. Ainsi, ils sont induits par le stress, les prostaglandines, les facteurs de croissance, les hormones peptidiques, les neurotransmetteurs et les changements calciques. Ils répondent également à des stimuli de nature physique tels que les champs magnétiques et les dépolarisations membranaires (pour revue, Maxwell and Muscat, 2006) .

Nur77 est exprimé dans les glandes surrénales, thyroïdes et pituitaires, dans les poumons, le thymus, les muscles, la prostate et le foie. Nurr1 est présent dans le foie, le thymus les ostéoblastes et la glande pituitaire. Nor-1, finalement, est présent dans la glande pituitaire, de façon plus modeste, dans les glandes surrénales, le cœur, la musculature squelettique, le thymus et les reins (Giguere, 1999). Ainsi, leurs distributions anatomiques au sein du système périphérique se chevauchent mutuellement.

En lien avec ces différentes localisations, les récepteurs Nurs sont impliqués dans plusieurs contextes organiques dont l'inflammation et la stéroïdogénèse. Ainsi, au sein de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HHS), Nur77 active l'expression de l'hormone CRH (*Corticotropin releasing hormone*) dont la sécrétion est responsable de l'activation de l'axe. Les Nurs sont également responsables de l'expression de POMC, le précurseur de l'hormone adrénocorticotropique (ACTH) suite à l'expression de l'hormone corticolibérine (CRH). La CRH est une partie intégrante de la cascade inflammatoire alors qu'elle est surexprimée en réponse aux cytokines inflammatoires telles que TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  (Maxwell and Muscat, 2006). Ces cytokines stimulent rapidement l'induction de Nur77 et, dans un contexte de stimulation des lipopolysaccharides, les trois membres des Nurs sont rapidement induits dans les macrophages. Divers éléments de la réponse inflammatoire dont TNF- $\alpha$  et NF- $\kappa$ B sont induits en corrélation avec l'augmentation de l'expression de Nur77 et Nurr1 (Maxwell and Muscat, 2006).

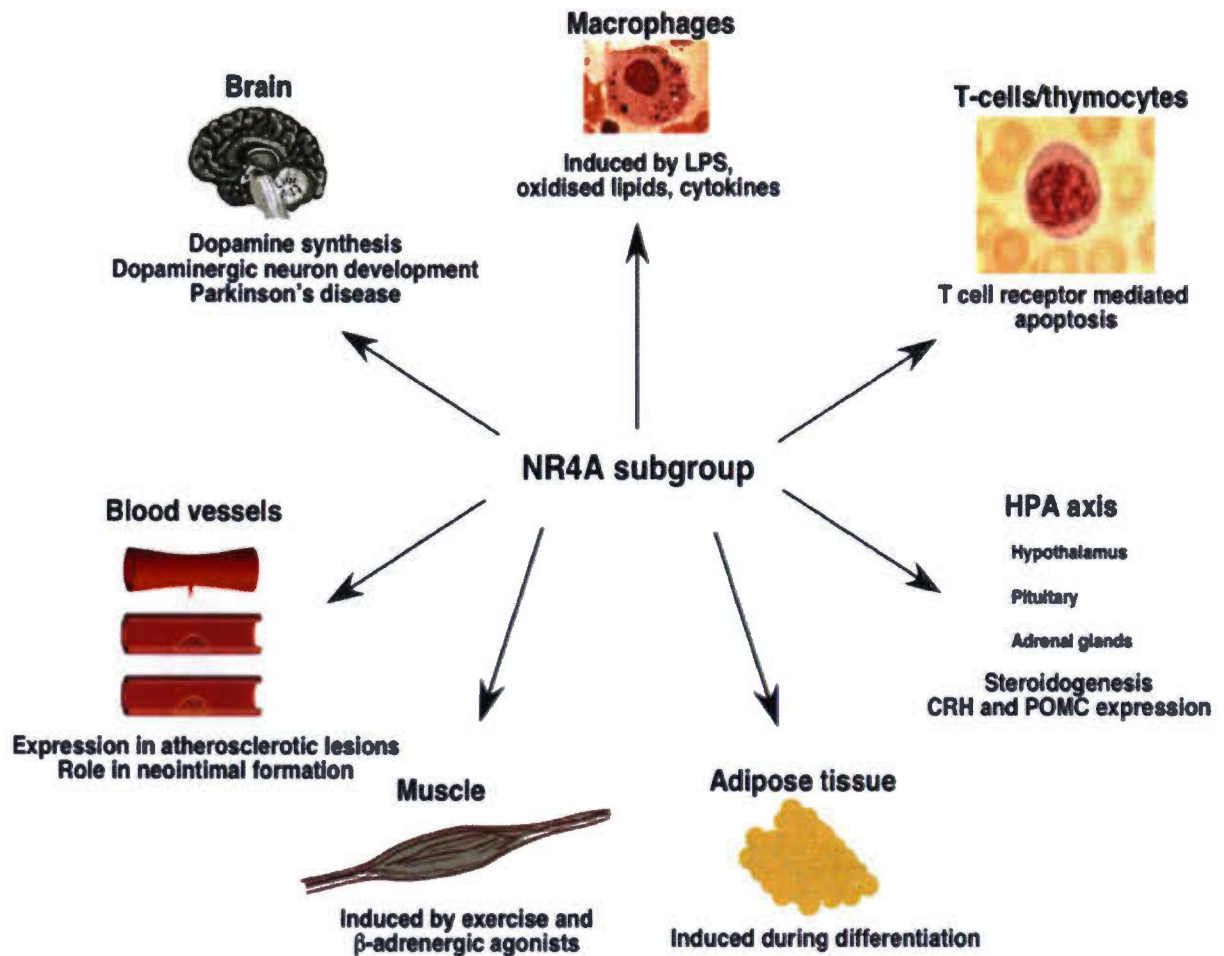
Les récepteurs de la sous-famille NR4A sont aussi impliqués dans le métabolisme. Dans les muscles squelettiques, ils sont induits par un agoniste des adrénoccepteurs  $\beta$ , dont

l'activité est critique dans la régulation de la fonction métabolique (régulation des lipides et du glucose dans la musculature squelettique). Inversement, le blocage de ces adrénocéphes par un antagoniste  $\beta$ -adrénergique bloque l'induction des récepteurs Nurs. Cette induction dans les muscles et les tissus adipeux semble être régulée par l'AMPc, les protéines kinases A et MAPK (Pearen and Muscat, 2010). De plus, l'expression des Nurs augmente significativement dans la musculature squelettique au cours de la période de récupération suite à un effort physique et dans le foie et le pancréas suivant une période de restriction calorique. Ces données indiquent clairement la relation importante entre les récepteurs de la famille NR4A et le métabolisme (Maxwell and Muscat, 2006; Oita et al., 2009; Pearen and Muscat, 2010) (Fig. 1.5).

Au niveau du cycle cellulaire, Nur77 serait également impliqué dans l'apoptose. En effet, l'expression de l'ARNm de Nur77 augmente rapidement suivant la stimulation de lymphocytes T avec un anticorps. Suivant sa translocation du noyau à la mitochondrie, Nur77 et Nor-1 peuvent se lier à Bcl-2, un régulateur de la mort cellulaire, ce qui expose son domaine pro-apoptotique BH3. Cette fonction ne serait donc pas liée à son activité transcriptionnelle (Lin et al., 2004; Wingate, 2006; Thompson and Winoto, 2008). À l'inverse, Nur77 pourrait également être impliqué dans des processus de protection anti-apoptotiques via la signalisation de TNF- $\alpha$ , un agent inducteur d'apoptose. Ainsi, en demeurant dans le noyau après la stimulation de TNF- $\alpha$ , Nur77 bloque caspase-3 et caspase-6 et agit comme facteur de survie de la cellule. Cet effet serait lié à son activité transcriptionnelle, étant donnée sa localisation (Hui-Chen Hsu, 2004; Wingate, 2006).

Récemment, un agoniste potentiel pour Nur77 a été découvert, la cytosporone B (Csn-B) (Zhan et al., 2008). La Csn-B se lie physiquement au LBD de Nur77, active sa translocation hors du noyau vers la mitochondrie et induit l'apoptose. Il est proposé que la Csn-B établirait un contact avec le résidu de tyrosine qui obstrue normalement le LBD des récepteurs Nurs, qui induirait un changement conformationnel de la protéine. Il est intéressant de constater que l'activation de Nur77 à l'aide de cet agoniste induit une augmentation du glucose sanguin et de l'expression de gènes glucogènes du foie tels que G6pc et Fbp1. Ainsi, la fonction régulatrice métabolique de Nur77 semble être directement

ciblée par l'interaction avec l'agoniste Csn-B (Zhan et al., 2008).



**Figure 1.5 :** Effets des récepteurs nucléaires orphelins de la sous-famille NR4A. Sont représentés ici les divers contextes cellulaires et systémiques dans lesquels les NURS ont un effet en tant que gènes à réponse rapide (tiré de Maxwell et al., 2006).

## 1.2.4 Les récepteurs Nurr dans le système nerveux central

### 1.2.4.1 Nur77

Nur77 est exprimé à l'âge adulte dans les neurones de diverses structures cérébrales. Son expression débute dans le cortex et le striatum à 14 jours postnataux chez le rat. Il est principalement localisé dans le cortex, le complexe striatal, l'hippocampe, l'hypothalamus, l'amygdale et le cervelet (Zetterström et al., 1996). Ainsi, Nur77 est localisé dans des structures rostrales, hors du mésencéphale, qui reçoivent des afférences dopaminergiques. Il est à noter que malgré son expression basale quasiment nulle dans la substance noire et l'aire tegmentale ventrale (ATV), celle-ci peut être induite en réponse à une lésion ou un traitement pharmacologique. Son expression dans les neurones dopaminergiques pourrait donc être initialement réprimée (Zetterström et al., 1996; Lévesque and Rouillard, 2007).

Nur77 est une cible directe de la protéine kinase A (PKA), une protéine AMPc-dépendante dont l'activité au sein du SNC est directement liée aux systèmes dopaminergiques (Maira et al., 1999; Kovalovsky et al., 2002). Elle permet l'induction de Nur77 selon deux voies ; l'une dépendante du calcium et de CaMKII, l'autre indépendante du calcium. Nur77 est aussi induit par l'activation de la protéine kinase mitogène MAPK, également activée par l'AMPc et l'hormone CRH. Telle PKA, elle est à la fois dépendante et indépendante du calcium. Les autres voies signalétiques intracellulaires empruntées par Nur77 sont celles de la protéine kinase activée par le stress MSK, la protéine kinase ribosomale S6 (RSK) et Akt, la protéine kinase B (PKB) (Zanassi et al., 2001; Kovalovsky et al., 2002; Darragh et al., 2005; pour revue, Lévesque and Rouillard, 2007).

Le niveau de phosphorylation de Nur77 est crucial à son activité transcriptionnelle. La phosphorylation est possible sur plusieurs sites de sa structure, dont le terminal C de son DBD (Ser-350 et Ser-354) par la protéine Akt (PKB), ce qui pourrait inhiber sa capacité à se lier à l'ADN et à agir en tant qu'agent de transcription (Pekarsky, 2001; Wingate, 2006). Les autres protéines pouvant agir par phosphorylation sur Nur77 sont nombreuses selon la littérature ; PKA, la protéine kinase C (PKC) et RSK. La phosphorylation de Nur77 par

RSK pourrait promouvoir sa liaison à l'ADN, *in vitro* (Wingate et al., 2006). Il est également proposé que la phosphorylation de Nur77 par une protéine kinase de type JNK serait à l'origine de son extraction du noyau vers le cytoplasme (Pekarsky, 2001; Rochette-Egly, 2003; Gronemeyer et al., 2004; Hui-Chen Hsu, 2004; Wingate, 2006; Lévesque and Rouillard, 2007).

Tel que mentionné précédemment, Nur77 peut former un hétérodimère avec RXR (Kovalovsky et al., 2002; Sacchetti et al., 2002; Hui-Chen Hsu, 2004). Dans ce cas, RXR peut agir à titre de partenaire silencieux ou de partenaire actif, s'il est activé par son ligand rétinolique 9-*cis*-RA. La relation entre les récepteurs rétinoliques et les systèmes dopaminergiques est évidente. Les récepteurs RXR $\beta$  et RXR $\gamma$  sont présents dans les neurones GABAergiques du striatum et du noyau accumbens (Zetterström et al., 1996). Ils peuvent également former un hétérodimère avec Nurr1, dont le rôle au sein du SNC sera discuté ultérieurement, et ainsi promouvoir la survie des neurones dopaminergiques en développement (Wallén-Mackenzie et al., 2003). Finalement, à l'aide de manipulations génétiques éliminant les récepteurs RXR, une diminution importante de l'expression des récepteurs striataux D1 et D2 a été observée (pour revue, Lévesque and Rouillard, 2007).

Malgré le fait que le rôle de Nur77 au sein du SNC ne soit pas complètement compris, il semble néanmoins exister une relation importante entre ce récepteur nucléaire orphelin et les systèmes dopaminergiques. En effet, la délétion de Nur77 ou la modulation de son expression modifie les réponses comportementales imputables à la dopamine et, à l'inverse, la modulation pharmacologique de la neurotransmission dopaminergique influence son expression dans les structures cibles (pour revue, Lévesque and Rouillard, 2007). Par exemple, le blocage pharmacologique des récepteurs D2 à l'aide de neuroleptiques typiques tel que l'halopéridol et la risperidone augmente significativement l'expression striatale de Nur77 dans les cellules exprimant les enképhalines (Maheux et al., 2005). De plus, ces neuroleptiques induisent un symptôme extrapyramidal, la catalepsie. Chez les animaux ayant une délétion génétique de Nur77, la réponse cataleptique est tronquée, tout comme l'augmentation de l'expression des neuropeptides striataux caractéristique du traitement aux antipsychotiques typiques (Ethier et al., 2004). En fait, les



patrons d'expression de Nur77 et de Nor-1 permettent de discriminer les antipsychotiques typiques et atypiques, ces derniers permettant de traiter les symptômes positifs et négatifs de la schizophrénie et n'induisant pas la catalepsie (Ethier et al., 2004; Maheux et al., 2005). L'administration chronique des mêmes neuroleptiques typiques induit des mouvements de mastication chez les souris sauvages et cette réponse est amplifiée chez les animaux Nur77 (-/-) (Ethier et al., 2004). Il est reconnu qu'une telle stimulation ou qu'une lésion des fibres dopaminergiques mène à l'augmentation de l'expression et de la colocalisation de Nur77 et de RXR dans les cellules striatales. Ainsi, Nur77 est également impliqué dans les réponses comportementales à long terme dépendantes de la dopamine (pour revue, Lévesque and Rouillard, 2007). La possibilité que Nur77 soit impliqué dans l'étiologie de la schizophrénie n'est pas écartée, les souris Nur77 (-/-) étant spontanément plus actives et plus sensibles à une faible dose d'un agoniste D2 tel que le quinpirole. De plus, l'étude post mortem de tissus cérébraux de patients schizophrènes révèle une diminution marquée de l'expression de Nur77 dans le cortex préfrontal (Xing et al. 2006) ce qui souligne la possibilité d'une altération de la neurotransmission dopaminergique de la voie mésocorticale (pour revue, Lévesque and Rouillard, 2007; Gilbert et al., 2006).

Parallèlement à ces observations, Nur77 et RXR sont des marqueurs étudiés dans la problématique de la maladie de Parkinson. Par rapport à cette pathologie, ils sont également étudiés dans le contexte des dyskinésies induites par la L-Dopa, le traitement compensatoire présentement utilisé au niveau clinique. Ainsi, des animaux lésés unilatéralement à l'aide de la 6-OHDA puis traités de façon chronique avec la L-Dopa exhibent une augmentation de l'expression de Nur77 du côté lésé dans les cellules exprimant les enképhalines (St-Hilaire et al., 2006). Par contre, l'expression de Nur77 augmente considérablement dans les cellules contenant la dynorphine du côté intact. Ce déséquilibre au niveau des voies de sortie du striatum pourrait représenter un mécanisme de compensation ou d'adaptation suite à la dénervation (St-Hilaire et al., 2006; Lévesque and Rouillard, 2007).

Ainsi, Nur77 et la dopamine sont impliqués dans une relation de régulation réciproque qui semble être déterminante dans l'homéostasie neurochimique des ganglions

de la base. RXR participe également à cette régulation étant donnée sa fonction modulatrice de l'activité transcriptionnelle de Nur77 (pour revue, Lévesque and Rouillard, 2007).

Étant donnée leur localisation dans l'hippocampe, les membres de la famille NR4A pourraient également être impliqués dans les processus mnésiques. L'expression de Nur77 augmente significativement dans la région CA1 du complexe hippocampique suivant l'apprentissage d'une tâche impliquant l'association d'un stimulus aversif et d'un contexte spécifique. Cet effet était absent chez des souris présentant une défectuosité dans la signalisation de la CAMKII (Hertzen and Giese, 2005; Hawk and Abel, 2011).

#### ***1.2.4.2 Nurr1***

Nurr1 est exprimé dès le début du développement embryonnaire (E10.5) dans diverses structures telles que le cortex, le bulbe olfactif, l'hippocampe, l'hypothalamus et le mésencéphale, principalement l'ATV et la partie compacte de la substance noire (Zetterström et al., 1996). Son expression est élevée dans ces régions tout au long du développement et se maintient à l'âge adulte. Les neurones dopaminergiques des régions citées précédemment ont niveau d'expression de Nurr1 très élevé, alors que celui-ci semble être absent des structures cibles des afférences dopaminergiques mésencéphaliques. Ainsi, Nurr1 est davantage présent le long de l'axe neural, comparativement à Nur77 ; son expression est également plus restreinte que celle de ce dernier (Zetterström et al., 1996; Perlmann and Wallén-Mackenzie, 2004; Jankovic et al., 2005).

Nurr1 interagit avec diverses protéines qui régularisent son activité. Ainsi, Nurr1 est une cible directe des protéines kinases MAPK, impliquées dans la différenciation neuronale et la transduction de signaux liés aux neurotrophines (Sacchetti et al., 2006). Plus spécifiquement, ce sont les protéines ERK2 et ERK5 qui peuvent se lier sur un site de la structure de Nurr1, entre les acides aminés 160 et 188. Ce site semble être préférentiel à ERK2, mais l'interaction qui en résulte est encore nébuleuse. Par contre, la liaison de ERK5 à Nurr1 semble véritablement moduler son activité transcriptionnelle, alors que le domaine A/B de Nurr1 est phosphorylé en présence de ERK5 en conditions basales ou de stress cellulaire. Ainsi, ERK5 pourrait être à l'origine de l'activité de Nurr1 dans son rôle

de neuroprotection des neurones dopaminergiques (Sacchetti et al., 2006). De plus, la protéine kinase LIM de domaine 1 (LIMK1), connue pour son recrutement de complexes répresseurs, interagit aussi directement avec Nurr1 et inhibe son activité transcriptionnelle. LIMK1 pourrait donc également jouer un rôle régulateur dans la fonction de Nurr1 au sein des systèmes dopaminergiques (Sacchetti et al., 2006).

Tout comme Nur77, Nurr1 peut former un hétérodimère avec RXR (Maira et al., 1999; Wallén-Mackenzie et al., 2003). Il agit à titre de partenaire silencieux lorsque RXR est activé par son ligand 9-cis-RA. Certaines études ont démontrés qu'en présence du ligand, le complexe Nurr1-RXR permet la survie d'un plus grand nombre de cellules dopaminergiques. Ainsi, le rôle neuroprotecteur de Nurr1 serait influencé par la présence ou non du récepteur RXR (Zetterström et al., 1999; Wallén-Mackenzie et al., 2003). De plus, l'acide docosahexaénoïque (DHA), un acide gras polyinsaturé hautement enrichi dans le cerveau adulte, peut également agir à titre de ligand endogène de RXR (Urquiza et al., 2000). Le DHA est reconnu comme étant essentiel à la maturation cérébrale, une lacune en cet acide gras menant à des difficultés au niveau de la mémoire spatiale, un symptôme également observé chez des animaux déficients en RXR $\gamma$ . Une faible concentration de DHA est plus efficace pour activer le complexe Nurr1-RXR que RXR seul, ce qui souligne le fait que l'hétérodimérisation du récepteur puisse modifier sa réponse au ligand (Urquiza et al., 2000).

Étant donnée l'expression précoce de Nurr1 dans le développement du mésencéphale, la possibilité de son implication dans la maturation des neurones dopaminergiques est évidente. Les études de souris transgéniques Nurr1 chez lesquelles le gène a été supprimé sont catégoriques ; Nurr1 est un facteur critique dans le développement du phénotype dopaminergique. Chez ces animaux Nurr1 (-/-), aucun marqueur de la dopamine n'est détecté après la naissance et la mort cellulaire est accrue (Zetterström et al., 1997). Par contre, toutes les autres cellules catécholaminergique exhibent un développement normal (pour revue, Perlmann and Wallén-Mackenzie, 2004). Ainsi, Nurr1 est nécessaire à la synthèse et à l'expression du récepteur au GDNF Ret (Wallen et al., 2001), du transporteur DAT et de VMAT2 (Smits et al., 2003). De fait, ces divers éléments

confèrent aux précurseurs leur caractère dopaminergique lors de la phase de différenciation. Les neurones dopaminergiques peuvent naître et se développer en tant que progéniteurs et précurseurs sans *Nurr1*, cela dit ils ne peuvent migrer vers leurs cibles mésencéphaliques et présentent des défauts importants dans leur fonction de synthèse et de relâche de neurotransmetteur (Zetterström et al., 1997; Saucedo-Cardenas, 1998; Perlmann and Wallén-Mackenzie, 2004; Smidt and Burbach, 2007). Les animaux hétérozygotes *Nurr1* (+/-) se développent normalement et ont le même niveau de dopamine striatale que les animaux sauvages, malgré des niveaux de dopamine plus faible dans le cortex préfrontal et le noyau accumbens (Eells, 2002). Les marqueurs du développement dopaminergique semblent également intacts chez ces animaux, alors que les niveaux de TH et de DAT sont identiques à ceux des souris sauvages. Par contre, ces animaux sont plus vulnérables à une lésion induite par le MPTP au niveau de la substance noire et leurs performances motrices semblent se détériorer à l'âge adulte. De plus, ce déclin au niveau de l'activité locomotrice est corrélé avec une perte de dopamine striatale dépendante de l'âge des animaux (Jiang et al., 2005; Jankovic et al., 2005). Chez l'homme, l'expression de *Nurr1* dans les lymphocytes périphériques de patients atteints de la maladie de Parkinson était significativement plus faible que chez des patients en santé (Le et al., 2008). Ces travaux soulignent le potentiel neuroprotecteur de *Nurr1* et sa fonction de maintenance du phénotype dopaminergique chez la souris adulte (Jankovic et al., 2005).

Le fait que *Nurr1* continue d'être exprimé à l'âge adulte et qu'une diminution de son expression puisse être liée à l'étiologie de la maladie de Parkinson (Zhang et al., 2011) suggère un rôle plus important de *Nurr1* que le simple développement post mitotique des neurones dopaminergiques du mésencéphale. En utilisant une souche de souris transgéniques exprimant un allèle permettant l'ablation génique de *Nurr1*, l'équipe de Perlmann et coll. a pu observer le développement des neurones dopaminergiques au cours de l'embryogénèse tardive (Kadkhodaei et al., 2009). La perte de *Nurr1* était complète à E15.5, soit 5 semaines après le commencement du développement embryonnaire. La moitié des souris sont mortes à la naissance alors que les survivantes exhibaient un poids inférieur, des difficultés motrices et une viabilité fragile comparativement aux souris sauvages. Ces différences peuvent certainement s'expliquer par une déficience des neurones

dopaminergiques ; les niveaux de TH dans la substance noire et le VTA à E15.5 étaient déjà significativement réduits d'environ 80%. Ainsi, Nurr1 est essentiel au cours de la maturation des neurones dopaminergiques du mésencéphale (Kadkhodaei et al., 2009). Des travaux similaires conduits par la même équipe ont été effectués chez des souris adultes. Ces dernières avaient subi une inactivation du gène Nurr1 après la maturation des neurones dopaminergiques afin de déterminer le rôle de Nurr1 dans le maintien et la survie de ceux-ci. Chez ces animaux, 4 mois après la naissance, les niveaux de TH, de dopamine et de ses métabolites étaient significativement réduits dans la substance noire et plus légèrement réduits dans le VTA. De façon intéressante, le niveau de dopamine au striatum dorsolatéral était également significativement réduit. Finalement, le nombre de cellules TH de la substance noire était réduit de près de 50% après 4 mois et l'expression du DAT et de VMAT2 étaient également sévèrement réduites, ce qui souligne la perte des caractéristiques dopaminergiques des cellules du mésencéphale (Kadkhodaei et al., 2009). Ainsi, Nurr1 est essentiel au maintien du phénotype dopaminergique chez l'animal adulte, et non pas seulement au cours du développement cérébral. Il est avancé dans la littérature que son rôle dans la régulation prénatale des marqueurs neuronaux TH, AADC, DAT et VMAT2 pourrait également être requis à l'âge adulte. Ce rôle pourrait également dépendre de l'interaction avec d'autres facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des précurseurs en neurones dopaminergiques, tel Pitx-3 (Jankovic et al., 2005; Jacobs et al., 2009; Kadkhodaei et al., 2009).

Étant donné que Nurr1 participe au maintien des neurones dopaminergiques adultes et que les animaux hétérozygotes sont plus vulnérables à un challenge neurotoxique, le rôle de Nurr1 dans la neuroprotection et la survie de ces mêmes neurones semble évident. Tel que mentionné précédemment, les récepteurs nucléaires peuvent agir par trans-répression, en inhibant la transcription d'un autre facteur de transcription (Gronemeyer et al., 2004). Ainsi, il est proposé que Nurr1, au sein des astrocytes et cellules microgliales, puisse inhiber la signalisation inflammatoire du facteur de transcription NF- $\kappa$ B dans le cas d'une administration de LPS dans la substance noire (Maxwell and Muscat, 2006). Ce type de traitement induit de l'inflammation, mène à une perte de neurones exprimant la TH et induit l'expression de Nurr1. Suite à la répression de Nurr1 grâce à un lentivirus, la perte de

neurones TH augmente significativement. L'équipe de Glass et al. (2010) propose que Nurr1 pourrait interagir directement avec le complexe répresseur CoREST ; cette interaction serait dépendante de la phosphorylation de Nurr1 par une protéine kinase de type Nemo (Bensinger, 2009; Saijo et al., 2009). Dans l'étude des maladies de Parkinson et de Huntington, l'oxydation cellulaire est une avenue empruntée pour expliquer la neurodégénérescence. Plusieurs facteurs sont étudiés dans l'optique du développement de la neuroprotection, tels que Nurr1 et le *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF). En fait, le BDNF, un facteur neurotrophique particulièrement étudié dans le contexte de la mémoire à long terme, est un gène ciblé directement par Nurr1 (Volpicelli et al., 2007). La cystamine, dont l'utilisation dans des modèles animaux pour protéger les neurones dopaminergiques contre une lésion neurotoxique au MPTP, pourrait également interagir avec Nurr1 dans le cadre de fonctions neuroprotectrices et possiblement emprunter une voie de signalisation impliquant Nurr1 et le BDNF à cet effet (Tremblay et al., 2006; Volpicelli et al., 2007; Gibrat et al., 2010).

L'importance de Nurr1 dans les neurones dopaminergiques du mésencéphale n'est plus à démontrer. Cela dit, étant donné son expression dans des structures telles que l'hippocampe et le néocortex, ce récepteur nucléaire pourrait également avoir un rôle dans certaines fonctions cognitives (Zetterström et al., 1996). La formation de la mémoire à long terme requiert l'activation de protéines kinases telles MAPK et PKA, qui font partie intégrante des voies de signalisation principales des Nurr, dont Nurr1 (Kovalovsky et al., 2002). De plus, l'expression génique de Nurr1 dans l'hippocampe augmente suivant l'apprentissage d'une tâche nouvelle, d'une tâche impliquant la navigation spatiale et lors d'un apprentissage par association (*fear conditioning*) (Hawk and Abel, 2011). Les études sur les performances mnésiques de souris hétérozygotes démontrent également des différences significatives intéressantes sur le plan cognitif. Ces souris sont naturellement plus anxieuses et ont des lacunes dans la rétention d'information au contenu émotionnel (*passive avoidance*) (Rojas et al., 2007; Vuillermot et al., 2011). Ces derniers travaux suggèrent ainsi que les souris hétérozygotes peuvent être identifiées comme un modèle animal plausible de la schizophrénie. La mémoire spatiale à long terme semble également déficiente chez ces souris, alors que leur performance de discrimination spatiale est

significativement inférieure à celle de souris sauvages. L'encodage dans un tel contexte serait dépendant de la région CA3 de l'hippocampe, où *Nurr1* est présent. L'expression réduite de *Nurr1* pourrait ainsi compromettre la plasticité des neurones hippocampiques (Colón-Cesario et al., 2006). Finalement, la régulation de la mémoire à long terme dans l'hippocampe est assurée par certains facteurs cellulaires dont le BDNF. Ce dernier est également un gène ciblé par *Nurr1*, ce qui souligne la possibilité de l'influence des *Nurs* dans les processus mnésiques (Volpicelli et al., 2007; Hawk and Abel, 2011).

### 1.3 Les objectifs de l'étude

Tel qu'énoncé auparavant, plusieurs évidences démontrent la relation réciproque entre *Nur77* et la transmission dopaminergique ainsi que l'importance de *Nurr1* dans le développement et le maintien du phénotype dopaminergique. L'objectif principal de cette étude était de déterminer les rôles respectifs et la possibilité d'une interaction entre ces récepteurs nucléaires orphelins dans la modulation de la neurotransmission dopaminergique. Malgré la localisation de ces récepteurs dans des populations cellulaires différentes, il n'en demeure pas moins qu'ils sont membres de la même famille et qu'ils sont tous les deux dans une position différente mais privilégiée pour moduler la neurotransmission dopaminergique. Étant donné qu'ils n'ont pas encore de ligand défini, nous ne pouvons utiliser des drogues pour stimuler ou bloquer directement ces récepteurs. Nous avons donc tenté de déterminer leurs rôles respectifs et la possibilité d'une interaction fonctionnelle en utilisant les comportements médiés par la dopamine. Nous avons ainsi utilisé des souris transgéniques, chez qui l'expression de *Nur77* et *Nurr1* étaient modifiées ou supprimées, la délétion complète de *Nurr1* menant à la mort de l'animal. De plus, nous avons utilisé la souris *Double Knock-out* (*Nurr1*(+/-)/*Nur77*(-/-)) pour déterminer si la double délétion génique de ces récepteurs menait à un phénotype distinct. Nous avons observé ces souris dans divers protocoles expérimentaux impliquant l'activité locomotrice et la réponse à divers agents pharmacologiques modulant la transmission dopaminergique. Ainsi, nous avons utilisé l'amphétamine, un psychostimulant connu pour induire une stimulation importante de la transmission dopaminergique et l'halopéridol, un neuroleptique antagoniste des récepteurs dopaminergiques D2, pour bloquer celle-ci. Nous

avons également investigué le rôle de ces récepteurs nucléaires dans la modulation de l'expression de deux neuropeptides opiacés modulés de façon importante par la transmission dopaminergique, soit l'enképhaline et la dynorphine.



## CHAPITRE 2

Modulation of dopamine neurotransmission by Nurr1 and Nur77:

Distinct roles and interactions

Collaborateurs: Baillargeon Joanie<sup>1</sup>, Paquet Brigitte<sup>1</sup>, Levesque Daniel<sup>2</sup>, Rouillard Claude<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CRCHUL, Faculté de Médecine, Université Laval <sup>2</sup>Faculté de Pharmacie, Université de Montréal

## 2.0 ARTICLE

### 2.1 Abstract

Orphan nuclear receptors of the NR4A subfamily are closely related to the functioning of dopaminergic systems. Nurr1 is essential at developing and maintaining the survival of dopamine neurons whereas Nur77 is known as an important modulating agent of the dopamine neurotransmission. Knowing that locomotor activity is strongly influenced by the dopaminergic systems, we have investigated their specific roles and the possibility of an interaction between these two transcription factors in the modulation of the dopaminergic neurotransmission. We have measured the behavioral output and the striatal opioid expression of different wild type and knockout mice (Nur77 (-/-) ; Nurr1 (+/-) ; Double knockout (Nurr1 (+/-)/Nur77 (-/-)) in different basal and drug-challenged conditions. Nur77 (-/-) and Double knockout mice display a significantly increased short-term basal locomotor activity and a significantly reduced cataleptic output following haloperidol injection whereas Nurr1 (+/-) mice's phenotype generally resembles the wild type's. Double knockout, Nur77 (-/-) and Nurr1 (+/-) heterozygous mice display a significantly increased locomotor activity following amphetamine treatment in comparison to wild type mice. Enkephalins mRNA expression is significantly higher in Double knockout mice following amphetamine drug treatment, but unchanged following haloperidol treatment, along with the Nur77 (-/-) mice, in comparison to all other mouse types. In Double knockout mice, dynorphin expression is regulated similarly to the wild type mice but interesting changes occur in Nurr1 (+/-) mice treated with AMPH. Taken together, these results demonstrate that NR4A subfamily receptors are important modulators of the dopamine mediated behavioral outputs. We suggest that the possibility of an interaction between Nurr1 and Nur77 exists, based on the biochemical and behavioral differences displayed by the Double knockout mice.

Les récepteurs nucléaires orphelins de la sous-famille NR4A sont étroitement liés au fonctionnement des systèmes dopaminergiques. Nurr1 est essentiel au développement et à la survie des neurones dopaminergiques alors que Nur77 est un modulateur important de la réponse comportementale médiée par la dopamine. Il est établi que l'activité locomotrice est sous contrôle des systèmes dopaminergiques. Nous avons étudié les rôles spécifiques ainsi que la possibilité d'une interaction entre les deux protéines dans la modulation de la transmission dopaminergique. Ainsi, nous avons mesuré la réponse comportementale et les niveaux d'expression de certains neuropeptides striataux chez divers types de souris sauvages et knockout (Nur77 (-/-); Nurr1 (+/-); Double knockout (Nurr1 (+/-)/Nur77 (-/-)) en conditions basales et suivant l'administration d'agents pharmacologiques. Les animaux Nur77 (-/-) et Double knockout démontrent un niveau d'activité locomotrice à court terme significativement supérieur et, suite à l'administration d'halopéridol, démontrent une réponse cataleptique significativement réduite par rapport aux animaux des autres souches. Les animaux Nur77 (-/-), Nurr1 (+/-) et Double knockout démontrent un niveau d'activité locomotrice significativement supérieur à celui des animaux sauvages suivant l'administration d'amphétamine. L'expression de l'ARNm des enképhalines est augmentée de façon significative chez les animaux Double knockout et Nur77 (-/-) suivant l'injection d'amphétamine mais demeure inchangée suivant l'administration d'halopéridol, contrairement aux animaux sauvages et Nurr1 (+/-). L'expression de l'ARNm de la dynorphine est semblable chez les animaux sauvages et Double knockout tandis que l'on observe chez les animaux Nurr1 (+/-) certaines différences significatives après l'administration d'amphétamine. Collectivement, ces résultats démontrent l'importance des récepteurs de la sous-famille NR4A en tant que modulateurs de la réponse comportementale médiée par les voies dopaminergiques. De plus, nos résultats montrant des différences biochimiques et comportementales importantes chez les animaux Double knockout suggèrent la possibilité d'une interaction entre Nurr1 et Nur77.

## 2.2 Introduction

Orphan nuclear receptors of the NR4A subfamily, also known as Nurs (Nur77, Nor-1, Nurr1), are known to act as transcription factors without ligand-binding ability. Therefore, their transcriptional activity is considered inherent to their constitution (constitutively activated) (Maira et al., 1999). As immediate early genes, their hallmark is the capacity to rapidly sense multiple physical and environmental stimuli and to translate them into long lasting cellular responses (for review, Lévesque and Rouillard, 2007). They are implicated in various functions in peripheral tissues; most notably the T-cells mediated apoptosis mechanisms, the expression of atherosclerotic lesions, steroidogenesis and inflammation (for review, Pearen and Muscat, 2010). Hence, their expression can be induced by multiple stimuli including cytokines, neurotransmitters, peptides, hormones, stress and other physical factors (Maxwell and Muscat, 2006). Within the central nervous system (CNS), their main functions are still elusive and misunderstood. However, it is now evident that Nurs are closely related to dopamine (DA)-regulated systems and their putative implication in different DA-based pathologies is under investigation (i.e. Parkinson's disease, schizophrenia, drug addiction). Nurr1 (NR4A2) is mainly located in dopaminergic structures, such as the substantia nigra and ventral tegmental area (VTA), and acts as a crucial factor in the development and survival of those mesencephalic DA neurons (Jankovic et al., 2005). Nurr1 knock-out mice (Nurr1<sup>-/-</sup>) die shortly after birth, and DA neurons fail to develop normally and reach their normal projection targets (Saucedo-Cardenas, 1998; Perlmann and Wallén-Mackenzie, 2004). Furthermore, Nurr1 has an important role in the maintenance of adult DA neurons (Kadkhodaei et al., 2009) and bears a possible role in neuroprotection of these cells following inflammation or lesions (Saijo et al., 2009). Nur77 (NR4A1) is located in major dopaminergic areas such as the prefrontal cortex, striatum and nucleus accumbens and also in the hippocampus. Its expression is significantly upregulated following DA systems lesions or drug challenges; i.e. 6-hydroxydopamine, amphetamine and haloperidol. On the other hand, the suppression of its gene activity strongly modulates the DA-mediated behavioral outputs (St-Hilaire et al., 2006; Gilbert et al., 2006; for review, Lévesque and Rouillard, 2007). Therefore, Nur77 is thought to be an important regulator of the DA systems and seems to share a mutual and

reciprocal balance relationship with these systems (for review, Lévesque and Rouillard, 2007). Nur77 and Nurr1 also share an important characteristic; they both can form a heterodimeric complex with the retinoid X receptor (RXR), a complex which modulates their own transcriptional activity (Wallén-Mackenzie et al., 2003; Lévesque and Rouillard, 2007; Volakakis et al., 2009). Nor-1, the last member of this orphan nuclear receptor family, is located in the same areas as Nur77 but cannot form a heterodimer with RXR. Its functions in the peripheral nervous system are similar to those of Nur77, but are mostly unknown within the CNS. Preliminary data from our lab indicate that Nor-1 may have an opposite role to Nur77 although both of them are located in the same structures and are probably implicated in the same DA-mediated processes (Rouillard et al., unpublished).

Since both Nurr1 and Nur77 are closely related to DA mechanisms, the possibility of a cellular or functional interaction in between them is plausible. Nur77 and Nurr1 are part of the same subfamily but are located in different structures, on each end of the nigrostriatal pathway. They both interact with the same neurotransmitter, as Nurr1 regulates the development and functioning of midbrain DA neurons and as Nur77 modulate DA neurotransmission in dopaminergic areas. Therefore, the possibility of a functional interaction logically exists. Since these nuclear receptors are constitutively activated and believed to be incapable of binding an endogenous ligand, they cannot be stimulated directly by pharmacological agents. Therefore, their specific roles and possible interactions can only be investigated using the DA-mediated outputs exhibited by different mice bearing different genotypes. Several lines of data, including our own, have shown differences between Nur77 (-/-), Nurr1 (-/+ ) mice, and their respective wild-type counterparts (Saucedo-Cardenas, 1998; Jiang et al., 2005; Gilbert et al., 2006; for review, Lévesque and Rouillard, 2007). The recently developed Double Knock-Out mouse model (Nurr1 (+/-)/ Nur77 (-/-)) should provide an interesting model to evaluate the possibility of an interaction in between the two receptors. The nigrostriatal pathway, obviously important in the basal ganglia neurochemical balance, is also involved in the downstream regulation of striatal neuropeptides such as dynorphin (DYN) and enkephalin (ENK), segregated accordingly to the two striatal output pathways (for review, Samadi et al., 2006; 2007). Hence, these peptides provide excellent marking data as to how the DA neurotransmission is modulated following DA drug treatment and/or genotype manipulation.

Here, we have analyzed the behavioral and biochemical differences between those different types of mice and the Double Knock-Out mouse model (Nurr1 (+/-)/Nur77 (-/-)). We have used different behavioral protocols to investigate DA-mediated outputs of the different genotypes combinations to determine the possibility of a specific phenotype linked to a Nurr1-Nur77 interaction. Since the nigrostriatal pathway is mainly implicated in the initiation of goal-directed movement circuitry, we have monitored locomotor activity in basal and drug-challenged conditions, stimulating (AMPH) or blocking (Haloperidol) DA neurotransmission. We have also used *in situ* hybridization to measure the induction patterns of striatal neuropeptides DYN and ENK in all animals under all behavioral conditions.

### 2.3 Materials and Methods

*Animals.* Nur77 knockout (Nur77 -/-) mice were developed and provided by Dr. Jeff Milbrandt (University of Washington in St. Louis, Missouri). Nurr1 (+/-) heterozygous mice were developed and provided by Dr. Thomas Perlmann (Karolinska Institute, Stockholm). Our own laboratory developed the Double KO mice by simple genetic crossing and the individuals were successfully identified by genotyping. As for Nurr1 (+/-) and Nur77 (-/-) mice, Double KO animals have no apparent phenotype or do not present gross behavioral abnormalities. All experiments were approved by the *Comité de Protection des Animaux de l'Université Laval*. It is important to point out that both Nurr1 (+/+) (Rouillard et al., unpublished) and Nur77 (+/+) mouse types (Gilbert et al., 2006) behave similarly to C57BL/6 mice and were therefore used alternately as control groups (wildtype). This was necessary for statistical purposes to avoid repetition of control groups.

*Open-field test.* This test was conducted to monitor basic overall activity and to detect basal anxiety behaviours. The apparatus consists of a clear plastic box (40 x 40 x 40cm) with two zones delimited on its floor. The center zone is a square located on the center of the floor and the periphery is the area around the square. The animals are put in a corner of the box,

in the peripheral zone, and a video camera records the animals' movements for 10 minutes. The time taken (latency) for the animal to enter the central zone is a measure of its normal anxiety. The total distance traveled is also recorded, as a measure of short-time basal activity. We used the *ANY-maze* software (Stoelting Co.) to compile and analyze the video data recorded. A total of 46 mice were used in this experiment only (5 Nurr1(+/+); 5 Nurr1(+/-); 8 Nur77(+/+); 8 Nur77(-/-); 10 Double KO; 10 Nurr1(+)/Nur77(+)). The same animals were not used again for any behavioral or biochemical measurements presented in this work.

*Basal locomotor activity.* We used the wheel-running test to measure basal locomotor activity. The wheels are implemented to the animals' normal environment; therefore the activity is considered spontaneous. The animals were placed in the wheel-containing cages for 18 hours every day, from 13:00 to 7:00 in the morning, during three consecutive days in a room with an automatically controlled dark/light cycle, with food and water provided *ad libitum*. The *Wheel-Running System* (Lafayette Instruments Co.) includes a meter that counts the number of complete wheel turns. Each wheel has a 0.4m circumference to measure the total distance traveled by the rodents. The data were compiled using the *Activity Wheel Monitor Starter and Expander Interface* software (Lafayette Instrument Co.). A total of 8 mice from each genotype were used in this experiment only (8 Nurr1(+/+); 8 Nurr1(+/-); 8 Nur77(+/+); 8 Nur77(-/-); 8 Double KO; 8 Nur77(-/-)) and these animals were not used again in any subsequent analyses related to this work.

*Psychostimulant-induced locomotor activity.* To analyze the effects of d-AMPH on locomotor activity, we have used the *Flex-field* apparatus (San Diego Instruments Co.). The animals are placed in a Plexiglas chamber similar to the one used in the open-field test for 30 minutes prior to the drug injections. They are then injected with a 2.5 mg/kg i.p. dose of d-AMPH and placed back again in the chamber for 90 minutes. Photoelectric cells emitting infrared beams are scattered on each side of the chamber and the overall locomotor activity is monitored and recorded by the *Activity Wheel Monitor Starter and Expander Interface*

software (Lafayette Instrument Co.). The photoelectric beams can detect horizontal as well as vertical activity, enabling us to monitor overall locomotor activity, rearings and non-ambulatory activity, which can be assimilated to stereotyped-like movements. After 90 minutes, animals are moved back to their original cages for 60 minutes and then sacrificed by intra-cardiac perfusion. The total time of 2.5 hours after AMPH administration maximizes the mRNA expression of the investigated neuropeptides (Mattson et al. 2007). A total of 50 mice were used in this experiment; 10 mice from each genotype (Nurr1(+/-), Nur77(-/-) and Double KO) and 20 Nurr1 (+/+) mice for both saline and AMPH conditions. For practical reasons, we completed the experiment over two days, comparing the Double KO, the Nur77 (-/-) and the Nurr1 (+/+) on the first day and the Nurr1 (+/-) with the Nurr1 (+/+) on the following day.

*Antipsychotic-induced catalepsy.* To measure the cataleptic response to an antipsychotic drug (Haloperidol 1.0 mg/kg i.p.), we have used a 70 degrees inclined platform. The animal is placed on the platform in the upward direction and the time it takes to move each of its four paws off the platform corresponds to the catalepsy score, the maximum score being 180 seconds. We have measured the catalepsy score one time before the haloperidol injection and at different time intervals following the injection. The animals were sacrificed by intra-cardiac perfusion 5 hours following the injection, thus 2.5 hours following the last behavioral measurement, to ensure a maximal neuropeptide mRNA expression (Ethier et al. 2004). A total of 40 mice were used in this experiment; 10 mice from each genotype (Nurr1(+/+), Nurr1(+/-), Nur77(-/-) and Double KO) for both saline and HAL conditions. For practical reasons, we completed the experiment over two days, comparing the Double KO with the Nur77 (-/-) on the first day and the Nurr1 (+/+) with the Nurr1 (+/-) on the following day.

*Preparation of tissue sections.* Following these behavioral measurements, all animals were sacrificed by trans-cardiac perfusion. Prior to this, all animals were anesthetized with a 10:1 solution of ketamine 80 mg/kg and xylazine 10 mg/kg (Vetalar; Bioniche, ON, Canada and



Rompum; Bayer, ON, Canada). A needle is then surgically plugged into the left ventricle of the animal and a saline solution (NaCl 0.9%) washes the internal tissues using a micro-perfusion pump. The internal and cerebral tissues are then fixed with paraformaldehyde (PFA) 4% (Sigma Co., St-Louis, MO, USA) to avoid tissues degradation. The animal's brain is then extracted and immediately preserved in a PFA-filled vial, where it stays for 24 hours. After 24 hours, the vials are emptied and filled again with a 1:1 solution of PFA 4% and sucrose 20% and kept this way for several days in order to ensure the tissues cryoprotection. The tissues were frozen with dry ice and kept at -80°C. Then, we used a microtome to collect 20µm thick coronal slices. Those slices were then kept in an antifreeze solution (sodium buffer 0.5M, ethylene glycol 30% et glycerol 20%) at -20°C until processed.

*Probes preparation.* All RNA probes used (ENK, DYN) were synthesized with the *Riboprobe Promega Kit* (Promega, Madison, WI, USA), the isotope sulphur 35 [<sup>35</sup>S] (Perkin-Elmer Inc., Boston, MA, USA), their respective polymerase RNA and restriction enzyme in a 37°C pre-heated bath for 1h45. The probes were then purified with *Mini-Quick-Spin RNA* columns (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, U.S.A) and kept on ice until used.

*In situ hybridization.* Microtome-cut coronal brain sections were mounted onto SnowCoat X-tra slides (Surgipath, Richmond, IL, USA) in a 1X PBS buffer solution and stored overnight at -20°C until used. Brain sections were fixed in 4% PFA at room temperature for 20 min and then washed two times for 5 min in a 1X PBS buffer solution. Then, the slides were bathed for 10 min at 37°C in a proteinase K solution ((20 mg/ml in Tris-HCL 1M pH8.0 and EDTA 0.5M pH8.0); Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, U.S.A) to facilitate the cerebral tissues permeability. The slides were briefly washed in DEPC water and a 0.1M triethanolamine buffer solution (TEA; Sigma, St-Louis, MO, USA) and then bathed for 10 min in a solution of TEA 0.1M buffer and 0,25% acetic anhydrid (Sigma, St-Louis, MO, USA) to neutralize all positive charges stored in the tissue sections. Brain sections

were then rinsed for 5 min in a SSC 2X buffer solution (300mM NaCl and 30mM citric acid) and dried with different ethanol-based solutions (50, 70, 90, and 100% twice). The slides are left drying for two hours at room temperature before hybridization. The probes previously prepared were heated at 80°C for 5 minutes and added to the hybridization solution (518µl formamide, 62µl NaCl 5M, 10µl Tris 1M pH8.0, 2µl EDTA 0.5M pH8.0, 20µl Denhardt 50X, 207µl dextran sulfate 50%, 50µl tRNA10mg/ml, 10 µl dithiothreitol (DTT) 1M and 118µl DEPC water minus the used probe volume). The resulting hybridization solution was heated 5min at 80°C and 100µl were laid on each slide. The slides were then put on a previously heated slidewarmer (58°C) overnight for the proper hybridization process. The next day, the slides were washed in a SSC 4X solution for 20min and in a SSC 4X with 0,05% DTT 1M for 5min. We then bathed the slides in a solution of RNAase A 10mg/ml (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) for 30 minutes at 37°C and washed them again subsequently with different SSC-based solutions (2X and 1X for 5min, 0,5X for 10min, 0,1X for 10min at 60°C, 0,1X for 2min). Finally, the brain sections were dried using different ethanol-based solutions and left for drying at room temperature for 30min. We then exposed the slides on x-ray film (Kodak BioMax, Amersham Biosciences, QC, Canada) for different time periods depending on the probe used (ENK 48 hours; DYN 9 days).

*Optic density quantification.* To achieve quantification following film exposition, we used a Sony XC77 camera equipped with a Micro Nikkor 60mm 1:2.8D synchronized with the Scion IMAGE 1.63v software (Scion Corporation, Fedrick, MD, USA). The latter enabled us to take precise pictures of each brain section while controlling the pixels gain and offset accordingly to a calibrated <sup>14</sup>C standard (ARC 0146A; American Radiolabeled Chemicals, St-Louis, MO, USA). Those calibrated pictures were then analyzed with another software, Image J 1.37v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA), which enabled us to translate optic density data into radioactive units per grams of tissue (µCi/g of tissue). The average level of labeling for each area was calculated from three adjacent bilateral brain sections of the same animal for each cerebral structure investigated (striatum and nucleus accumbens) (Fig 2.6). Background intensity was subtracted from every measurement.

*Statistical analyses.* All behavioral and biochemical mean group values and their respective standard error means (SEM) were statistically analyzed with the SigmaPlot v11.0 software (SYSTAT Software Inc.). We used the student's t-test for the *Open Field Test* data and two-way variances analyses (ANOVAs) for *Flex Field Test* and *Catalepsy* data to compare the possible relative influences of drug treatment and genotype on the behavioral output. The *Wheel-Running* data was statistically analyzed with a two-way repeated measure ANOVA with one factor repetition, as the same behavioral measure is taken at different time intervals. All *in situ* hybridization data were analyzed with a two-way ANOVA. All multiple comparisons in between groups were evaluated *a posteriori* with the Holm-Sidak correction, which guarantees individual comparisons for a higher significance index. Recommended for pairwise comparison testing and comparisons versus a control group, this test is more powerful than the Bonferonni and Tukey tests.

## 2.4 Results

### 2.4.1 Behavioral analyses

#### 2.4.1.1 Open Field Test

The open field test is an animal model commonly used to measure basal locomotor activity in a novel environment and normal anxiety-like behavior. The increase of time spent in the central area and the decrease of latency to enter the central area are indications of non-anxious behavior (Prut and Belzung, 2003). The testing sessions were divided accordingly to the rodents' genotypes (Nur77 (-/-) vs Nur77 (+/+); Nurr1 (+/-) vs Nurr1 (+/+); Nurr1 (+/-)/Nur77 (-/-) (Double KO) vs Nurr1 (++)/Nur77 (+/+)). There were no significant differences in between each of the knockout mouse types and their wild type relatives, with no apparent differences in anxiety-like behavior. As previously stated, this test was also conducted to measure short-time basal locomotor activity. However, Nurr1 (+/-) mice were significantly more active than wild type mice ( $p=0.008$ ) whereas there were no significant differences in between wild type and Double KO mice (Fig. 2.1).

#### 2.4.1.2 Wheel-Running

The wheel-running test is an animal model for basal locomotor activity; it is also suggested that wheel-running is naturally rewarding and addictive in rodents (Werme et al., 2002; 2003). We used this test to measure the total distance spontaneously traveled by the animals on three successive days.

There were no significant differences between mouse genotypes Nurr1 (+/-) and Nurr1 (+/+) in any of the day trials (Fig. 2.2), although the ANOVA showed that both mouse types exhibited a significant increase in the distance traveled on the third day ( $F(2,11)=0.008$ ;  $p=0.014$ ).

When comparing Nur77 (+/+) to Nur77 (-/-) mice, we found that the latter had a significant increase in spontaneous locomotor activity within the first day trial ( $p=0.026$ ) and the day factor proved to be significant ( $F(2,47)=15.148$ ;  $p<0.001$ ). *Post-hoc*

comparisons showed that there were no day related significant changes in Nur77 (+/+) mice as the distance traveled each day stayed relatively stable during the whole experimental process. However this wasn't observed in Nur77 (-/-) mice, as there is a significant difference in locomotor performance when comparing each day trials ( $p < 0.001$ ,  $p = 0.004$ ,  $p = 0.008$ ). The spontaneous locomotor activity and its stability therefore seem to be dependent on the Nur77 gene.

To assess this interesting result, we compared the Nur77 (-/-) to the Double KO mice in the same experimental model. We found that Nur77 (-/-) and Double KO mice exhibited the same level of locomotor activity throughout the three-day trials. The mouse type was not a significant source of variation ( $F(1,47) = 0.0729$ ;  $p = 0.791$ ) whereas the day factor was, as the ANOVA showed ( $F(2,47) = 7.859$ ;  $p = 0.002$ ). As with the Nur77 (-/-) mice previously compared to Nur77 (+/+) mice, both the Double KO and Nur77 (-/-) mice showed a significantly greater distance traveled on the first day trial compared to the two following days ( $p = 0.002$  when comparing day 1 with day 2, and  $p = 0.001$  when comparing day 1 with day 3). According to these results, Nur77 (-/-) and Double KO mice display the same motor behavior in basal conditions (Fig. 2.2). Therefore, spontaneous locomotor activity seems to be dependent on the Nur77 gene, as its deletion seems to modulate the performance whereas the partial deletion of Nurr1 has no effect.

#### ***2.4.1.3 AMPH-induced locomotor activity***

*Ambulatory activity:* As expected, locomotor activity was significantly increased by an acute administration of AMPH (Figs 2.3 and 2.4A). The two-way ANOVA showed statistically significant differences in mouse type-related variations ( $F(3,46) = 7.379$ ;  $p < 0.001$ ) and treatment-related variations ( $F(1,46) = 31.068$ ;  $p < 0.001$ ). All mouse types exhibited a relatively identical level of ambulatory activity following saline injection. Following AMPH injection though, Nurr1 (+/-), Nur77 (-/-) and Double KO showed significantly increases of their respective ambulatory activity levels ( $p < 0.05$ ). There was a constant difference between the scores within every mouse types when comparing saline to AMPH-injected groups except for wild type mice ( $p = 0.054$ ). *Post-hoc* comparisons showed

that Nurr1 (+/-), Nur77 (-/-) and Double KO mouse types reacted in a significantly different way to the AMPH injection when compared to the wild-type counterparts (Nurr1 (+/-)  $p=0.003$ ; Nur77 (-/-)  $p=0.006$ ; Double KO  $p<0.001$ ). Interestingly, deletion of one or more of NR4A allele(s) results in an increased sensitivity to AMPH.

*Vertical activity:* We compared the vertical activity scores (rearing movements) as the second component of drug-induced locomotor activity (Fig. 2.4B). The Nurr1 (+/-) mice scored higher than all other mouse types in AMPH-injected conditions. The ANOVA showed a statistically significant mouse type-related variation ( $F(3,49)=13.726$ ;  $p<0.001$ ) but no overall significant variations related to treatment ( $F(3,49)=0.127$ ;  $p=0.723$ ). Obviously, the AMPH administration induced a significant increase in vertical activity within the Nurr1 (+/-) mice and exacerbated its vertical activity, although this observation is not statistically significant (Fig.2.4B). The Holm-Sidak comparison method showed that Nurr1 (+/-) mice vertical activity was significantly different from the other genotypes ( $p<0.001$  vs Nurr1 (+/+);  $p<0.001$  vs Nur77 (-/-);  $p=0.005$  vs Double KO).

*Non-ambulatory activity:* Finally, as to non-ambulatory activity, there were no significant differences at all (Fig 2.4C). All animals from the different genotypes reacted identically in both saline and drug-challenged conditions.

#### **2.4.1.4 HAL-induced catalepsy**

The catalepsy protocol enabled us to measure behavioural response to blockade of DA D2 receptors. We measured the catalepsy score (CS) prior to HAL (1.0 mg/kg) or saline injection and at 3 different time intervals after drug administration (30, 60 and 90 min). The CS is measured in seconds, 180 seconds being the maximum score.

At T(0), i.e. prior to the injections, there were no significant statistical differences between any of the mouse types evaluated. All animals swiftly moved away from the inclined platform (data not shown).

At T(30), results showed interesting differences (Fig. 2.5A). The two-way ANOVA showed significant differences in mouse type-related variations ( $F(4,49)=23.205$ ;  $p<0.001$ ), treatment-related variations ( $F(1,49)=194.932$ ;  $p<0.001$ ) and, most notably, in interactions between the two variables ( $F(4,49)=25.230$ ;  $p<0.001$ ). All wild type and Nurr1 (+/-) heterozygous mice injected with HAL showed a significant increase in CS, often reaching the maximal score (180 sec), whereas Nur77 (-/-) and Double KO mice CS remained similar to their saline-injected mates. In fact, the Holm-Sidak *a posteriori* comparisons showed that Nur77 (-/-) and Double KO mice cataleptic responses were significantly different from the wild type and Nurr1 (+/-) mice ( $p<0.001$ , in all cases). This test also showed, interestingly, that HAL treatment didn't significantly modify the CS of Nur77 (-/-) and Double KO mice ( $p=0.355$ ;  $p=0.348$ ).

At T(60), the two-way ANOVA results again showed some notable differences (Fig. 2.5B) as mouse type-related variations ( $F(4,48)=3.778$ ;  $p=0.011$ ), treatment-related variations ( $F(1,48)=78.086$ ;  $p<0.001$ ) and interactions between the two variables ( $F(4,48)=4.481$ ;  $p=0.004$ ) were all significant. CS score were again really high for all wild type and Nurr1 (+/-) mice but also higher for Nur77 (-/-) and Double KO than at the previous time interval, reaching as much as 80 sec. Double KO mice didn't statistically exhibit a significant response to HAL injection when compared to the saline-injected rodents but the Nur77 (-/-) mice did ( $p=0.041$ ). The very low CS of the saline-injected Nur77 -/- mice can somehow explain this difference. The Holm-Sidak comparison method showed interesting results as, once again, Nur77 (-/-) and Double KO mice's CS were significantly different from all wild type and Nurr1 (+/-) mice's scores ( $p=0.002$  Double KO vs Nurr1 (+/-) within HAL;  $p<0.001$  for all other comparisons within HAL). As showed in the previous time interval, there were also no significant differences between Nur77 (-/-) and Double KO mice CS ( $p=0.612$ ).

Finally, at T(90), as the CS of HAL-injected animals slowly went down, there were merely no mouse-type related significant differences ( $p=0.052$ ). There were still treatment-related significant differences ( $F(1,49)=37.660$ ;  $p<0.001$ ) but the Holm-Sidak comparisons showed no treatment-related differences within the HAL-injected Double KO group ( $p=0.285$ ). Nur77 (-/-) mice responded to HAL injection with a CS similar to the Double

KO ( $p=0.211$ ), therefore no significant differences between the two groups were noticed ( $p=0.406$ ). *Post hoc* comparisons also showed that Nur77 (-/-) and Double KO mice's CS were significantly different from all wild type and Nurr1 (+/-) mice scores ( $p=0.002$  Double KO vs Nurr1 +/- within HAL;  $p<0.001$  for all other comparisons within HAL). As the drug effects started to wave off, there were no statistically significant interactions between the two variables, mouse type and treatment.

These results show how, at different time intervals following the injection, the cataleptic output inherent to the blockade of D2 receptors is dependent on the animals' genotype. All along the testing sessions, the CS of Nur77 (-/-) and Double KO mice were significantly lower than the other mouse types. Furthermore, the fact that Nurr1 (+/-) mice exhibited the same cataleptic response as wild type mice demonstrates the importance of the Nur77 gene in the modulation of striatal dopaminergic neurotransmission when blockade of DA D2 receptors is involved. The knocking out of Nur77 distinctly alters the physiological response to neuroleptics and this effect is statistically identical in Double KO mice, suggesting that Nurr1 may somehow be idle in this process.

## **2.4.2 Biochemical analyses**

We measured ENK and DYN mRNA expression levels in different sections of the striatum (STDM, STDL, STVM and STVL) and nucleus accumbens (core and shell)(Fig. 2.6) after administration of AMPH and HAL.

### **2.4.2.1 ENK mRNA expression following acute AMPH treatment**

Acute administration of AMPH induced an upregulation of striatal ENK mRNA expression in various mouse types (Fig. 2.7). When comparing the Nur77(-/-), Double KO and wild type mice, the most striking result was the substantial increase in ENK mRNA expression within Double KO mice all across the striatal region (STVM, STVL, STDM, STDL) following AMPH injection. Nur77 (-/-) and wild type mice's ENK mRNA levels stayed relatively stable following AMPH injection. In the STVM, STVL and STDL



regions, the treatment (STVM  $F(1,29)=5.130$ ;  $p=0.033$ ; STVL  $F(1,29)=7.136$ ;  $p=0.013$ ; STDL  $F(1,29)=10.236$ ;  $p=0.004$ ) and the interaction between treatment and mouse type (STVM  $F(2,29)=3.559$ ;  $p=0.044$ ; STVL  $F(2,29)=5.563$ ;  $p=0.010$ ; STDL  $F(2,29)=5.733$ ;  $p=0.009$ ) were significant. In the STDM region, the mouse type ( $F(2,29)=3.558$ ;  $p=0.044$ ) and the interaction between mouse type and treatment ( $F(2,29)=3.770$ ;  $p=0.038$ ) were significant. The two-way ANOVA and *post hoc* comparisons indicate that the differences within the Double KO group were statistically significant in all striatal regions analyzed (STVM  $p=0.008$ ; STVL  $p<0.001$ ; STDM  $p=0.012$ ; STDL  $p<0.001$ ) whereas the drug had no effect on ENK mRNA levels in Nur77 (-/-) and wild type mice in all striatal regions. Since there were no significant differences between the mouse types in the saline-injected groups, the Double KO mice seem to be more sensitive to AMPH treatment, based on their distinct ENK mRNA increase patterns.

When comparing Nurr1 (+/-) and wild type mice, the two-way ANOVA showed statistically significant variations in ENK expression based on genotype and drug treatment (Fig. 2.7 E-F). Wild type mice expressed significantly more ENK mRNA following AMPH injection in the ventral parts of the striatum (STVM; Mouse type  $F(1,12)=5.127$ ;  $p=0.043$ , Drug treatment  $F(1,12)=7.618$ ;  $p=0.017$ ) whereas there were no significant differences in Nurr1 (+/-) mice ENK mRNA expression in the same conditions. Holm-Sidak multiple comparison test confirmed the validity of the higher ENK mRNA expression in wild type mice treated with AMPH ( $p<0.001$ ). In the STVL region, results from the ANOVA showed no significant variations based on genotype or drug treatment, but an interaction between the two variables was significant ( $F(1,12)=6.358$ ;  $p=0.027$ ). Once again, the increase in ENK mRNA expression only significantly occurred in wild type mice injected with AMPH ( $p<0.05$ ). According to these results, it seems the regulation of striatal peptide ENK following dopaminergic pharmacological stimulation is dependent on the normal expression of Nurr1 gene.

#### **2.4.2.2 DYN mRNA expression following acute AMPH treatment**

There were no significant differences in DYN mRNA expression in the whole striatal region when comparing wild type, Nurr1 (+/-), Nur77 (-/-) and Double KO mice,

according to our two-way ANOVA analyses (STVM  $F(3,48)=0.538$ ;  $p=0.659$ ; STVL  $F(3,48)=0.375$ ;  $p=0.771$ ; STDL  $F(3,48)=0.903$ ;  $p=0.448$ ) except for the STDM region ( $F(3,48)=2.992$ ;  $p=0.042$ )(Fig. 2.9). However, the post-hoc test did not indicate any precise source of variation. There were no statistically significant differences between saline and AMPH-injected groups within every mouse types either (STVM  $F(1,48)=0.0779$ ;  $p=0.782$ ; STVL  $F(1,48)=0.278$ ;  $p=0.601$ ; STDM  $F(1,48)=0.0513$ ;  $p=0.822$ ; STDL  $F(1,48)=0.205$ ;  $p=0.643$ ).

In the nucleus accumbens, results were quite different and far more interesting. In the core and shell regions of the structure, the two-way ANOVA showed no significant differences related to the genotype nor treatment, but the interactions between the two variables were significant (Core  $F(3,44)=4.176$ ;  $p=0.012$ ; Shell  $F(3,43)=5.820$ ;  $p=0.002$ ) (Fig 2.9 G-H). In both regions, Holm-Sidak multiple comparison test showed that the treatment was significant in the Nurr1 (+/-) mice (Core  $p=0.024$ ; Shell  $p=0.013$ ) and wild type (Core  $p=0.037$ ; Shell  $p=0.012$ ) mice as their DYN mRNA levels following AMPH injection respectively decreased and increased significantly. A striking result is the obvious decrease, by almost 40%, in DYN expression amongst the Nurr1 (+/-) mice following drug treatment (Fig. 2.9 G-H). In the core region, interestingly, the Double KO DYN mRNA level remained unchanged following AMPH injection but was significantly higher than Nurr1 (+/-) mice's and similar to the wild types'. In the STDM at the level of the nucleus accumbens, the two-way ANOVA detected significant differences related to the mouse type ( $F(3,43)=3.287$ ;  $p=0.032$ ) and to the interactions ( $F(3,43)=5.159$ ;  $p=0.005$ ) in between the mouse type and drug treatment. Again, the Holm-Sidak test showed significant differences in the DYN mRNA levels of wild type and Nurr1 (+/-) mice following AMPH injection, similar to ones observed in the core and shell regions. Interestingly, there were also significant differences within the saline condition, as the Nurr1 (+/-) mice's basal DYN mRNA level was significantly higher than the wild type's ( $p=0.005$ ) and the Double KO's ( $p=0.007$ ). Finally, in the rostral STDL, the two-way ANOVA showed a significant interaction between genotype and drug treatment ( $F(3,45)=6.212$ ;  $p=0.002$ ). The Holm-Sidak multiple comparison test pointed out some interesting results as within the AMPH condition, the Double KO mice expressed significantly more DYN mRNA than all other mouse types ( $p=0.006$  vs wild type;  $p<0.001$  vs Nurr1 (+/-);  $p=0.003$  vs Nur77 (-/-)).

Therefore, in several regions of the nucleus accumbens, there seems to be a difference in DYN regulation following psychostimulant drug treatment, but also in basal conditions, depending on the presence of NR4A alleles as Nurr1 (+/-) heterozygous, Double KO and wild type mice exhibit different responses.

#### **2.4.2.3 ENK mRNA expression following HAL treatment**

We also measured ENK mRNA expression in the striatum following HAL injections in the neuroleptic-induced catalepsy protocol (Fig. 2.10). Results proved to be significant in all four parts of the striatum, with mice having a Nur77 gene deletion (Nur77 -/- and Double KO) not showing a typical increase in striatal ENK following HAL injection. In the STVM ( $F(1,50)=8.032$ ;  $p=0.007$ ) and STDL ( $F(1,51)=19.798$ ;  $p<0.001$ ), the ANOVA showed statistically significant variations related to HAL injection, but none related to genotype. In the STVL (Mouse type  $F(5,50)=1.626$ ;  $p=0.176$ ; Treatment  $F(1,50)=13.007$ ;  $p<0.001$ ) and STDM (Mouse type  $F(5,50)=2.843$ ;  $p=0.028$ ; Treatment  $F(1,50)=21.941$ ;  $p<0.001$ ), the ANOVA showed statistically significant variations related to genotype and treatment although no statistically significant interactions between the two variables were detected. Hence, in all four sections of the striatum, Holm-Sidak multiple comparison method demonstrated that all mouse types with a full expression of Nur77 (Nurr1 +/+, Nurr1 +/- heterozygous) expressed a significant ( $p<0.05$ ) increase of striatal ENK mRNA following HAL injection. Double KO and Nur77 -/- mice's ENK mRNA expression stayed relatively unchanged following this pharmacological challenge. Interestingly, this is correlated with the behavioral measurements in the neuroleptic-induced catalepsy protocol, which preceded the biochemical measurements, as mice lacking the Nur77 -/- gene displayed a truncated cataleptic output.

## 2.5 Discussion

Within the central nervous system, orphan nuclear receptors of the NR4A subfamily are closely related to the functioning of DA systems. In fact, Nurr1 is essential for the development and survival of DA neurons (Kadkhodaei et al., 2009) whereas several evidence lines suggest that Nur77 has a potent role in modulating DA neurotransmission in the adult brain (Ethier et al., 2004; St-Hilaire et al., 2006; Gilbert et al., 2006). Moreover, the relationship between DA and Nur77 seems to be reciprocal, as dopaminergic drug challenges and lesions modulate its expression (Lévesque and Rouillard, 2007) and deletion of Nur77 gene has strong effects on DA-mediated behaviors and neurochemistry. We sought to determine if these nuclear receptors, although located in different cell populations of the basal ganglia, might interact differently with neurotransmission by analyzing behavioral and biochemical data relative to various strains of transgenic mice. Our results suggest distinct roles for Nurr1 and Nur77 and a functional interaction between these in basal and drug-challenged conditions..

In the open field test, there were no statistically significant differences in between wild type, Nur77 (-/-), Nurr1 (+/-) and Double KO mice as to the latency to first entry in the central zone. This test was used to investigate the normal anxiety-like behaviors the animals express when introduced into a novel environment. Since all mouse types took about the same mean time to enter the central zone, we conceive that neither Nurr1 nor Nur77 directly influence anxiolysis. We also measured the distance traveled by the animals during the testing session as an indication of short-time spontaneous locomotor activity. This time, Nurr1 heterozygous mice showed a significant increase of the distance traveled when compared to wild type mice. These results suggest that these two nuclear receptors play a marginal role in the adaptation to a novel environment.

On a three-day wheel-running trial, Nur77 (-/-) and Double KO mice were significantly more active than wild type and Nurr1 (+/-) heterozygous mice. Although this is only valid on the first day trial, as their respective activity levels lowered down to reach the wild type's in the final two days, it is interesting to see how the Double KO and Nur77 (-/-) activity levels were similar. Nur77 (-/-) mice are known to be more active in the first

few hours of testing (Gilbert et al., 2006) and our laboratory has shown that there are no significant differences between *Nurr1* (+/-) and wild type mice as to basal locomotor activity on a three-day test. However, on a longer period, *Nurr1* (+/-) mice are known to be significantly less active as normal wild type mice's locomotor activity increases, influenced by dopaminergic reward mechanisms (Werme et al., 2003). Hence, although there seems to be an important long-term *Nurr1*-related regulation of locomotor activity or its natural reward, *Nur77* rather seems to be involved in short-term regulation of basal locomotor activity. Since the behavioral effect of a *Nurr1* reduction only seems to appear on longer terms, it would be interesting to monitor Double KO mice's locomotor activity for several days as these data would hypothetically give us a further insight on the influence of *Nur77* and *Nurr1*, and their interaction, in the context of basal locomotor activity.

Subsequently, we monitored locomotor activity in a context of pharmacological stimulation. We used D-AMPH, a well-known psychostimulant that interferes with DA neurotransmission in multiple ways, to analyze ambulatory activity, rearing movements and non-ambulatory activity. Non-ambulatory activity, also referred to as stereotyped movements, is a state of global immobility accompanied by rapid sniffing and licking frequently encountered in rodents treated with psychostimulants (Kuczenski, 2008). Hence, this feature is also important when considering the influence of psychostimulants on rodent's locomotion. *Nur77* (-/-) animals are known to exhibit a higher basal locomotor activity (Gilbert et al., 2006) and an exacerbated behavioral response to AMPH (Bourhis et al., 2009). In parallel, *Nurr1* (+/-) animals also exhibit a higher level of ambulatory activity following AMPH injection (Rojas et al., 2007). Our results demonstrate the same as to *Nurr1* (+/-) and *Nur77* (-/-) mice. Interestingly, Double KO mice also responded in the same fashion. Indeed, all three genotypes showed a significantly greater ambulatory activity following AMPH injection when compared to wild type mice and there were no significant differences between them. It seems like the behavioral sensitivity to psychostimulants expressed by *Nur77* (-/-) and *Nurr1* (+/-) animals is preserved in Double KO rodents. As to rearing movements and vertical activity, our results were quite different. Interestingly, only the *Nurr1* (+/-) heterozygous mice exhibited arguably more rearing movements post-AMPH injection, although this did not turn up to be statistically significant. The Double KO and *Nurr1* (+/-) mice were statistically different from the wild

type mice as both mouse types exhibited more rearing movements in both the saline and AMPH conditions. It is interesting to see that this exploratory behavior, definitely more present amongst the heterozygous animals, is exacerbated by the AMPH injection. What is also intriguing is the fact that these mice traveled a higher distance in the open-field test as they were confronted to a novel environment. Hence, the loss of a *Nurr1* allele might be related to an increased exploratory activity in basal and psychostimulant-enhanced conditions. Finally, there were no significant differences in between all mouse types as to stereotyped movements. These movements generally occur following repetitive psychostimulant treatments as the ambulatory activity lowers down. Generally speaking, it is interesting to see that following an acute pharmacological stimulation of the dopaminergic system, the Double KO mice reacted mostly like the *Nurr1* (+/-) and *Nur77* (-/-) mice.

Following these behavioral analyses, we measured ENK and DYN mRNA levels in the striatum and nucleus accumbens. Psychostimulants are known to increase the expression of ENK in cell populations of the basal ganglia as a result of indirect DA receptors stimulation (Gonzalez-Nicolini et al., 2003). There is a growing evidence of an interaction between these neuropeptides and *Nur77* as the latter is induced in ENK-containing cells following AMPH stimulation (Gonzalez-Nicolini, 2002). We show here that ENK mRNA expression does not increase in *Nurr1* (+/-) mice following AMPH treatment when compared to wild type mice. Hence, it suggests that the full expression of *Nurr1* is necessary for the normal modulation of ENK following AMPH administration. By comparing *Nur77* (-/-) to Double KO mice, we found that striatal ENK mRNA levels only significantly increased in Double KO mice, surprisingly. There were no significant differences in the striatal ENK mRNA levels in *Nur77* (-/-) mice following AMPH treatment, much like the results we obtained from the *Nurr1* (+/-) heterozygous mice. Interestingly, the levels of ENK mRNA in the striatum of all mouse types are similar, if not identical, in saline-injected conditions. Hence, the increase of ENK mRNA in the Double KO mice seems to be directly ascribable to the injection of AMPH. Therefore, it seems as the partial deletion of *Nurr1* and the total deletion of *Nur77* modulates the ENK output in a completely different way when stimulated with AMPH, although these Double KO mice exhibited a similar level of locomotor activity as the *Nur77* (-/-) and *Nurr1* (+/-) animals.

When measuring the striatal DYN mRNA levels of the same mouse types following the AMPH injection, there were no significant drug-related differences in the medial and caudal parts of striatum. There seems to be a slight increase amongst the wild type mice, as this would normally be expected following the injection of AMPH, but this did not turn up statistically. The results were similar in Nurr1 (+/-), Nur77 (-/-) and Double KO mice as there were no statistically relevant changes in DYN mRNA expression. However, the patterns of DYN expression decrease in Nurr1 (+/-) mice and increase in Double KO mice were interesting cues for further investigation as these results directly hint at possible differences in neuropeptide regulation following DA stimulation. In this perspective, we investigated the DYN expression levels in the nucleus accumbens and some interesting results arose. In wild type mice, the levels of DYN mRNA increased significantly (by as much as 50%) following the AMPH injection in the core, shell and in the dorsomedial part of the striatum located at the level of the nucleus accumbens. In Nurr1 (+/-) mice however, the DYN mRNA levels were significantly higher in saline conditions but drastically lowered down (by as much as 40%) following AMPH treatment. There were no significant differences amongst the Nur77 (-/-) mice, although there seems to be a similar decrease pattern in the core and shell regions. Interestingly, the DYN mRNA levels in the nucleus accumbens in the Double KO mice remained high following saline or AMPH injections. These striking differences amongst the mouse types in DYN regulation following DA stimulation clearly show the importance of Nurr1 in the regulation of DA neurotransmission but also hint at the possibility of an interaction in between Nurr1 and Nur77, as Double KO animals show a distinct range of ENK and DYN expression from Nur77 (-/-) and Nurr1 (+/-) animals in this context.

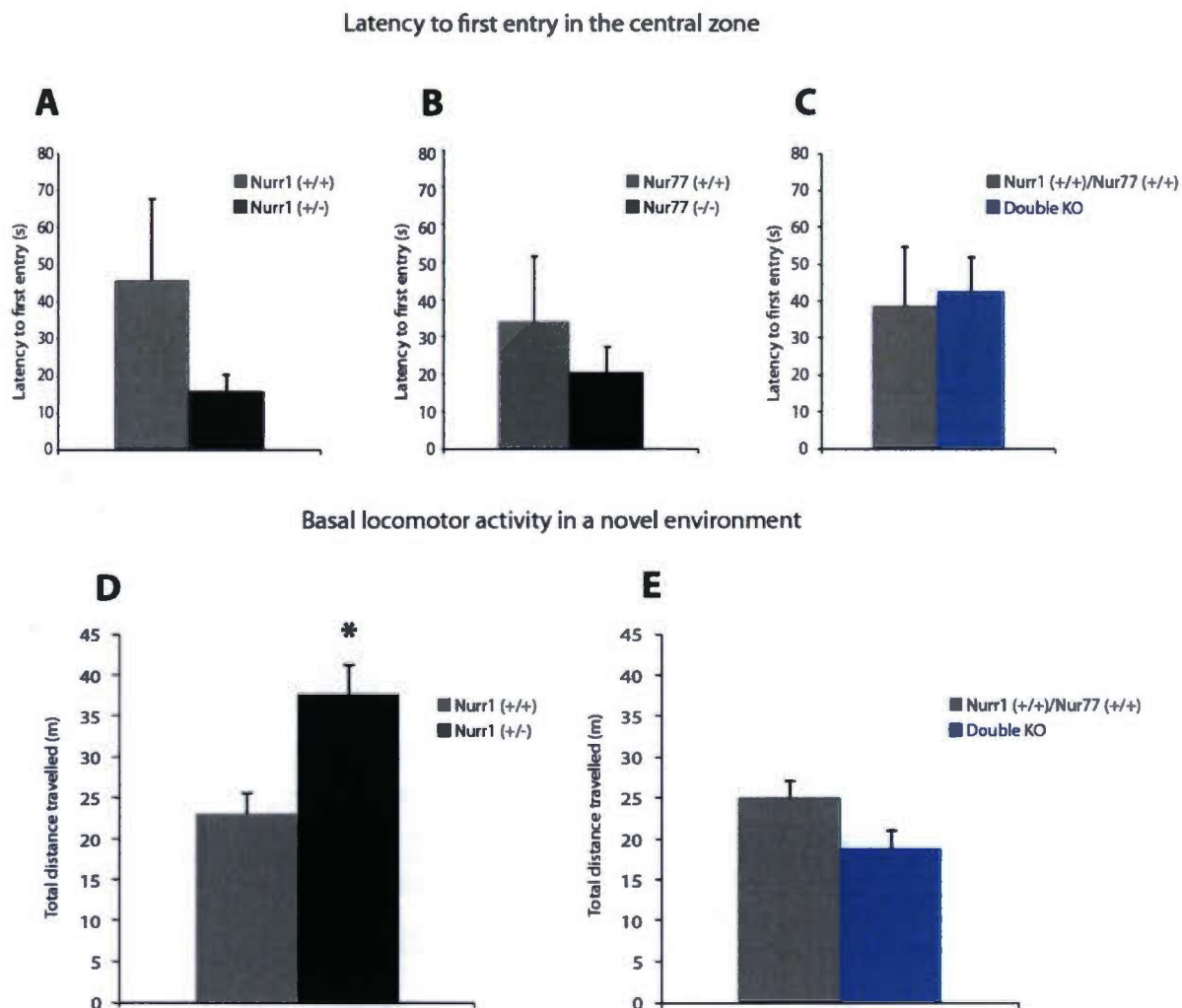
To complete our behavioral study of the Double KO phenotype, we analyzed its output following a blockade of D2 receptors. First generation of antipsychotic drugs used to treat schizophrenia share this pharmacological property and are known to induce extra pyramidal symptoms such as catalepsy. In previous works centered on the study of schizophrenia, it has been demonstrated that antipsychotic medication induces expression of both Nurr1 and Nur77 (Maheux et al., 2005). It has also been reported that Nur77 (-/-) animals' response to antipsychotics is strongly reduced (Ethier et al., 2004) when compared to wild type animals. We show here that wild type and Nurr1 heterozygous mice showed a

normal HAL-induced cataleptic response. Nur77  $-/-$  mice, as expected, displayed a significantly reduced catalepsy score following the same drug treatment. Interestingly, the Double KO mice exhibited the same truncated cataleptic output as the Nur77  $(-/-)$  throughout the whole 90 min testing session. Both mouse types were significantly different from the wild type and heterozygous mice at the different time intervals. At 60 min following the injection, Double KO and, mainly, Nur77  $(-/-)$  mice showed an increase in catalepsy score, but these data were still largely inferior to the scores of the wild type and heterozygous mice. Although the specific cellular mechanisms by which neuroleptics take action are still elusive and misunderstood, we know Nur77 is directly involved in the process. Since the Double KO mice reacted like the Nur77  $(-/-)$  mice, its importance seems to be prevailing over Nurr1. Furthermore, when analyzing the ENK mRNA levels following the HAL injections, the most interesting result was by far the similarities in between Nur77  $(-/-)$  and Double KO mice's striatal expression of the neuropeptide. Indeed, in all four scouted regions of the striatum, the ENK mRNA levels following the injection of HAL were significantly higher in wild-type and Nurr1  $(+/-)$  mice whereas they remained relatively unchanged in Nur77  $(-/-)$  and Double KO mice. It is interesting to see that Nur77  $-/-$  and Double KO mice share the same behavioral and biochemical properties in the context of antipsychotics drug-challenge. It is clear that in this context, the Double KO phenotype depends definitely on the knock out of the Nur77 gene despite a 50% reduction of Nurr1 expression in the substantia nigra.

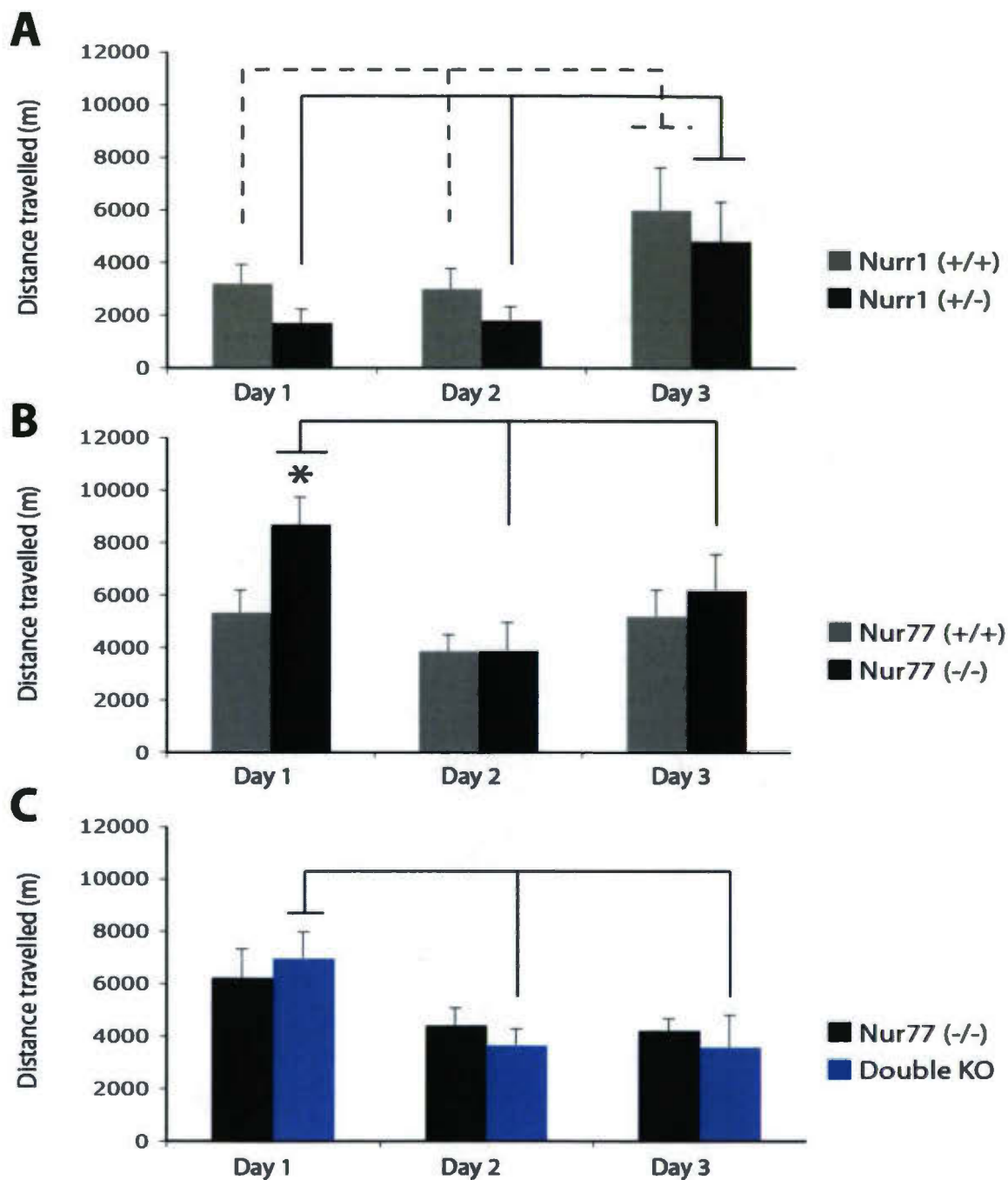
In conclusion, although other tests are needed to confirm the impact of Nurs gene partial and total deletion on the modulation of DYN and ENK neuropeptides, we can assert that Nurr1 and Nur77 are functionally interacting within the regulation of DA systems and this interaction may very well be context-dependant. Indeed, as far as our results go, the Double KO phenotype is ascribable to the deletion of Nur77 in many contexts such as basal locomotor activity and neuroleptic-induced catalepsy. However, their behavioral output following psychostimulant injection also resembles the Nurr1 heterozygous phenotype. Their patterns of neuropeptide expression also differ depending on the context, as their ENK expression following HAL injection resembles that of Nur77  $(-/-)$  mice, their ENK expression following AMPH injection are significantly different from the Nur77  $(-/-)$  genotype and their DYN expression in the same conditions are simply unique and do not



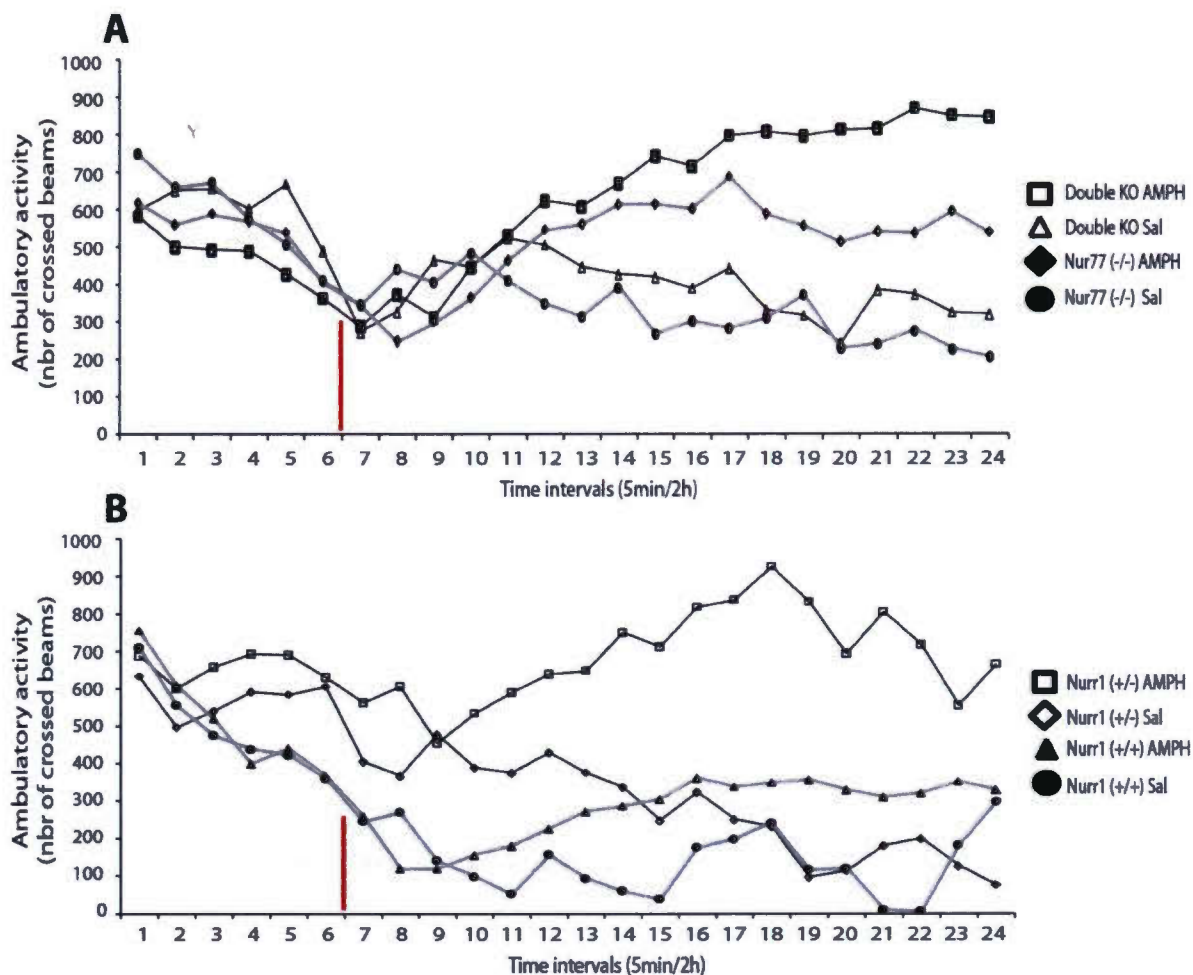
resemble at all the decrease pattern exhibited by the *Nurr1* heterozygous animals. Collectively, these results strongly suggest that these two nuclear receptors/transcription factors exert complex modulatory influences on DA neurotransmission; sometimes having redundant or distinct roles but other times interacting together.



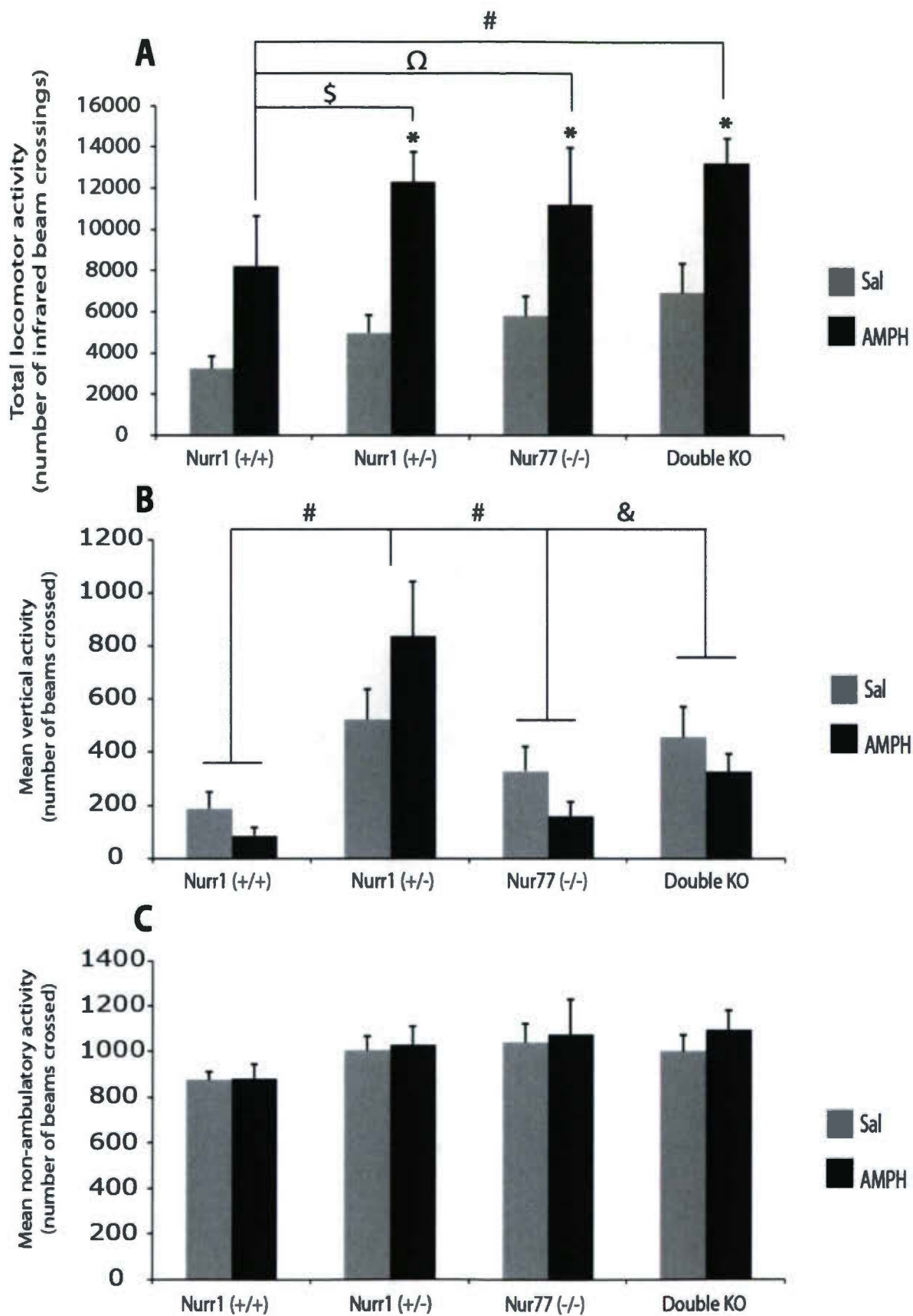
**FIG. 2.1 Basal locomotor activity in an open field.** In A, B and C, we measured the time spent to enter the central zone for the first time as a measure of normal anxiety in a novel environment. There were no significant differences in between all the different mouse types tested. (D) Nurr1(+/-) heterozygous mice traveled a significantly greater distance (\* $p < 0,05$ ) than wild type mice in a short-time period. (E) There were no significant differences in between wild type and Double KO mice as to short-time locomotor activity.



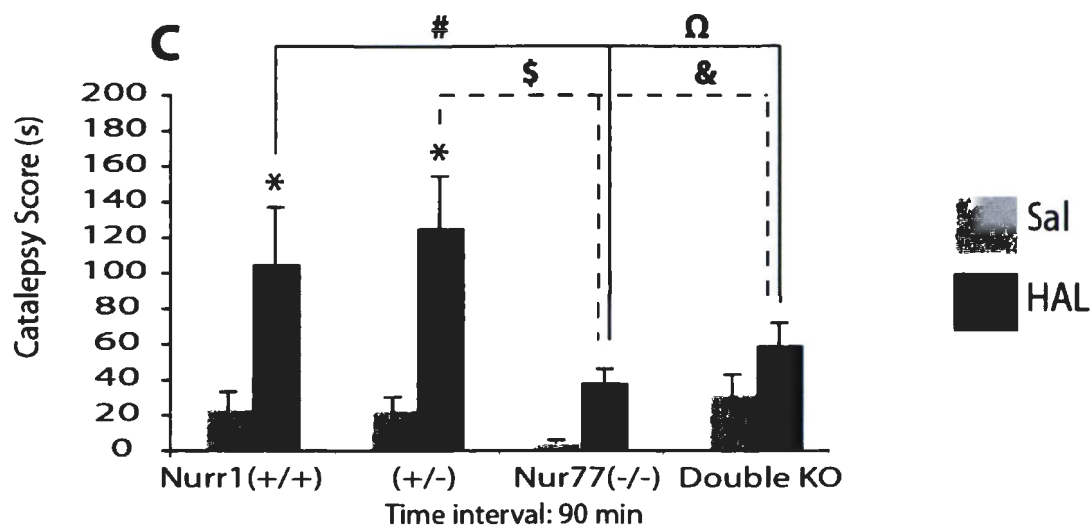
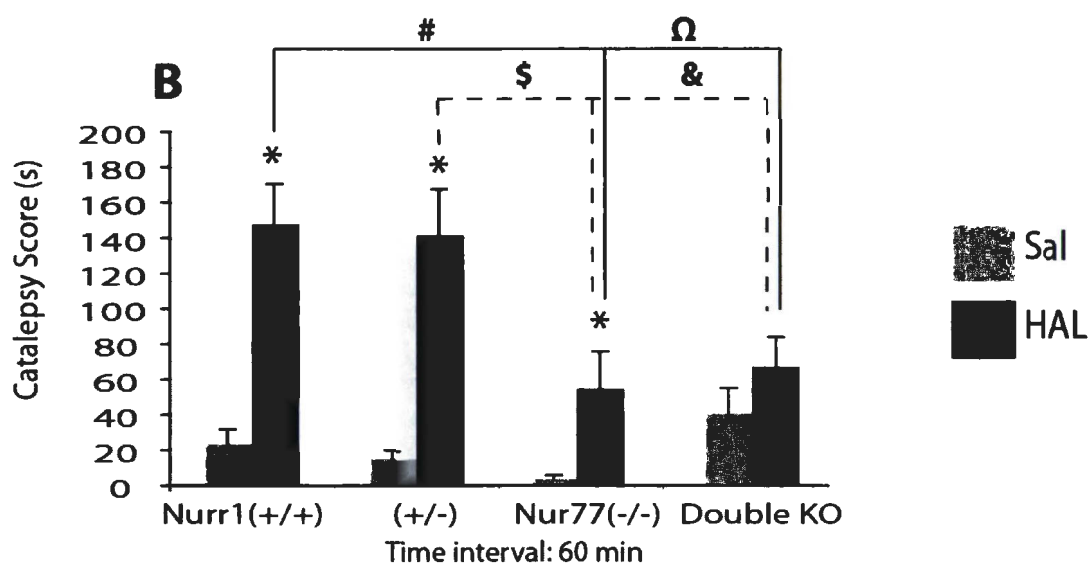
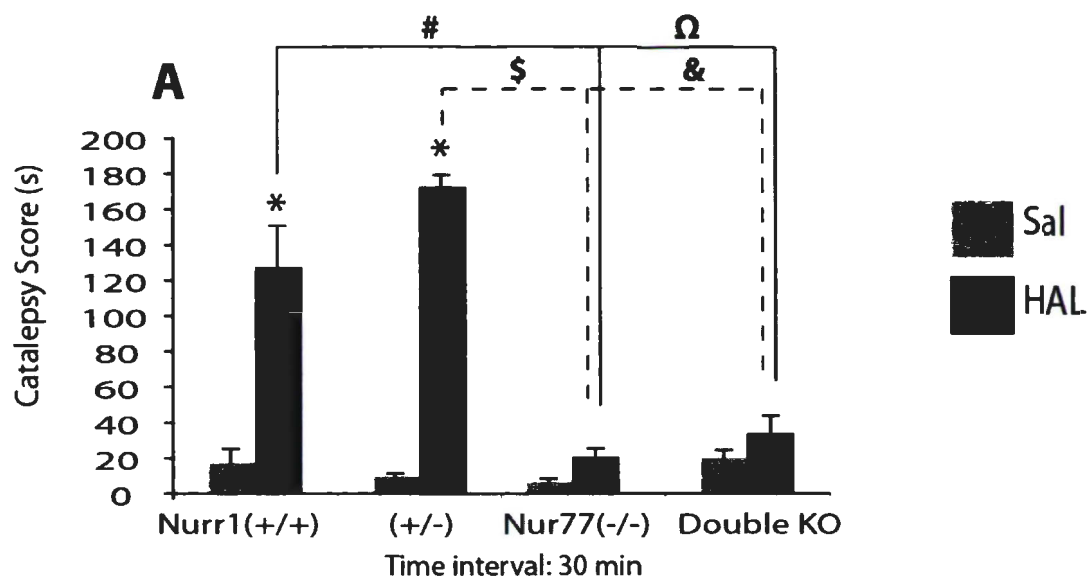
**FIG. 2.2: Basal locomotor activity in a wheel-running system.** (A) There were no significant differences in between Nurr1 (+/+) wild type and Nurr1 (+/-) mice. Both mouse types were significantly more active on the third trial day ( $p < 0,05$ ). (B) Nur77 (-/-) mice were significantly more active on the first day trial than wild type mice ( $*p < 0,05$ ) but their respective levels of locomotor activity were similar on the two final days. (C) There were no significant differences in between Nur77 (-/-) and Double KO mice. However, both mouse types exhibited the same pattern of increased locomotor activity on the first day trial when compared to the following days.



**FIG. 2.3: Time course of AMPH-induced ambulatory activity.** (A) Double KO and Nur77 (-/-) mice were significantly more active following the AMPH injection. Although Double KO mice seem to be more active than Nur77 (-/-) mice in the final 5 time intervals, they were not significantly different one from another. (B) AMPH-injected Nurr1 (+/-) mice were significantly more active ( $p < 0,05$ ) than wild type mice.

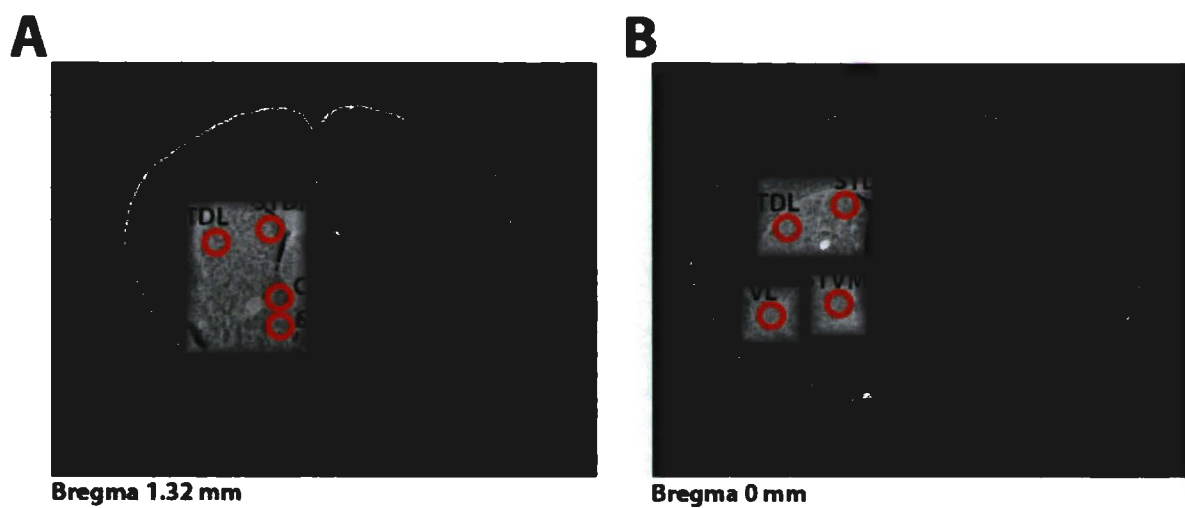


**FIG. 2.4: AMPH-induced locomotor activity, vertical activity and non-ambulatory activity.** (A) AMPH induced a significant increase in locomotor activity ( $*p < 0,05$ ) in *Nurr1* (+/-), *Nur77* (-/-) and Double KO mice. The three mouse types were significantly different from the wild type mice ( $\#p < 0,001$ ;  $\Omega p = 0,006$ ;  $\$p = 0,003$ ), which hints at the possibility of a special sensibility of these genotypes to AMPH and psychostimulants. (B) There were no significant differences in the amount of rearing movements amongst wild type, *Nur77* (-/-) and Double KO mice following AMPH injection. However, the global *Nurr1* (+/-) heterozygous mice's behavior was significantly different from all the other mouse types in the AMPH condition ( $\#p < 0,001$ ;  $\&p = 0.005$ ). (C) There were no significant differences in between all mouse types as to stereotyped movements.

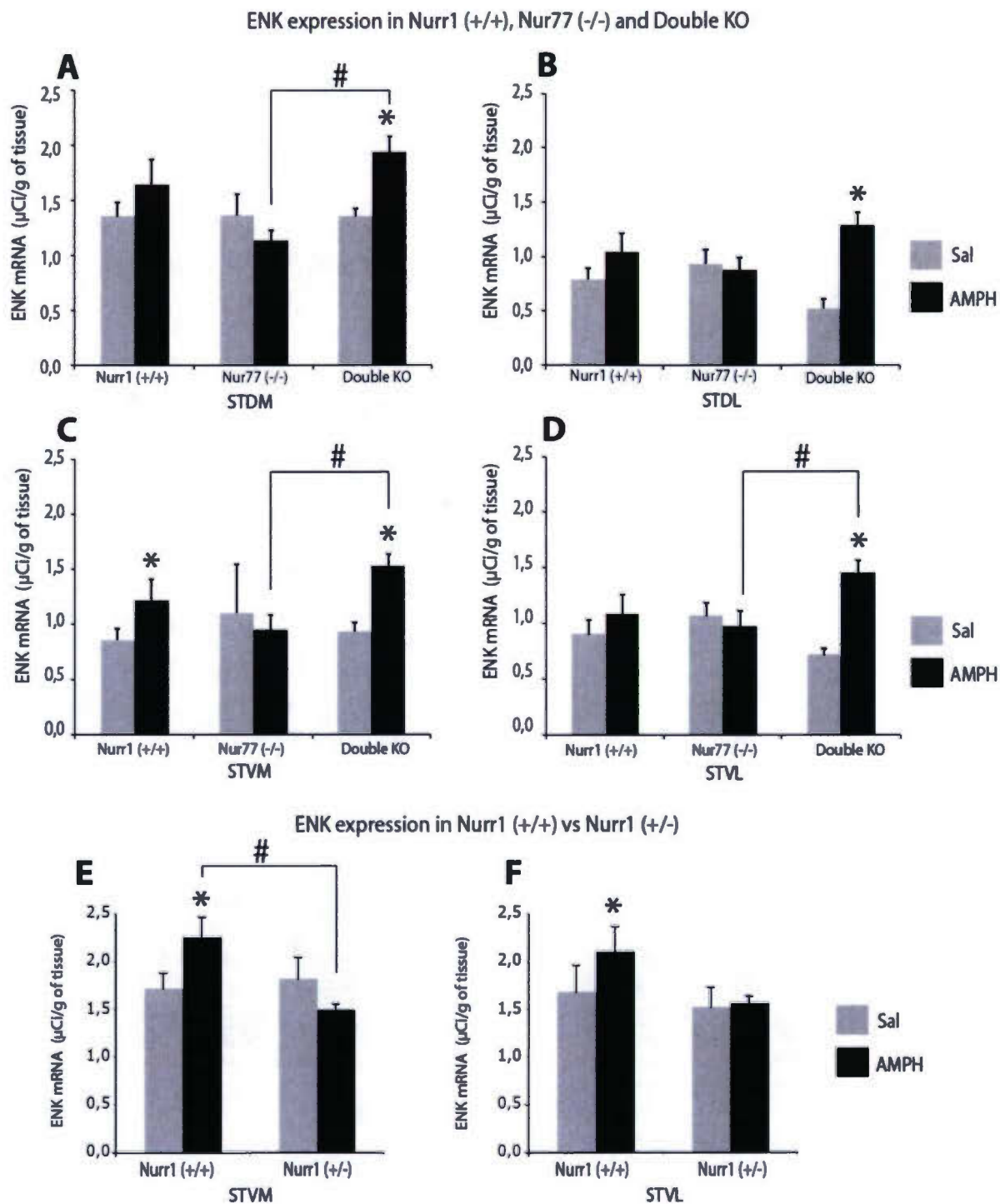


**FIG. 2.5: HAL-induced catalepsy.** (A) At 30 min, only wild type and Nurr1 (+/-) mice exhibited a cataleptic output following HAL injection. This interesting result proved to be significant ( $*p < 0,05$ ) and, most notably, related to treatment and genotype. Comparisons between mouse types following HAL administration are also shown (Nurr1(+/+) vs Nur77 (-/-)  $\# < 0,001$ ; Nurr1 (+/+) vs Double KO  $\Omega < 0,001$ ; Nurr1 (+/-) vs Nur77 (-/-)  $\$ < 0,001$ ; Nurr1 (+/-) vs Double KO  $\& < 0,001$ ). (B) 60 min following injections, results were similar as Nur77 (-/-) and Double KO mice response to HAL was significantly less important than wild type and Nurr1 (+/-) heterozygous mice ( $p = 0,011$ ,  $*p < 0,05$ ) but Nur77 (-/-) mice significantly showed an increase in CS whereas Double KO mice did not ( $\# < 0,001$ ;  $\Omega < 0,001$ ;  $\$ < 0,001$ ;  $\& = 0,002$ ). (C) At 90 min, the results were similar, as both Nur77 (-/-) and Double KO mice showed a significantly less important cataleptic output following HAL injections ( $*p < 0,05$ ) and comparisons between mouse types following HAL administration were again identically significant ( $\# < 0,001$ ;  $\Omega < 0,001$ ;  $\$ < 0,001$ ;  $\& = 0,002$ ).

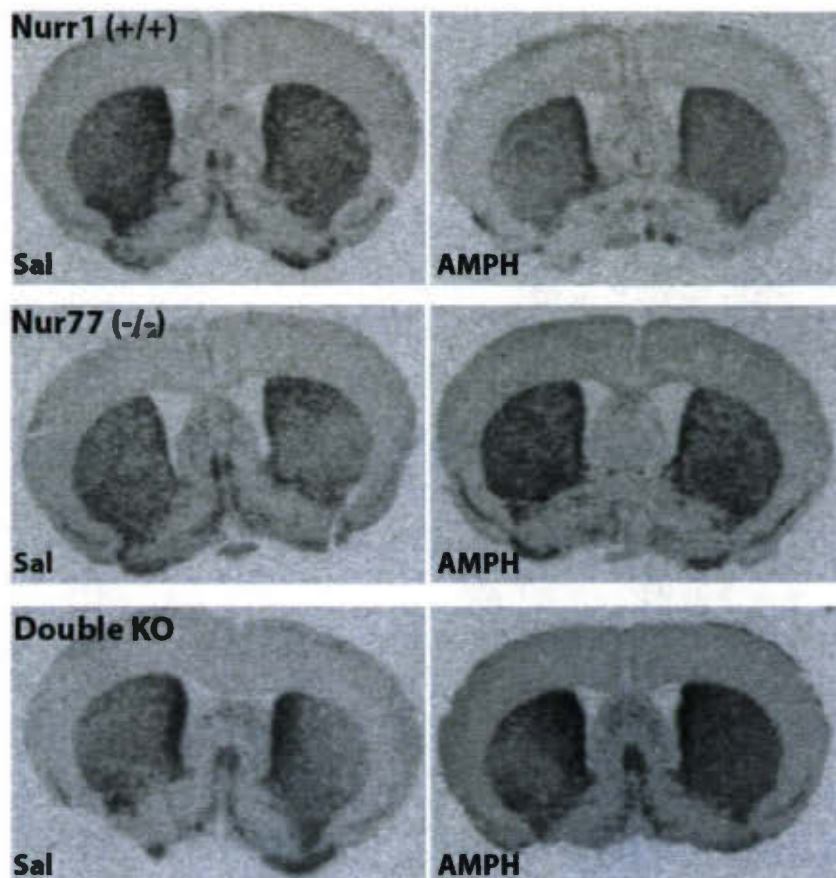




**FIG. 2.6: Identification of the different cerebral areas investigated in the expression of neuropeptides ENK and DYN.** A) Nucleus accumbens (Core and Shell sections) and rostral striatum sections (STDL and STDM). B) Posterior striatum regions (STDL, STDM, STVL and STVM).

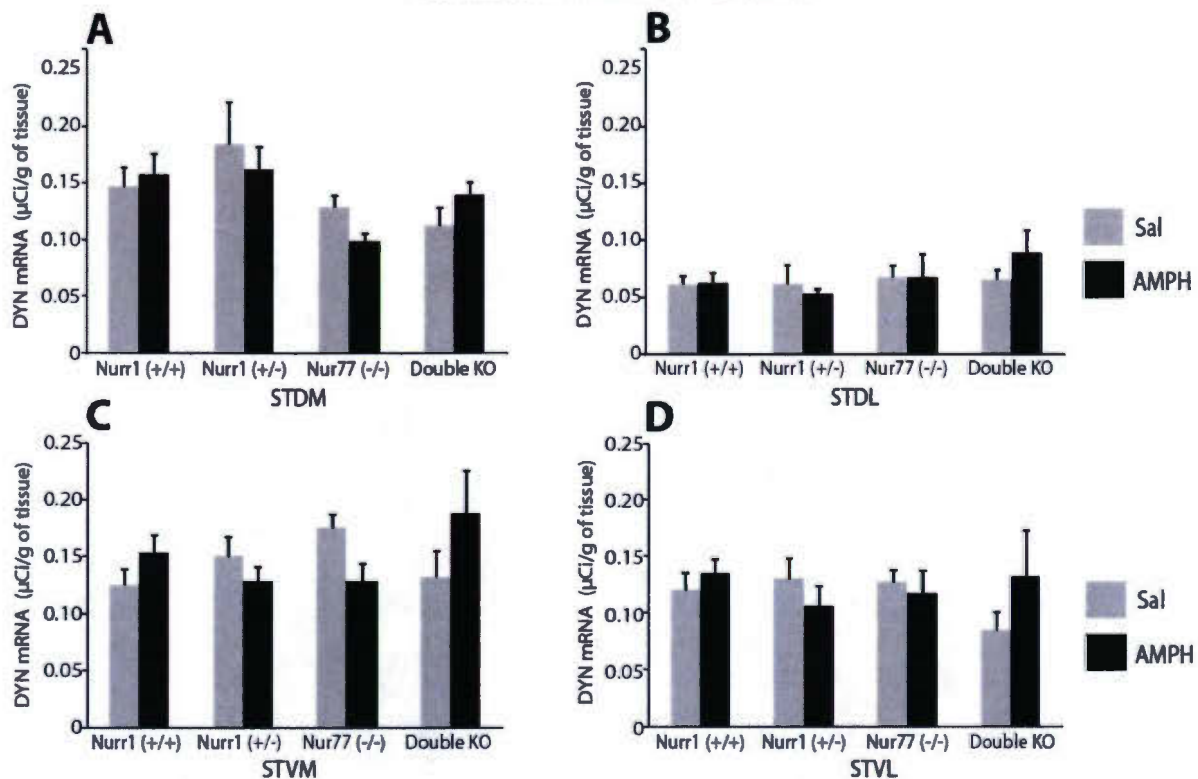


**FIG. 2.7: AMPH-induced striatal ENK mRNA expression.** (A,C,D) Double KO mice reacted significantly differently from Nur77 (-/-) mice following AMPH injection ( $p < 0,001$  STDM, # $p = 0,009$  STVM,  $p = 0,013$  STVL,) (A,B,C,D) Double KO mice showed a significantly increased ENK mRNA expression following AMPH injection in all four regions of the striatum (\* $p < 0,05$ ). (E, F) There were only significant differences in wild type mice as to ENK mRNA expression following AMPH injections in both STVM and STVL (\* $p < 0,05$ ; # $p < 0,01$ ).

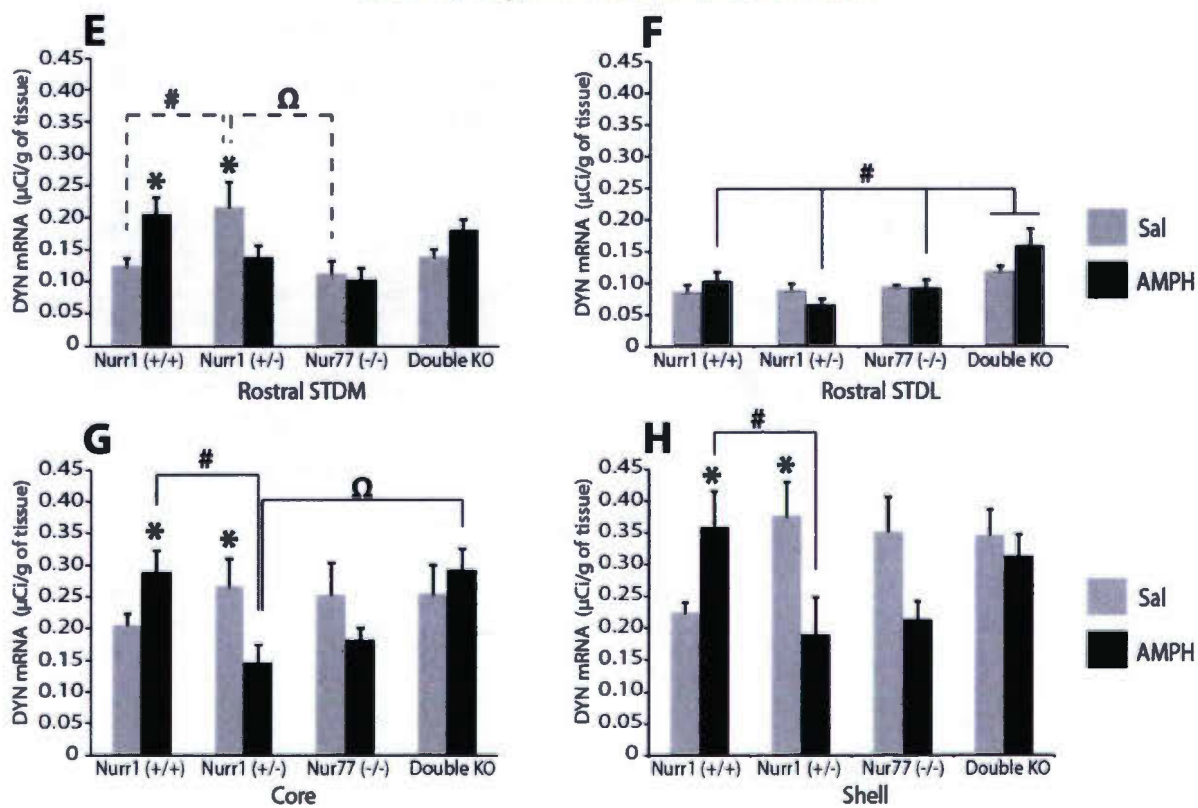


**FIG. 2.8:** Examples of the autoradiographic data obtained from each tested group in the measure of AMPH-induced striatal ENK mRNA expression.

## DYN mRNA expression in the striatum

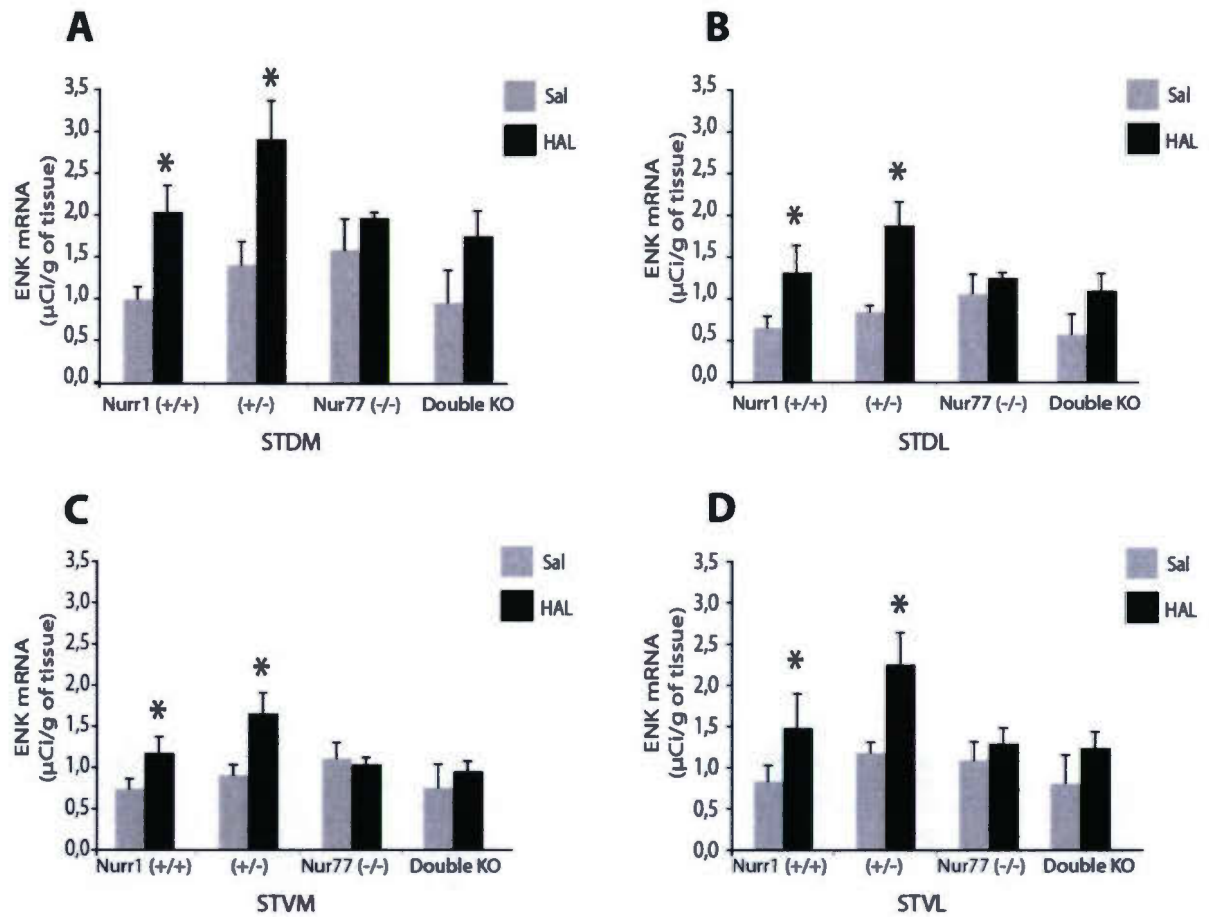


## DYN mRNA expression in the nucleus accumbens

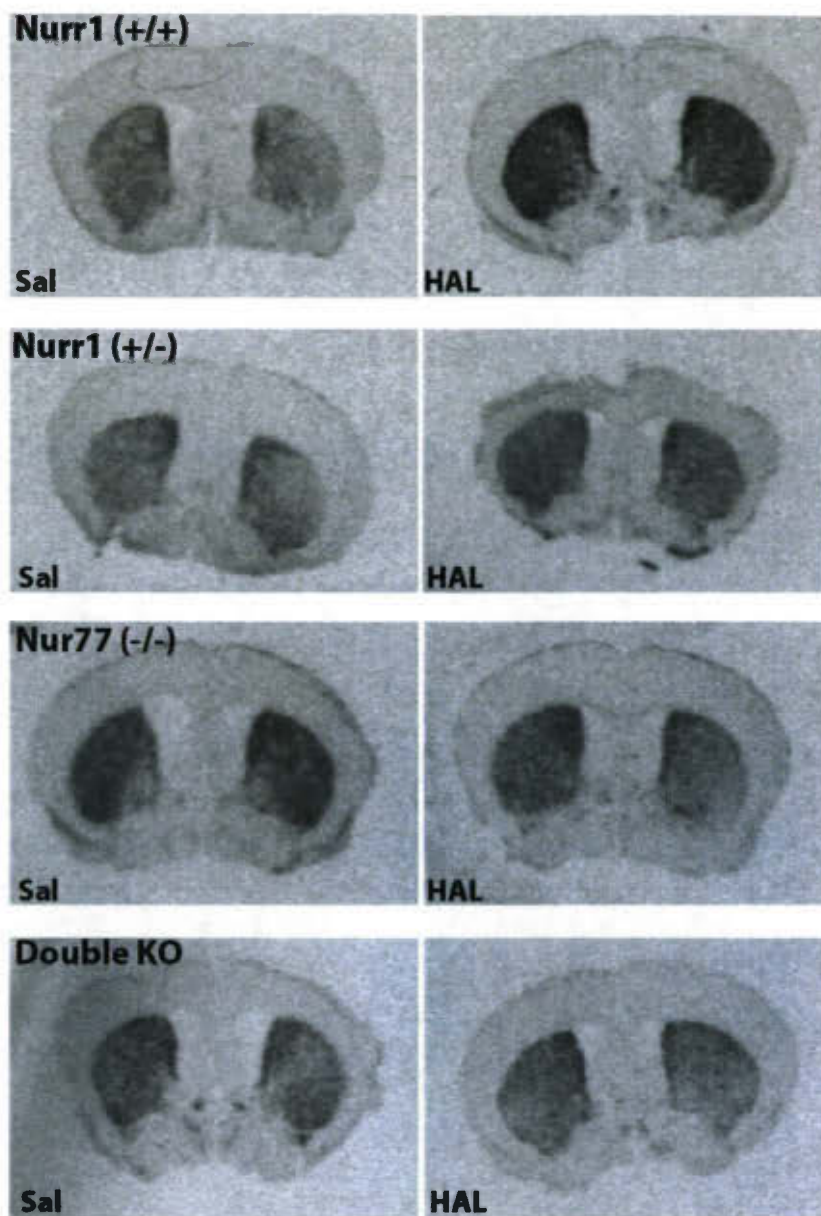


**FIG. 2.9: AMPH-induced DYN mRNA expression.** (A,B,C,D) There were no significant differences in between all mouse types in all four regions of the striatum as to DYN expression. (E) In the rostral STDM region, Nurr1 (+/-) and wild type mice also reacted significantly but in different ways to the AMPH treatment (\* $p < 0,005$ ). Interestingly, there were significant genotype-related differences in the saline-injected groups as the basal DYN mRNA expression level of Nurr1 (+/-) mice was significantly higher than wild type (# $p = 0,005$ ) and Double KO mice ( $\Omega p = 0,007$ ). (F) In the rostral STDL, AMPH-injected Double KO mice expressed significantly more DYN mRNA than any other mouse type (# $p < 0,010$ ). (G) In the Core region, following AMPH injection, the DYN mRNA expression levels were significantly different in Nurr1 (+/-) and wild type mice (\* $p < 0,05$ ; # $p = 0,004$ ). The Nurr1 (+/-) decrease in DYN mRNA is also significantly different from the Double KO's levels following AMPH injection ( $\Omega p = 0,009$ ). (H) In the Shell region, Nurr1 (+/-) and wild type mice also reacted significantly but in different ways to the AMPH treatment (\* $p < 0,005$ ) and the difference in DYN mRNA levels within the AMPH-injected animals of the two mouse types remained significant (# $p = 0,008$ ).

## ENK expression in HAL-induced catalepsy



**FIG. 2.10: HAL-induced striatal ENK mRNA expression.** All wild type and Nurr1 (+/-) heterozygous mice showed a significant increase in ENK expression following HAL injection (\* $p < 0,05$ ) whereas Nur77 (-/-) and Double KO mice ENK expression stayed relatively stable under the same conditions. (A, D) In the STVL and STDM, both genotype and drug treatment (\* $p < 0,05$ ) proved to be significant as, again, Nur77 (-/-) and Double KO mice's ENK mRNA levels didn't increase following HAL injection. (B) In the STDL, HAL injection induced significant increases in ENK mRNA expression in wild type and Nurr1 (+/-) heterozygous mice ( $p < 0,05$ ).



**FIG. 2.11: Examples of the autoradiographic data obtained from each tested group in the measure of HAL-induced striatal ENK mRNA expression.**

CHAPITRE 3  
DISCUSSION & CONCLUSION



### 3.0 DISCUSSION & CONCLUSION

Plusieurs données de la littérature démontrent hors de tout doute que Nur77 est un facteur très important de la modulation de la neurotransmission dopaminergique aussi bien au niveau basal que lorsque celle-ci est augmentée ou bloquée par diverses drogues dopaminergiques (Éthier et al., 2004, St-Hilaire et al., 2006, Gibert et al., 2006, pour revue, Lévesque et Rouillard, 2007). Cependant, malgré que le rôle de Nurr1 soit bien connu par rapport au développement et à la survie des neurones dopaminergiques mésencéphaliques (Kadkhodaei et al., 2009), très peu d'études se sont intéressées à son rôle potentiel au niveau de la transmission dopaminergique chez l'animal adulte. Collectivement, nos résultats suggèrent fortement que ces deux récepteurs nucléaires/facteurs de transcription exercent des effets modulateurs complexes sur la transmission dopaminergique et qu'ils ont des rôles parfois fonctionnellement redondants, parfois distincts et que dans certaines situations ils interagissent entre eux. En premier lieu, nos résultats démontrent que les comportements médiés par la dopamine sont régularisés principalement par Nur77. Plus précisément, nous démontrons que l'activité locomotrice de base, l'activité locomotrice induite par l'amphétamine et la catalepsie induite par l'halopéridol sont principalement médiées par Nur77. Nurr1 aurait un rôle redondant à Nur77 seulement dans la modulation des effets locomoteurs de l'amphétamine. Au contraire, Nurr1 tout comme Nur77 joue un rôle prépondérant dans modulation des neuropeptides striataux induite par les drogues dopaminergiques. Ainsi, l'expression de l'enképhaline et de la dynorphine après administration d'amphétamine dépend à la fois de Nurr1 et de Nur77. Les résultats chez nos souris Double KO suggèrent également des interactions entre ces deux récepteurs nucléaires. Par contre, l'augmentation de l'expression de l'enképhaline dans le striatum suite à l'administration de l'halopéridol, un antagoniste dopaminergique, est uniquement dépendante de Nur77 tout comme l'est la catalepsie induite par cette drogue.

### 3.1 Activité exploratoire et activité locomotrice spontanée

Nos résultats démontrent que l'activité locomotrice spontanée à court terme en conditions basales dépend essentiellement de Nur77. La délétion de Nur77 entraîne une augmentation significative du niveau d'activité locomotrice spontanée mesurée par un dispositif de roue d'activité placée dans la cage de l'animal (*Wheel-Running*) et ce au jour#1. Les souris Double KO, ayant eu une délétion complète de Nur77 et une délétion partielle de Nurr1, se comportent de façon identique aux souris Nur77 (-/-). Cela est en accord avec les travaux précédents de notre laboratoire démontrant que Nur77 est impliqué dans la régulation du comportement locomoteur à court terme (Gilbert et al., 2006). D'un autre côté, la réduction de l'expression de Nurr1 ne semble pas avoir d'effet sur le niveau d'activité spontanée (présents travaux et Baillargeon et Rouillard, résultats non publiés). Il est à noter que littérature suggère que les souris Nurr1 (+/-) présentent une particularité additionnelle. Alors que le niveau d'activité des souris sauvages augmente sensiblement sur une plus longue période d'observation probablement à cause d'un effet d'entraînement, les animaux hétérozygotes (Nurr1 (+/-)) conservent le même niveau d'activité (Werme et al., 2003). Nous pouvons donc faire l'hypothèse que Nurr1 et Nur77 participent tous les deux à la régulation de l'activité locomotrice spontanée mais à des niveaux différents; Nur77 pouvant moduler l'activité locomotrice à court terme et, Nurr1 celle à long terme. Selon cette hypothèse, l'influence de la diminution de l'expression de Nurr1 ne se manifesterait expérimentalement qu'après plusieurs jours et ainsi des différences entre les souris Nur77 (-/-) et Double KO n'apparaîtrait que dans une étude à plus long terme. Des travaux supplémentaires seront donc nécessaires pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Au niveau de l'activité exploratoire dans un nouvel environnement, Nur77 et Nurr1 n'ont pas d'interactions ni de rôles distincts. Nos résultats suggèrent qu'il n'y a aucune différence entre les différents génotypes quant à l'anxiété générale, représentée par la latence d'entrée en zone centrale. Cependant, certains résultats chez les souris Nurr1 hétérozygotes demeurent intrigants et pourraient suggérer des travaux expérimentaux supplémentaires. Ces dernières ont démontré une latence d'entrée très faible, mais pas suffisamment distincte des souris sauvages, en termes statistiques. Ce résultat est d'autant plus intéressant qu'en observant nos résultats d'activité exploratoire, représentée par la

distance totale parcourue lors du même test, les souris hétérozygotes étaient significativement plus actives que les souris sauvages et Double KO. Ce résultat est similaire à ceux présentés dans les travaux de Rojas et al. (2007), alors que les souris hétérozygotes mâles (Nurr1 (+/-)) étaient significativement plus actives lors de la phase d'habituation à leur nouvel environnement comparativement aux souris sauvages (Rojas et al., 2007), et de Eells et al. (2002) alors que les souris hétérozygotes étaient spontanément plus actives dans l'*Open Field* (Eells, 2002). Ainsi, la délétion partielle de Nurr1 pourrait expliquer cette hyperactivité en ce contexte. Parallèlement, certains résultats antérieurs de notre laboratoire ont démontré que les souris Nur77 (-/-) étaient également spontanément hyperactives dans un même contexte (Gilbert et al., 2006; Bourhis et al., 2009). Ces résultats ont été obtenus lors d'un test similaire, mais effectué sur des périodes de 1 et 2 heures. Il est intéressant de constater que ces données vont dans le même sens que nos résultats d'activité locomotrice spontanée, alors que les animaux Nur77 (-/-) étaient significativement plus actifs que les animaux sauvages, cette fois dans un environnement familier. En ce qui concerne les souris Double KO, leur niveau d'activité exploratoire était similaire à celui des souris sauvages tout comme leur latence d'entrée en zone centrale. Dans un tel contexte, le phénotype des animaux Double KO ne se distingue donc pas de celui des souris sauvages, contrairement aux phénotypes respectifs des souris Nurr1 (+/-) et Nur77 (-/-). Cela est assez surprenant et pourrait suggérer des mécanismes complexes d'interaction entre Nurr1 et Nur77.

Les effets comportementaux de la délétion de Nur77 pourraient résulter de changements biochimiques induits par la délétion de ce récepteur nucléaire. En effet, notre laboratoire a démontré que la délétion de Nur77 induisait des changements importants au niveau de la physiologie et biochimie des systèmes dopaminergiques (Gilbert et al., 2006). Plus particulièrement cette délétion entraîne une augmentation de l'expression de la TH et des niveaux de DOPAC, un métabolite de la dopamine et une réduction de l'expression de la COMT, une enzyme de dégradation de ce neurotransmetteur. D'autres travaux de notre laboratoire montrent que les niveaux de récepteurs D2 de haute affinité sont doublés chez les souris Nur77 (-/-) tandis que les niveaux de Nur77 sont augmentés significativement chez les souris Nurr1 (+/-) (Hodler et Rouillard & Baillargeon et Rouillard, résultats non publiés). Collectivement, ces résultats démontrent que les effets de la délétion partielle ou

complète de Nurrl et de Nur77 induisent des changements comportementaux et biochimiques complexes.

### **3.2 Activité locomotrice induite par l'AMPH**

Une autre conclusion intéressante de nos travaux est que Nur77 et Nurrl participent tous les deux à la modulation de la réponse comportementale suite à une administration d'AMPH. Cependant, il ne semble pas y avoir d'interaction entre ces deux récepteurs nucléaires. La délétion de Nur77 et la diminution de Nurrl induisent une augmentation de l'activité locomotrice suivant l'injection du psychostimulant et cet effet est similaire chez les Double KO. Nos résultats démontrent que les souris Nurrl (+/-), Nur77 (-/-) et Double KO ont toutes réagi significativement à une dose de 2,5 mg/kg d'AMPH par une augmentation importante de l'activité ambulatoire. Ces trois types de souris étaient statistiquement différents des souris sauvages, alors que ces dernières ont démontré une augmentation non significative de leur activité ambulatoire. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature qui montrent que les souris Nurrl hétérozygotes réagissent davantage, en termes d'activité ambulatoire, à une dose aiguë d'AMPH variant entre 2,5 mg/kg et 3,0 mg/kg (Eells, 2002; Rojas et al., 2007) malgré des niveaux de dopamine et de TH semblables (Eells, 2002). Chez les animaux Nur77 (-/-), les résultats antérieurs de notre laboratoire montrent également que ces souris présentent une plus grande activité ambulatoire lorsque traitées avec une dose élevée d'AMPH (5,0 mg/kg) (Bourhis et al., 2009).

Il est intéressant de noter que nos résultats suggèrent que, contrairement à l'activité locomotrice horizontale, l'activité verticale dépend quant à elle de l'expression de Nurrl et non pas de celle de Nur77 ou d'une interaction entre les deux récepteurs. En effet, le nombre de mouvements verticaux chez les animaux Nurrl (+/-) était significativement plus élevé que chez les souris sauvages ou ceux portant une délétion de Nur77. Ceci concorde avec les résultats de la littérature, alors que les souris Nur77 (-/-) ne se démarquent pas des souris sauvages en termes de mouvements verticaux (Bourhis et al. 2009) et que les souris Nurrl (+/-) ont un nombre de mouvements verticaux significativement plus élevé que leurs

équivalents sauvages (Rojas et al. 2007). Pour ce paramètre, les souris Double KO semblent adopter en prédominance le phénotype de Nur77. Il semble donc possible que dans ce cas particulier, Nurr1 et Nur77 aient des rôles opposés.

Finalement, nous avons mesuré les mouvements fins et stéréotypés, caractéristiques de l'effet des psychostimulants. Nos résultats ne démontrent aucune différence dans les mouvements stéréotypés entre les différents génotypes après une administration unique d'AMPH. Cela est probablement dû au fait que nous avons utilisé une faible dose d'AMPH (2,5 mg/kg) pour éviter que ces mouvements stéréotypés interfèrent avec la mesure de la locomotion. Les résultats de la littérature montrent que les souris Nurr1 (+/-), lorsqu'injectées avec de la méthamphétamine à 5,0 mg/kg, exhibent plus de mouvements stéréotypés que leurs équivalents sauvages (Bäckman et al., 2003). Cela est compréhensible car la méthamphétamine est plus puissante que l'AMPH, et tout comme cette dernière, elle stimule également mais de façon beaucoup plus faible la libération de sérotonine (Kuczenski, 2008). D'autres travaux non publiés de notre laboratoire ont observé une augmentation des stéréotypies, tant chez les Nurr1 (+/-) que les souris sauvages, suivant une injection chronique d'AMPH 2,5 mg/kg (Baillargeon et Rouillard, travaux non publiés). Chez les Nur77 (-/-), les travaux antérieurs de notre laboratoire ont montré qu'une dose d'AMPH 2,5 mg/kg se révélait insuffisante pour induire une augmentation des stéréotypies par rapport au souris sauvages (Bourhis et al., 2009); résultat reproduit dans la présente étude. En fait, on peut facilement obtenir des mouvements stéréotypés chez des souris sauvages avec une dose d'AMPH 5,0 mg/kg alors que ce n'est pas le cas chez les souris Nur77 (-/-). Il est donc très intéressant de noter que dans ce cas, la délétion de Nur77 semble empêcher l'expression des mouvements stéréotypés.

### 3.3 Modulation de l'expression des neuropeptides ENK et DYN après administration d'AMPH

Du côté biochimique, la régulation de l'ENK suivant l'administration d'un psychostimulant semble dépendre d'une interaction entre *Nurr1* et *Nur77*. Au niveau basal, les souris sauvages, *Nur77* (-/-) et Double KO expriment dans les quatre régions du striatum étudiées des niveaux similaires d'ENK suite à une injection de saline. Lorsqu'injectées avec l'AMPH, les souris sauvages ont démontré une augmentation significative dans l'expression de l'ENK uniquement dans le striatum ventro-médian. Les trois autres régions montrent néanmoins un patron d'augmentation mais celles-ci ne sont pas significatives. Par contre, il n'y a pas d'augmentation significative des niveaux d'ENK chez les souris *Nurr1* (+/-) et *Nur77* (-/-) après administration de l'AMPH. Contrairement à celles-ci, les animaux Double KO ont des niveaux d'expression du neuropeptide qui augmentent de façon significative suivant l'administration d'AMPH et ce, par rapport aux autres types de souris. Dans les régions médianes, l'augmentation était moyennement élevée, avoisinant 30%, alors que dans les régions latérales l'augmentation était de plus de 50%. Dans le striatum ventral et la portion médiane du striatum dorsal, l'expression de l'ENK suite à l'injection d'AMPH chez les Double KO étaient significativement plus élevée que celle des *Nur77* (-/-), ce qui souligne de façon intéressante une différence entre les deux génotypes. Jusqu'à présent, les résultats comportementaux obtenus témoignaient d'une ressemblance entre les phénotypes *Nur77* (-/-) et Double KO. Il semble ici que les mécanismes de régulation du neuropeptide ENK chez les animaux Double KO soient plus sensibles aux psychostimulants, la réponse biochimique observée étant plus intense que celle des souris sauvages et *Nur77* (-/-). Certains travaux préalables de notre laboratoire avaient investigué la possibilité de changements dans l'expression de l'ENK chez les souris *Nurr1* (+/-). Dans les régions ventro-médianes et ventro-latérales, il y avait augmentation significative de l'expression de l'ENK après administration d'AMPH chez les souris sauvages, alors qu'aucun changement n'était observé chez les animaux hétérozygotes. Aucun changement significatif n'a été répertorié dans les régions dorsales du striatum pour les deux types de souris. (Baillargeon et Rouillard, travaux non publiés).

Au contraire de l'ENK, les récepteurs nucléaires Nurr1 et Nur77 ne semblent pas être mesure de moduler l'expression de la DYN striatale. Les résultats obtenus concernant ce neuropeptide ne montrent aucune différence statistiquement significative entre les différents génotypes, incluant les souris Nurr1 (+/-). En général, les animaux sauvages et Double KO ont démontré de légères augmentations dans l'expression du neuropeptide suivant l'injection d'AMPH, mais ces dernières ne sont pas significatives. Fait plutôt remarquable, l'expression de la DYN chez les Nurr1 (+/-) semble diminuer suivant l'injection d'AMPH dans les quatre régions striatales. Malgré ces quelques différences qualitatives, nous ne pouvons assumer qu'il y ait une différence réelle entre les différents phénotypes. Nos résultats, jusqu'à présent, vont à l'encontre de ce qui est généralement admis dans la littérature, alors qu'une hausse significative de l'expression de la DYN striatale est observée suivant un traitement pharmacologique psychostimulant (Wang and McGinty, 1996; Wang, 1996; McGinty and Wang, 1997; Gonzalez-Nicolini et al., 2003; McGinty et al., 2008). Étant donné que l'induction pharmacologique des neuropeptides est de longue durée, le temps relativement long entre les tests comportementaux et la période de sacrifice ne peut être mis en cause. Il est reconnu que la hausse dans la régulation des neuropeptides est dépendante du dosage de la drogue (Wang and McGinty, 1996). Une dose insuffisante pour moduler la DYN pourrait vraisemblablement expliquer nos résultats non significatifs; la majorité des travaux ayant utilisé une dose d'AMPH de 5,0 mg/kg.

Cependant, la situation est différente si l'on examine les effets de l'AMPH sur la DYN au niveau accumbal. Dans le noyau accumbens, les résultats obtenus suggèrent un rôle important de Nurr1 pour la modulation de l'expression de la DYN. La régulation de la DYN suivant l'administration d'AMPH dans cette région varie fortement selon le génotype. Dans la région du corps (*core*) et de la coquille (*shell*) les souris sauvages ont exhibé une hausse significative dans l'expression de la DYN suite à l'injection d'AMPH. Les souris Nurr1 (+/-), au contraire, ont démontré une diminution significative importante (environ 40%) suite à l'injection de l'AMPH. Il est intéressant de noter que la réponse comportementale (activité ambulatoire) des souris Nurr1 (+/-) après AMPH était similaire à celle des souris Nur77 (-/-) et Double KO et pourtant leurs niveaux de DYN après injection sont significativement plus faibles. Il nous est présentement impossible d'expliquer le phénotype des animaux Nurr1 (+/-) et ses contradictions; c'est-à-dire l'augmentation

substantielle de l'activité locomotrice et exploratoire malgré la chute drastique des niveaux d'expression de la DYN dans le noyau accumbens. Les niveaux d'expression de la DYN des animaux Nur77 (-/-) dans le noyau accumbens semblent également diminuer suite au traitement à l'AMPH mais de façon moins importante. On pourrait donc s'attendre à ce que les niveaux du neuropeptide diminuent drastiquement chez les Double KO. Au contraire, les souris Double KO ont des niveaux d'expression de DYN post-injection d'AMPH similaires à ceux des souris sauvages. Il est intéressant de noter que les animaux Nur77 (-/-) et Double KO ont des niveaux de DYN post-AMPH statistiquement semblables alors que leurs niveaux d'expression d'ENK respectifs sont significativement différents. Cela nous permet donc de conclure que malgré un niveau d'activité ambulatoire similaire sous l'effet de l'AMPH, la régulation des neuropeptides ENK et DYN diffère fortement d'un génotype à l'autre. De plus, cette spécificité d'expression des neuropeptides chez les animaux Double KO suggère fortement la présence d'une interaction fonctionnelle entre les deux récepteurs nucléaires, via leurs propriétés modulatrices respectives.

### **3.4 Catalepsie et expression de l'ENK dans le striatum après administration d'un antagoniste dopaminergique**

Au contraire de l'effet d'un agoniste (AMPH), la réponse comportementale induite par un antagoniste (HAL) est exclusivement régulée par Nur77 sans aucun rôle pour ou interaction avec Nurr1. Nous démontrons que la modulation des niveaux d'expression de Nurr1 ne modifie en rien la réponse cataleptique observée chez les animaux sauvages tandis que la délétion de Nur77, autant chez les Nur77 (-/-) que chez les Double KO, induit une réponse comportementale significativement diminuée.

Du côté biochimique nous démontrons que l'HAL induit une forte augmentation de l'expression de l'ENK chez les souris sauvages et Nurr1 (+/-), mais pas chez les souris Nur77 (-/-) ou Double KO. Ces résultats sont en accord avec les résultats publiés auparavant par notre laboratoire. Nous avons démontré que l'administration d'HAL induit une augmentation de l'expression de Nur77 dans les neurones striataux exprimant l'ENK chez les souris sauvages, alors que le même traitement pharmacologique n'induit pas d'augmentation dans l'expression de l'ENK chez les animaux Nur77 (-/-) (Beaudry et al.,



2002; Ethier et al., 2004). Nous avons aussi démontré que les traitements aux antipsychotiques typiques et atypiques produisent des patrons d'induction différents de Nur77 et Nor-1 (Maheux et al., 2005). Ces résultats confirment l'importance de Nur77 et de la voie striatopallidale dont les neurones expriment principalement l'ENK dans les effets des antagonistes dopaminergiques. Dans ce cas-ci, le rôle spécifique de Nur77 pourrait être relié au fait que les drogues antipsychotiques et en particulier l'HAL produisent leurs effets majoritairement via le blocage des récepteurs dopaminergiques D2.

### 3.5 Conclusion

À partir des travaux réalisés en périphérie, c'est-à-dire à l'extérieur du SNC, il est généralement accepté que les récepteurs nucléaires Nurr1 et Nur77 ont des rôles semblables et qu'ils sont parfois redondants. Nos résultats démontrent que cette situation est différente dans le cerveau; ceux-ci ayant à la fois des rôles bien distincts et des interactions quant à la modulation de la neurotransmission dopaminergique. En fait, le phénotype Double KO semble grandement dépendre de la délétion de Nur77 dans différents contextes tels que l'activité locomotrice en conditions basales et la catalepsie induite par les antipsychotiques. En revanche, certaines composantes de leur réponse comportementale suite à l'administration d'AMPH semblent être sous le contrôle de Nur77 tandis que pour une autre, l'activité verticale, elle dépend de l'expression de Nurr1. Un des résultats les plus intrigant de ce travail réside définitivement dans la constatation que les animaux Double KO démontrent des patrons d'expression des neuropeptides ENK et DYN qui peuvent différer de ceux des animaux Nur77 (-/-) et Nurr1 (+/-). Cela démontre bien que chacun de ces récepteurs nucléaires/facteurs de transcription interagit individuellement avec certaines composantes de la neurotransmission dopaminergique mais également que collectivement leurs rôles respectifs et leurs interactions parfois complexes leur permettent de moduler très fortement les comportements médiés par la dopamine et la réponse des systèmes dopaminergiques à diverses catégories de drogues.

## RÉFÉRENCES

Anderson ME (2008) Basal Ganglia: Motor Functions, Encyclopedia of Neurosciences 2009 Oxford: Elsevier Ltd., p. 105-110.

Angulo J (1994) Molecular aspects of neuropeptide regulation and function in the corpus striatum and nucleus accumbens. *Brain Res Rev* 19, p. 1-28.

Bäckman C, You Z, Perlmann T (2003) Elevated locomotor activity without altered striatal dopamine contents in Nurr1 heterozygous mice after acute exposure to methamphetamine. *Behav Brain Res* 143, p.95-100

Beaudry G, Langlois M-C, Weppe I, Rouillard C, Lévesque D (2002) Contrasting Patterns and Cellular Specificity of Transcriptional Regulation of the Nuclear Receptor Nerve Growth Factor-Inducible B by Haloperidol and Clozapine in the Rat Forebrain. *J Neurochem* 75:1694–1702

Benoit G, Malewicz M, Perlmann T (2004) Digging deep into the pockets of orphan nuclear receptors: insights from structural studies. *Trends Cell Biol.* 14:369–376

Bensinger S (2009) A Nurr1 Pathway for Neuroprotection. *Cell* 137 , p.26-28

Bergquist F, Ludwig M (2008) Neuropeptide Release, Encyclopedia of Neurosciences 2009 Oxford: Elsevier Ltd., p. 811-816.

Bolam JP, Brown MTC, Moss J, Magill PJ (2008) Basal Ganglia: Internal Organization, Encyclopedia of Neurosciences 2009, Oxford: Elsevier Ltd., p. 97-104.

Bourguet W, Germain P (2000) Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends in Pharmacol Sci* 21, p.381-388.

Bourhis E, Maheux J, Paquet B, Kagechika H, Shudo K, Rompré P-P, Rouillard C, Lévesque D (2009) The transcription factors Nur77 and retinoid X receptors participate in amphetamine-induced locomotor activities. *Psychopharmacology (Berl.)* 202:635–648

Bridgham JT, Eick GN, Larroux C, Deshpande K, Harms MJ, Gauthier MEA, Ortlund EA, Degnan BM, Thornton JW (2010) Protein evolution by molecular tinkering: diversification of the nuclear receptor superfamily from a ligand-dependent ancestor. *PLoS Biol.* 8:e1000329

Colón-Cesario WI, Martínez-Montemayor MM, Morales S, Félix J, Cruz J, Adorno M, Pereira L, Colón N, Maldonado-Vlaar CS, Peña de Ortiz S (2006) Knockdown of Nurr1 in the rat hippocampus: implications to spatial discrimination learning and memory. *Learn Mem.* 13:734–744

Darragh J, Soloaga A, Beardmore VA, Wingate AD, Wiggin GR, Peggie M, Arthur JSC (2005) MSKs are required for the transcription of the nuclear orphan receptors Nur77, Nurr1 and Nor1 downstream of MAPK signalling. *Biochem. J.* 390, p.749-759.

Eells J (2002) Nurr1-null heterozygous mice have reduced mesolimbic and mesocortical dopamine levels and increased stress-induced locomotor activity. *Behav Brain Res* 136, p.267–275.

Eisenhofer G (2004) Catecholamine Metabolism: A Contemporary View with Implications for Physiology and Medicine. *Pharmacol Rev* 56:331–349

Elsworth J (1997) Dopamine Synthesis, Uptake, Metabolism, and Receptors: Relevance to Gene Therapy of Parkinson's Disease. *Exp Neurol* 144:4–9

Ethier I, Beaudry G, St-Hilaire M, Milbrandt J, Rouillard C, Lévesque D (2004) The transcription factor NGFI-B (Nur77) and retinoids play a critical role in acute neuroleptic-induced extrapyramidal effect and striatal neuropeptide gene expression. *Neuropsychopharmacology* 29:335–346

Ethier I, Kagechika H, Shudo K, Rouillard C, Levesque D (2004) Docosahexaenoic acid reduces haloperidol-induced dyskinesias in mice: involvement of Nur77 and retinoid receptors. *Biol Psychiatry* 56, p.522-526

Francis GA, Fayard E, Picard F, Auwerx J (2003) Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annual Rev Physiol* 65, p.261–311

Gibrat C, Bousquet M, Saint-Pierre M, Levesque D, Calon F, Rouillard C, Cicchetti F (2010) Cystamine prevents MPTP-induced toxicity in young adult mice via the up-regulation of the brain-derived neurotrophic factor. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 34:193–203

Giguere V (1999) Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev* 20:689–725

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

Gonzalez-Nicolini MV, Berglind W, Cole KS, Keogh CL, McGinty JF (2003) Local mu and delta opioid receptors regulate amphetamine-induced behavior and neuropeptide mRNA in the striatum. *Neuroscience* 121:387–398

- Gonzalez-Nicolini V (2002) Gene expression profile from the striatum of amphetamine-treated rats: a cDNA array and in situ hybridization histochemical study. *Gene Expr Patterns* 1, p.193-198
- Grace AA, Lodge DJ, Buffalari DM (2008) Dopamine - CNS Pathways and Neurophysiology, *Encyclopedia of Neurosciences* 2009, Oxford: Elsevier Ltd., p. 549–555.
- Gronemeyer H, Gustafsson J-A, Laudet V (2004) Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 3:950–964
- Hawk JD, Abel T (2011) The role of NR4A transcription factors in memory formation. *Brain Res Bull* 85 1-2, p.21-29
- Herten von LSJ, Giese KP (2005) Memory reconsolidation engages only a subset of immediate-early genes induced during consolidation. *J Neurosci* 25:1935–1942
- Hui-Chen Hsu (2004) Nur77 Family of Nuclear Hormone Receptors. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 3, p.413-423
- Jacobs FMJ, van Erp S, van der Linden AJA, Oerthel von L, Burbach JPH, Smidt MP (2009) Pitx3 potentiates Nurr1 in dopamine neuron terminal differentiation through release of SMRT-mediated repression. *Development* 136:531–540
- Jankovic J, Chen S, Le W (2005) The role of Nurr1 in the development of dopaminergic neurons and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 77:128–138
- Jiang C, Wan X, He Y, Pan T, Jankovic J, Le W (2005) Age-dependent dopaminergic dysfunction in Nurr1 knockout mice. *Exp Neurol* 191:154–162
- Kadkhodaei B, Ito T, Joodmardi E, Mattsson B, Rouillard C, Carta M, Muramatsu S-I, Sumi-Ichinoe C, Nomura T, Metzger D, Chambon P, Lindqvist E, Larsson N-G, Olson L, Björklund A, Ichinoe H, Perlmann T (2009) Nurr1 is required for maintenance of maturing and adult midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* 29:15923–15932
- Khorasanizadeh S (2001) Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *Trends Biochem Sci* 26:384–390
- Kieffer BL (2008) Opioid Peptides and Receptors, *Encyclopedia of Neurosciences* 2009, Oxford: Elsevier Ltd., p. 235-240.
- Kovalovsky D, Refojo D, Liberman AC, Hochbaum D, Pereda MP, Coso OA, Stalla GK, Holsboer F, Arzt E (2002) Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. *Mol. Endocrinol.* 16:1638–1651

Kuczenski R (2008) Amphetamines, *Encyclopedia of Neurosciences 2009*, Oxford: Elsevier Ltd., p. 319-323.

Le W, Chen S (2010) NR4A Subfamily, *Encyclopedia of Movement Disorders 2010*, Oxford, p. 311–316.

Le W, Pan T, Huang M, Xu P, Xie W, Zhu W, Zhang X, Deng H, Jankovic J (2008) Decreased NURR1 gene expression in patients with Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 273:29–33

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

Lin B, Kolluri SK, Lin F, Liu W, Han Y-H, Cao X, Dawson MI, Reed JC, Zhang X-K (2004) Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell* 116:527–540

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

Maira M, Martens C, Philips A, Drouin J (1999) Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation. *Mol Cell Biol* 19:7549–7557

Markov GV, Laudet V (2011) Origin and evolution of the ligand-binding ability of nuclear receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 334:21–30

Mattson BJ, Crombag HS, Mitchell T, Simmons DE, Kreuter JD, Morales M, Hope BT (2007) Repeated amphetamine administration outside the home cage enhances drug-induced Fos expression in rat nucleus accumbens. *Behav Brain Res* 185(2): 88-98

Maxwell M, Muscat G (2006) The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles. *Nucl Recept Signal* 4:e002

McGinty J, Wang J (1997) Drugs of Abuse and Striatal Gene Expression. *Adv Pharmacol* 42, p.1017-1019

McGinty JF, Shi XD, Schwendt M, Saylor A, Toda S (2008) Regulation of psychostimulant-induced signaling and gene expression in the striatum. *J Neurochem* 104:1440–1449

Missale C, Nash S, Robinson S, Jaber M, Caron M (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78:189–225

Mortensen OV, Amara SG (2003) Dynamic regulation of the dopamine transporter. *Eur J Pharmacol* 479:159–170

- Oita RC, Mazzatti DJ, Lim FL, Powell JR, Merry BJ (2009) Whole-genome microarray analysis identifies up-regulation of Nr4a nuclear receptors in muscle and liver from diet-restricted rats. *Mech. Ageing Dev.* 130:240–247
- Pearen MA, Muscat GEO (2010) Minireview: Nuclear hormone receptor 4A signaling: implications for metabolic disease. *Mol. Endocrinol.* 24:1891–1903
- Pekarsky Y (2001) Akt phosphorylates and regulates the orphan nuclear receptor Nur77. *PNAS* 98:3690–3694
- Perlmann T, Wallén-Mackenzie A (2004) Nurr1, an orphan nuclear receptor with essential functions in developing dopamine cells. *Cell Tissue Res* 318:45–52
- Prut L, Belzung C (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 463:3–33
- Rochette-Egly C (2003) Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cellular signal* 15, p.355-366
- Rojas P, Joodmardi E, Hong Y, Perlmann T, Ogren SO (2007) Adult mice with reduced Nurr1 expression: an animal model for schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 12:756–766
- Sacchetti P, Carpentier R, Ségard P, Olivé-Cren C, Lefebvre P (2006) Multiple signaling pathways regulate the transcriptional activity of the orphan nuclear receptor NURR1. *Nucleic Acids Res.* 34:5515–5527
- Sacchetti P, Dwornik H, Formstecher P, Rachez C, Lefebvre P (2002) Requirements for heterodimerization between the orphan nuclear receptor Nurr1 and retinoid X receptors. *J. Biol. Chem.* 277:35088–35096
- Saijo K, Winner B, Carson CT, Collier JG, Boyer L, Rosenfeld MG, Gage FH, Glass CK (2009) A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell* 137:47–59
- Samadi P, Bédard PJ, Rouillard C (2006) Opioids and motor complications in Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci* 27:512–517
- Samadi P, Rouillard C, Bédard P (2007) Functional neurochemistry of the basal ganglia. *Handbook of Clinical Neurology* Vol.83, Chap.2, p.19-66
- Saucedo-Cardenas O (1998) Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons, *PNAS* 95:4013-4018
- Schmitz Y, Marand MB (2003) Presynaptic regulation of dopaminergic neurotransmission. *J Neurochem* 87, p.273-289

Sladek F (2010) What are nuclear receptor ligands?, *Mol Cell Endocrinol* 334, p.3-13

Smidt MP, Burbach JPH (2007) How to make a mesodiencephalic dopaminergic neuron. *Nat Rev Neurosci* 8:21–32

Smits SM, Ponnio T, Conneely OM, Burbach JPH, Smidt MP (2003) Involvement of Nurr1 in specifying the neurotransmitter identity of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 18:1731–1738

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

Stahl SM (2005) *Essential Psychopharmacology; Neuroscientific basis and practical applications*, Second Edition, Cambridge University Press, 2000.

Surmeier DJ, Shen W, Day M, Gertler T, Chan S, Tian X, Plotkin JL (2010) The role of dopamine in modulating the structure and function of striatal circuits. *Prog Brain Res* 183:149–167

Thompson J, Winoto A (2008) During negative selection, Nur77 family proteins translocate to mitochondria where they associate with Bcl-2 and expose its proapoptotic BH3 domain. *J Exp Med* 205:1029–1036

Tremblay M-E, Saint-Pierre M, Bourhis E, Lévesque D, Rouillard C, Cicchetti F (2006) Neuroprotective effects of cystamine in aged parkinsonian mice. *Neurobiol. Aging* 27:862–870

Urquiza A, Liu S, Sjöberg M, Zetterström R (2000) Docosahexaenoic Acid, a Ligand for the Retinoid X Receptor in Mouse Brain. *Science* 290, p.2140-2146

Vallone D, Picetti R, Borrelli E (2000) Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev* 24:125–132

Volakakis N, Joodmardi E, Perlmann T (2009) NR4A orphan nuclear receptors influence retinoic acid and docosahexaenoic acid signaling via up-regulation of fatty acid binding protein 5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390:1186–1191

Volpicelli F, Caiazzo M, Greco D, Consales C, Leone L, Perrone-Capano C, Colucci D'Amato L, Di Porzio U (2007) Bdnf gene is a downstream target of Nurr1 transcription factor in rat midbrain neurons in vitro. *J Neurochem* 102:441–453

Vuillermot S, Joodmardi E, Perlmann T, Ove Ögren S, Feldon J, Meyer U (2011) Schizophrenia-relevant behaviors in a genetic mouse model of constitutive Nurr1 deficiency. *Genes Brain Behav* Vol.10 Issue 5, p. 589-603

- Wallen A, Castro DS, Zetterström RH, Karlén M, Olson L, Ericson J, Perlmann T (2001) Orphan nuclear receptor Nurr1 is essential for Ret expression in midbrain dopamine neurons and in the brain stem. *Mol. Cell. Neurosci.* 18:649–663
- Wallén-Mackenzie A, Mata de Urquiza A, Petersson S, Rodriguez FJ, Friling S, Wagner J, Ordentlich P, Lengqvist J, Heyman RA, Arenas E, Perlmann T (2003) Nurr1-RXR heterodimers mediate RXR ligand-induced signaling in neuronal cells. *Genes Dev* 17:3036–3047
- Wang J (1996) Acute methamphetamine-induced zif/268, preprodynorphin, and preproenkephalin mRNA expression in rat striatum depends on activation of NMDA and kainate/AMPA receptors. *Brain Res Bull* 39 no.6 p.349–357
- Wang J, McGinty J (1996) D1 and D2 receptor regulation of preproenkephalin and preprodynorphin mRNA in rat striatum following acute injection of amphetamine or methamphetamine. *Synapse* 22, p.114-122
- Wansa KDSA, Harris JM, Muscat GEO (2002) The activation function-1 domain of Nur77/NR4A1 mediates trans-activation, cell specificity, and coactivator recruitment. *J. Biol. Chem.* 277:33001–33011
- Werme M, Hermanson E, Carmine A, Buervenich S, Zetterström RH, Thorén P, Ogren SO, Olson L, Perlmann T, Brené S (2003) Decreased ethanol preference and wheel running in Nurr1-deficient mice. *Eur J Neurosci* 17:2418–2424
- Werme M, Messer C, Olson L, Gilden L (2002)  $\Delta$ FosB Regulates Wheel Running. *J Neurosci* 22, no.18, p.8133-8138
- Wingate A (2006) Post-translational control of Nur77. *Biochem Soc Trans*, Vol.34, Part 6, p.1107-1109
- Wingate AD, Campbell DG, Peggie M, Arthur JSC (2006) Nur77 is phosphorylated in cells by RSK in response to mitogenic stimulation. *Biochem. J.* 393:715–724
- Xing G, Zhang L, Russell S, Post R (2006) Reduction of dopamine-related transcription factors Nurr1 and NGFI-B in the prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorders. *Schizophr Res* 84 (1) pp. 36-56
- Zanassi P, Paolillo M, Feliciello A, Avvedimento EV, Gallo V, Schinelli S (2001) cAMP-dependent protein kinase induces cAMP-response element-binding protein phosphorylation via an intracellular calcium release/ERK-dependent pathway in striatal neurons. *J. Biol. Chem.* 276:11487–11495
- Zetterström R, Williams R, Perlmann T (1996) Cellular expression of the immediate early transcription factors Nurr1 and NGFI-B suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system. *Mol Brain Res* 41, p.111-120



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

Zetterström RH, Solomin L, Jansson L, Hoffer BJ, Olson L, Perlmann T (1997) Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* 276:248–250

Zhan Y et al. (2008) Cytosporone B is an agonist for nuclear orphan receptor Nur77. *Nat. Chem. Biol.* 4:548–556

Zhang L, Le W, Xie W, Dani JA (2011) Age-related changes in dopamine signaling in Nurr1 deficient mice as a model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, Article in Press

