



HAL
open science

Régulation de la voie AMPc/PKA par la voie NO/GMPc et les phosphodiesterases dans les neurones épineux de taille moyenne et les interneurons cholinergiques du striatum

Sécolène Bompierre

► **To cite this version:**

Sécolène Bompierre. Régulation de la voie AMPc/PKA par la voie NO/GMPc et les phosphodiesterases dans les neurones épineux de taille moyenne et les interneurons cholinergiques du striatum. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS707 . tel-04591448

HAL Id: tel-04591448

<https://theses.hal.science/tel-04591448>

Submitted on 28 May 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT

En vue de l'obtention du grade de Docteur de Sorbonne Université

Réalisée par

Ségoène Bompierre

Co-dirigée par

Pierre Vincent (IGF, Montpellier) et Liliana Castro (B2A, Paris)

**Régulation de la voie AMPc/PKA par la voie NO/GMPc et
les phosphodiesterases dans les neurones épineux de taille
moyenne et les interneurons cholinergiques du striatum**

Institut de Biologie Paris Seine

UMR8256 – Adaptation Biologique et Vieillesse

Dynamique de la signalisation intracellulaire et cibles thérapeutiques

Ecole doctorale de physiologie, physiopathologie et thérapeutique – ED394

Membres du Jury

Baufreton Jérôme, DR, Université de Bordeaux,	Rapporteur
Beurrier Corinne, DR, Université d'Aix-Marseille,	Rapporteuse
Girault Jean-Antoine, DRCE, Sorbonne Université	Président
Leroy Jérôme, PU, Université Paris Saclay	Examineur
Krantic Slavica, CR, Centre de recherche Saint-Antoine	Invitée
Castro Liliana, MCU, Sorbonne Université	Co-directrice
Vincent Pierre, DR, Université de Montpellier	Co-directeur



« *Wer will, dass die Welt so bleibt, wie sie ist, der will nicht, dass sie bleibt.* »

« Celui qui veut que le monde reste tel qu'il est, ne veut pas qu'il reste »

Erich Fried

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	1
LISTE DES ABREVIATIONS	7
1 – INTRODUCTION GENERALE	11
1.1 – Le striatum dans le système des ganglions de la base	11
1.1.1 – Organisation anatomique	12
1.1.2 – Organisation neurochimique	13
1.1.3 – La libération de la dopamine dans le striatum	14
1.1.4 – Organisation cellulaire	19
1.2 – Les neurones épineux striataux de taille moyenne	20
1.2.1 – Mise en place du mouvement par les MSNs	20
1.2.2 – Propriétés électriques des MSNs	23
1.2.3 – Modulation de la voie AMPc/PKA dans les MSNs	23
1.2.4 – Les phosphodiesterases	32
1.2.5 – Compartimentation de l'AMPc par les PDE	40
1.2.6 – Transduction du signal dopaminergique dans les MSNs	42
1.2.7 – Transduction du signal glutamatergique	45
1.2.8 – Plasticité des MSNs	46
1.3 – Les interneurons cholinergiques	47
1.3.1 – Les pauses dans l'activité tonique : contraste essentiel à l'apprentissage	48
1.3.2 – L'action de l'ACh dans la terminaison du mouvement	50
1.3.3 – Régulation de la voie AMPc/PKA par différents récepteurs métabotropiques	51
1.3.4 – Les PDE dans les ChIN ?	52
1.4 – Les interneurons NOergiques	54
1.4.1 – Activité électrique des interneurons NOergiques	54
1.4.2 – Modulation de la production du NO	54
1.4.3 – Action du NO sur les MSNs	55
1.4.4 – Action du NO sur les ChIN	56
1.4.5 – Rôle du NO dans les fonctions motrices	56
1.5 – L'implication du striatum dans la maladie de Parkinson et les dyskinésies associées au traitement par la L-DOPA	56
1.5.1 – Les traitements actuels	57
1.5.2 – Adaptations dans la maladie de Parkinson et les LID	61
1.5.3 – Pertinence des modèles animaux de la maladie de Parkinson	74

2 – OBJECTIFS	81
3 – MATERIELS & METHODES	83
3.1 – Modèles animaux	83
3.1.1 – Modèle murin jeune	83
3.1.2 – Modèle murin adulte	83
3.2 – Biosenseurs FRET	86
3.2.1 – Fonctionnement d'un biosenseur FRET	86
3.2.2 – Expression des biosenseurs	90
3.2.3 – Quantification, normalisation des mesures	91
3.2.4 – Agents pharmacologiques	92
3.2.5 – Statistiques	93
3.3 – Immunomarquage	94
3.4 – Western-Blot	94
4 – RESULTATS	97
4.1 – Cellular context shapes cyclic nucleotide signaling in neurons through multiple levels of integration	97
4.2 – Differential regulation of cAMP/PKA signaling pathway by PDE10A, PDE4 and PDE2A in striatal medium-sized spiny neurons	109
4.2.1 – Contexte de l'étude	109
4.2.2 – Principaux résultats	109
4.2.3 – Conclusions	110
4.2.4 – Article	110
4.3 – Calcium-activated phosphodiesterase 1 and cGMP-inhibited phosphodiesterase 3 modulate cyclic nucleotide levels in striatal cholinergic interneurons	129
4.3.1 – Contexte de l'étude	129
4.3.2 – Principaux résultats	129
4.3.3 – Conclusions	130
4.3.4 – Articles	130
4.3.5 – Résultats complémentaires	154
4.4 – Stimulation of PDE2A activity moderates cAMP/PKA response to D₁ receptor stimulation in dyskinetic mice	157
4.4.1 – Contexte de l'étude	157
4.4.2 – Principaux résultats	158
4.4.3 – Conclusions	158
4.4.4 – Articles	158

4.5 – Pharmacologie des récepteurs à la dopamine	187
4.5.1 – Reproduction du protocole D1/D2 chez l'adulte	187
4.5.2 – Activation du récepteur D ₁	189
4.5.3 – Faible réponse à la dopamine chez les souris sham	192
5 – DISCUSSION GENERALE	195
5.1 – L'évolution de la réponse à la dopamine, du jeune jusqu'à l'état parkinsonien	195
5.1.1 – Maturation du striatum entre les premières semaines post-natales et l'âge adulte	195
5.1.1 – L'état Parkinsonien : un retour à l'état juvénile ?	197
5.2 – Les PDE striatales responsables de la temporalité du signal AMPc dans les MSNs et ChIN	198
5.2.1 – Les PDE10A, PDE4 et PDE2A déterminent la dynamique de la réponse transitoire à la dopamine dans les MSNs	199
5.2.2 – PDE3A et PDE4 responsables de l'hydrolyse de l'AMPc dans les ChIN	204
5.3 – L'action opposée de la voie NO/GMPc dans les MSNs et ChIN : régulation de la fenêtre temporelle d'action de la dopamine	205
5.3.1 – PDE10A, PDE2A, PDE3A : au carrefour de la voie AMPc/PKA et NO/GMPc	205
5.3.2 – Les interneurones NOergiques modulent la fenêtre d'action de la dopamine	207
5.4 – La PDE2A : une nouvelle cible thérapeutique pour traiter les LID ?	209
5.4.1 – Implication de la PDE2A dans la régulation des mouvements	209
5.4.2 – Cibler la PDE2A pour traiter les LID	211
5.4.3 – Limites de la PDE2A comme cible thérapeutique	211
6 – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	215
7 – PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES	219
8 – BIBLIOGRAPHIE	221
ABSTRACT FOR NON-BIOLOGIST	279
ABSTRACT	281
RESUME	282

REMERCIEMENTS

J'ai souvent comparé l'aventure qu'est la thèse à celle d'un marathon. Il y a les débuts, où l'on a tendance à partir trop vite. A chaque nouveauté, chaque apprentissage, chaque pas, on s'enthousiasme. Tout nous paraît incroyable ! Et puis, rapidement, on comprend qu'il va falloir tenir ce rythme effréné. On rentre dans la routine, la régularité. Parfois, on se sent pousser des ailes, et on est émerveillé par ce métier de la recherche. Et puis parfois, on y perd tout sens, pour finalement se demander, pour quoi ? Mais heureusement, il y a, sur le bord de la route, ces mains tendues, qui nous remotivent et nous transmettent leur énergie. Une tape dans la main, un mot d'encouragement, et c'est reparti. Et puis, comme sur un marathon, il y a sur la fin ces petites parenthèses d'émotions, pendant lesquels vous comprenez que vous êtes en train de réaliser cet exploit fou, ce rêve de gamine. La seule grande différence que je vois entre la thèse et un marathon... c'est qu'une thèse, j'en ferai probablement qu'une seule.

Ces années qui m'ont conduite au doctorat puis ces trois années et demie de thèse n'auraient jamais été aussi belles, enrichissantes et stimulantes sans ces nombreuses personnes qui ont été et sont à mes côtés. Il y a celles que j'ai rencontrées sur le chemin et celles qui étaient déjà présentes. Aujourd'hui, je souhaiterais toutes sincèrement les remercier pour tout ce qu'elles m'ont apporté :

Je commencerais par le plus évident : un immense merci à vous, Pierre et Liliana, de m'avoir accueillie dans l'équipe et de m'avoir guidé tout au long de ces quatre années, du master jusqu'au doctorat. J'ai beaucoup appris de nos longues discussions scientifiques, à argumenter, construire, déconstruire et reconstruire, pour mieux avancer sur le projet. Vous avez toujours eu une oreille attentive à mes remarques et avez toujours considéré mes arguments, mes opinions et mes points de vue. Je vous remercie sincèrement pour la confiance que vous m'avez accordée. **Pierre**, j'ai à ton égard un profond respect : d'abord pour ta rigueur et ton intégrité scientifique, sans faille, et surtout pour tes qualités humaines, indéniables. J'ai toujours beaucoup apprécié ta rationalité, ta franchise, tes remarques pertinentes et constructives et tes remises en question perpétuelles. Le hasard et les superstitions : très peu pour toi ! Ça a été un vrai plaisir de travailler à tes côtés, avec toute la passion et la curiosité que tu as pour les Sciences. Je te remercie pour ton ouverture d'esprit, et nos innombrables discussions scientifiques, souvent conclues d'un « on n'y comprend pas grand-chose aux voies de signalisation » ! Je souhaiterais également te remercier pour ta générosité et le partage de ton savoir et ces nombreuses discussions sur la société, la politique, l'environnement, l'écologie et j'en passe ! Je me sens chanceuse d'être devenue la

scientifique que je suis aujourd'hui à tes côtés. **Liliana**, je te remercie sincèrement pour ta gentillesse, ton écoute et ta grande bienveillance. De nous tous, je crois que tu es celle qui a le plus cru en ce projet, dont tu es l'initiatrice. Tu as toujours su trouver les bons mots pour me remotiver lorsque j'ai douté. Ton soutien a été précieux à chaque essai infructueux et chaque péripétie que peut réserver une thèse. Je te remercie pour le temps que tu as consacré à ce projet, pour nos discussions, et ce malgré un emploi du temps déjà bien rempli par l'enseignement.

Je remercie sincèrement tous les autres membres de l'équipe, qui ont également apporté leur pierre à l'édifice. **Isabelle**, tu as toujours eu un regard extérieur avisé et très juste sur ce projet. J'apprécie grandement ta franchise et je te remercie pour les nombreux précieux conseils que tu m'as donnés, surtout lors des préparations de présentations orales. **Régis**, ces quatre années auraient été bien moins sympathiques sans toi ! Je te remercie pour ton humour (travaillé... ou pas), ta joie de vivre et l'énergie solaire que tu dégages. Tes conseils, qu'ils aient été sur le plan scientifique ou humain, ont toujours su être justes. Je te remercie sincèrement pour ta contribution dans le projet, mais aussi pour le sourire que tu transmets chaque matin et le partage de tes nombreuses anecdotes : qui, désormais, va pouvoir enrichir ma culture générale ? **Samar**, mon acolyte de bureau, on aura presque réussi à la finir ensemble cette thèse ! Je te remercie pour ta patience, ton oreille attentive, tes précieux conseils et ton soutien incontestable. Tu as toujours su être à l'écoute de mes plaintes et mes révoltes concernant le monde de la recherche (et pas que...). Quand je regarde en arrière, quel bonheur de voir le chemin que nous avons parcouru, scientifiquement et personnellement ! Désormais, je te souhaite une belle fin de thèse, avec toute l'intensité que cela implique et j'espère que nos chemins se recroiseront autour de délicieuses caipirinha. **Bernard**, quel plaisir d'avoir partagé mon bureau avec toi ! Tu as apporté cette sagesse à l'équipe, cette force tranquille. Je te remercie pour ta bienveillance, ta générosité et ton humanité. Tu t'es toujours montré très attentionné envers Samar et moi-même et tu as toujours eu à cœur de nous transmettre ton immense savoir scientifique. Je te souhaite de belles aventures pour ces années de retraite à venir !

Je souhaiterais remercier également les anciens membres de l'équipe. **Célia**, une ancienne collègue, surtout une amie, quel bonheur de t'avoir rencontrée ! Tu es de ces personnes avec qui le courant passe de suite. J'ai hâte de venir vous voir dans vos montagnes ! Merci à **Lise**, ça été un vrai plaisir de travailler ensemble pendant notre stage de master. Merci à **Yohan**, pour nos discussions sur la société, à **Elia**, de m'avoir appris les techniques du labo, et à **Martine** pour ta gentillesse et ta bienveillance. Je souhaiterais également remercier **Anna** et **Marion**, je vous souhaite le meilleur pour la suite de vos aventures dans la recherche !

Au-delà de l'équipe, c'est l'ensemble du personnel de l'unité, des animaleries et de l'IBPS que je souhaiterais remercier. Merci à **Bertrand Friguet**, pour votre disponibilité et réactivité. Merci à **Sandrine Picaud**, pour ton remarquable travail au A2L2 et toutes les fois où tu m'as aidée et conseillée. Je souhaiterais remercier particulièrement celles que je croisais toujours à l'animalerie, qu'importe l'heure de la journée et le jour de la semaine : merci à **Coline, Marie-Charlotte et Estelle**. Votre endurance et persévérance m'impressionnent ! Vous avez tout mon soutien pour la dernière ligne droite et je vous souhaite pleins de belles choses pour la suite ! Et évidemment un grand merci à toutes les personnes du B6 croisées dans les couloirs ou à la machine à café : merci à **Salima, Natayme, Coralie, Oriane, Francesca, Lou, Tamara...** vous donnez incontestablement de l'âme au B6 !

Je souhaiterais sincèrement remercier tous les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Un grand merci, Dr. **Jérôme Baufreton**, d'être rapporteur de ce travail et pour vos conseils avisés et l'intérêt que vous avez porté à ce projet tout au long des comités de suivi de thèse. Merci au Dr. **Corinne Beurrier**, d'avoir rapporté mon manuscrit de thèse et pour nos échanges lors de la conférence à Marseille. Je remercie également le Pr. **Jérôme Leroy** d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Merci pour votre bienveillance lors de nos échanges par e-mails. Merci au Dr. **Jean-Antoine Girault**, c'est un vrai plaisir et honneur de vous compter parmi les membres de mon jury. Je remercie également la Dr. **Slavica Krantic** d'avoir suivi mon parcours de doctorante. Merci pour la bienveillance que vous avez eu à mon égard et pour vos remarques pertinentes.

La thèse ne se résume pas qu'au travail de labo et de recherche. Il y a ces projets annexes, des réelles bouffées d'oxygène qui brisent la monotonie du quotidien. J'ai eu le plaisir de participer, deux années consécutives, à la mission de médiation « Vis ma vie de chercheur ». Merci à **Antoine, Rémy, Elsa, Flaminia, Helena, Yoann, Juliane, Justine, Raphaël**. Cette expérience n'aurait pas été aussi chouette sans vous et sans l'énergie débordante que vous avez. J'espère qu'on se recroisera autour d'un café ou avec un sac de randonnée sur le dos ! Je remercie également **Sarah, Anne-Lise, Maria et Cindy** : quelle expérience enrichissante d'organiser une conférence de Neurosciences à vos côtés ! Enfin, je remercie **Svethna, Samar** et toute l'équipe de **l'IDPA** pour la mise en place et le soutien de Pizz'of Science ! J'espère que cette initiative perdurera et continuera d'alimenter la belle dynamique que vous avez su si bien implémenter.

Je remercie celles et ceux, déjà présent-e-s avant cette folle aventure, qui ont été d'un soutien infailible et qui me rendent meilleure : merci d'être aussi extraordinaires ♥ ! **Virginie**, toujours partante pour la plus folle des aventures, **Raphaël**, ta vision du monde ne cessera de m'inspirer, **Morgane**, à quand la prochaine aventure ensemble, en sac à

dos, à l'autre bout du monde ? **Alice, Marie et Clémence**, notre quatuor de choc dispersé aux quatre coins de la France, avis de tempête assuré lorsque l'on se réunit !

Olivier, merci de croire autant en moi. J'espère que notre famille, déjà nombreuse, ne tardera pas à s'agrandir... car des aventures à deux fois deux roues, j'en ai pleins la tête !

Enfin, un immense merci à ma famille. Je crois que vous avez toujours su que je réaliserai ce rêve de gamine. Merci pour votre soutien inconditionnel, votre oreille attentive et vos conseils justes. Merci **Jean-jean et Koko**, vous avez le cœur solide après toutes mes aventures de globetrotteuse, **Cyrielle et Florent**, merci pour ces nombreuses parenthèses bourguignonnes : je re-signe demain pour un confinement avec vous et les chouchous ! **Florine et Ludo**, merci pour ces instants iodés !

LISTE DES ABREVIATIONS

7-NI – 7-nitroindazole

AC – adénylyl cyclase

ACh – acétylcholine

AIMs – *abnormal involuntary movements*

AKAP – protéine d'ancrage de la protéine kinase A

AMPA – α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique acid

AMPc – adénosine monophosphate cyclique

ATP – adénosine triphosphate

CDK5 – protéine kinase cycline-dépendante 5

ChAT – choline acetyltransférase

ChIN – interneurons cholinergiques

CNB – *cyclic nucleotide-binding*

CNG – canal activé par les nucléotides cycliques

CREB – protéine se fixant aux éléments de réponse de l'AMPc

DARPP-32 – phosphoprotéine régulée par l'AMPc et la dopamine, de 32 kDa

DAT – transporteur de dopamine

DLS – striatum dorsolatéral

DMS – striatum dorsomédial

Epac – protéine d'échange activée par l'AMPc

ERK – *extracellular signal-regulated kinases*

FACS – *fluorescence activating cell sorting*

FRET – transfert d'énergie entre molécules fluorescentes

GABA_A – acide γ -aminobutyrique

GAF – *cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases and Fh1A*

GC – guanylyl cyclase

GDP – guanosine diphosphate

GMPC – guanosine monophosphate cyclique

GTP – guanosine triphosphate

HCN – protéine-canal activée par l'hyperpolarisation, modulée par les nucléotides cycliques et non sélectif aux cations

IBMX – 3-isobutyl-1-méthylxanthine

IP₃ – inositoltriphosphate

Kirs – canaux potassique entrant rectifiant

KO – *knock-out*

Kv – canaux potassiques voltage dépendant

LID – dyskinésies induites par la L-DOPA

LTD – dépression à long terme

LTP – potentiation à long terme

MPTP – 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

MSK1 – *mitogen- and stress-activated kinase 1*

MSN D1/D2 – neurones épineux de taille moyenne de type D₁/D₂

NHR – région hydrophobe N-terminal

NO – monoxyde d'azote

(n)NOS – oxyde nitrique synthase (neuronale)

NMDA – N-méthyl-d-aspartate

NPY – neuropeptide Y

PDE – phosphodiesterase

PKA – protéine kinase A

PKC – protéine kinase C

PKG – protéine kinase dépendante du GMPC

PLTS – *persistent and low-threshold spike interneurons*

PSD95 – *postsynaptic protein density 95*

PV – parvalbumin

Rap – *Ras related protein*

RCPG – récepteur couplé aux protéines G

Récepteur A_{2A} – récepteur à l'adénosine de type 2A

Récepteur D_{1/5} – récepteur à la dopamine de type 1 à 5

Récepteur M_{1/5} – récepteur muscarinique de type 1 à 5

Récepteur nACh – récepteur nicotinique

sAHP – *slow after hyperpolarization*

SOM – somatostatine

STDP – plasticité fonction du temps d'occurrence des impulsions

TH – tyrosine hydroxylase

TRAP – *targeted recombination in active populations*

TTX – tétrodotoxine

UPR – *upstream conserved region*

VMAT2 – *vesicular monoamine transporter 2*

WT – *wild-type*

1 – INTRODUCTION GENERALE

La maladie de Parkinson est la deuxième maladie neurodégénérative la plus fréquente dans le monde. Elle touche environ 8,5 millions de personnes, ce chiffre ne cessant d'augmenter. Les principaux symptômes sont moteurs (tremblements, rigidité musculaire et akinésie) et causés par la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta*. Aujourd'hui, aucun traitement ne peut guérir cette maladie. Il est crucial de mieux comprendre les conséquences de cette dégénérescence neuronale puis mettre en évidence de nouvelles pistes thérapeutiques pour permettre le développement de nouveaux médicaments.

Les thérapies actuelles visent à pallier le manque de dopamine et permettent seulement de traiter les symptômes. Actuellement, le lévodopa constitue le traitement de référence de la maladie de Parkinson. Il s'agit d'un précurseur de la dopamine, la L-DOPA, converti en dopamine, compensant alors les faibles niveaux de dopamine. Ce traitement est efficace durant les cinq à dix premières années. A long terme, il conduit toutefois au développement des dyskinésies, des mouvements involontaires très invalidants.

Les recherches effectuées sur la maladie de Parkinson depuis plusieurs décennies ont entre autre mis en évidence des altérations du striatum, une région sous-corticale cible des neurones dopaminergiques, appartenant au système des ganglions de la base et impliquée dans le contrôle moteur. De nombreuses adaptations des neurones du striatum ont lieu suite à la dégénérescence des neurones dopaminergiques et sont également mises en cause dans le développement des dyskinésies lors du traitement à la L-DOPA. Mieux comprendre le fonctionnement cellulaire et moléculaire du striatum en situation non-pathologique et pathologique est essentiel pour mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques.

Dans la suite de l'introduction, le fonctionnement du striatum, de sa physiologie vers son fonctionnement cellulaire, sera présenté, avant d'explicitier les altérations striatales dans la maladie de Parkinson et les dyskinésies associées au traitement par la L-DOPA (LID, *L-DOPA-induced dyskinesia*).

1.1 – Le striatum dans le système des ganglions de la base

Les ganglions de la base regroupent un ensemble de structures sous-corticales interconnectées, hautement conservées chez les vertébrés : le striatum, le globus pallidus, le noyau sous-thalamique et la substance noire (Grillner et al., 2013; Redgrave

et al., 2010). Ces structures interviennent principalement dans la mise en place de programmes moteurs, l'apprentissage, la sélection de l'action, le circuit de la récompense et la formation d'habitudes (Albin et al., 1989; Graybiel, 2008; Redgrave et al., 2010).

Les ganglions de la base constituent un point de convergence entre les afférences glutamatergiques du cortex et du thalamus (Alexander and Crutcher, 1990; Berendse and Groenewegen, 1990; Kress et al., 2013) et les afférences dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* et de l'aire tegmentale ventrale (Gerfen, 1992; Lynd-Balta and Haber, 1994; Björklund and Dunnett, 2007). Ces afférences projettent toutes vers le striatum, la principale voie d'entrée des ganglions de la base. L'information est alors traitée puis transmise aux structures de sorties (principalement la substance noire *pars reticulata*) puis vers le thalamus. Ce dernier relaie ensuite l'information vers différentes zones corticales (Bolam et al., 2000; Nelson and Kreitzer, 2014; Obeso and Lanciego, 2011).

1.1.1 – Organisation anatomique

Bien que le striatum ne présente pas de différence cyto-architecturale dans son ensemble, il est classiquement divisé en trois régions sur la base d'afférences provenant de régions distinctes : le striatum dorsomédial (*dorsomedial striatum*, DMS, noyau caudé chez les primates), le striatum dorsolatéral (*dorsolateral striatum*, DLS, putamen chez les primates) et le striatum ventral (ou noyau accumbens) (Voorn et al., 2004). Chaque région se différencie par des afférences provenant de zones cérébrales différentes, conférant ainsi des fonctions biologiques distinctes. Le DMS reçoit des afférences glutamatergiques du cortex associatif et est responsable des apprentissages de comportements instrumentaux, c'est-à-dire l'apprentissage d'un comportement adapté à une action et aboutissant à un résultat. Cet apprentissage permet une adaptation rapide à l'environnement (Balleine and Dickinson, 1998; Yin and Knowlton, 2006). La répétition de ce comportement orienté vers un but devient alors une habitude qui devient moins sensible au résultat de l'action. Cet apprentissage est associé au DLS recevant les afférences du système sensori-moteur (Balleine et al., 2009; Balleine and O'Doherty, 2010). Le striatum ventral se divise en deux parties, le *core* et *shell*. Ces deux régions reçoivent des afférences du cortex frontal et des régions limbiques et interviennent principalement dans l'attention, la motivation et le système de prédiction de la récompense (Berridge and Robinson, 1998; Brog et al., 1993; Cardinal et al., 2002).

1.1.2 – Organisation neurochimique

Basé sur des propriétés neurochimiques distinctes leur conférant des fonctions propres, le striatum peut-être sous divisé en deux types de compartiments : les matrices et les striosomes (aussi nommés *patches*) (figure 1) (Gerfen, 1984; Graybiel and Ragsdale, 1978; Herkenham and Pert, 1981; Pert et al., 1976). Des études par immunomarquages ont mis en évidence une expression de l'enképhaline et de la substance P concentrées dans les striosomes (Gerfen, 1984; Graybiel et al., 1981). A l'inverse, les matrices présentent une forte expression de la somatostatine et de l'acétylcholine estérase (Gerfen, 1985, 1984; Graybiel and Ragsdale, 1978). Les deux compartiments reçoivent des afférences corticales et limbiques, bien que les afférences des régions sous-corticales limbiques montrent une préférence pour les striosomes (Fujiyama et al., 2011; Smith et al., 2016). Concernant leurs voies de sortie, seuls les striosomes projettent vers la substance noire compacte. Toutefois, certains neurones de la matrice nommés *exopatch* (neurones ayant les propriétés des neurones du striosome mais présents uniquement dans la matrice) projettent également dans la substance noire compacte (Smith et al., 2016).

Le développement des souris BAC (*bacterial artificial chromosome*) a permis d'étudier individuellement les neurones présents dans chaque compartiment et de mieux caractériser leurs fonctions (Valjent et al., 2009). Par exemple, les interneurons cholinergiques se trouvent à l'interface entre les striosomes et les matrices. Ils permettent d'établir le lien entre les neurones présents uniquement dans les matrices et ceux présents uniquement dans les striosomes (Aosaki et al., 1995; Bernácer et al., 2007; Kawaguchi et al., 1989; Walker et al., 1993). Cette localisation spécifique permettrait de moduler l'apprentissage dans des environnements incertains et semble essentielle dans la prise de décision et la sélection de l'action (Amemori et al., 2011; Brimblecombe and Cragg, 2017)

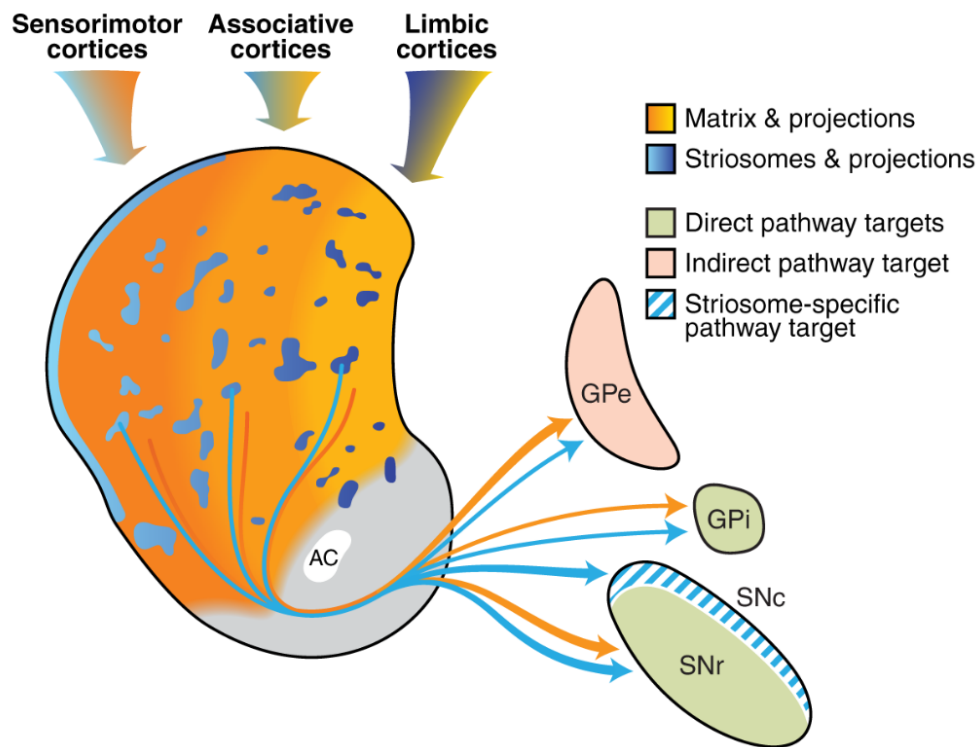


Figure 1 : Organisation neurochimique du striatum (figure reprise de la revue de Crittenden & Graybiel, 2011). Schéma représentant les matrices (orange) et striosomes (bleu) du striatum. Le dégradé du striatum de la partie médiale (orange clair) vers la partie latérale (orange foncé) représente les domaines limbiques, associatifs et sensorimoteurs. La couleur des flèches arrivant sur le striatum représente la proportion de chaque aire corticale projetant vers les matrices et striosomes. Les flèches quittant le striatum représentent les projections des neurones GABAergiques (neurones épineux de taille moyenne) vers les différentes voies des ganglions de la base. AC = commissure antérieure ; GPe = globus pallidus externe ; GPi = globus pallidus interne ; SNc = substance noire compacte ; SNr = substance noire réticulée. (Crittenden and Graybiel, 2011)

1.1.3 – La libération de la dopamine dans le striatum

La dopamine est synthétisée par les neurones dopaminergiques et représente un neurotransmetteur important dans le fonctionnement des ganglions de la base, et particulièrement dans le striatum. Les neurones dopaminergiques représentent une très faible fraction du nombre total de neurones du système nerveux central (environ 45 000 chez le rat et 590 000 chez l'être humain) (Chinta and Andersen, 2005; German and Manaye, 1993). Leurs projections axonales se retrouvent dans un grand nombre de structures telles que le mésencéphale, le cortex, l'hippocampe, l'amygdale, l'hypothalamus ou encore le bulbe olfactif. Les neurones dopaminergiques interviennent dans de nombreux processus : le contrôle moteur, la motivation, le système de récompense, l'attention, l'apprentissage, l'olfaction, la vision, la régulation hormonale ou encore la régulation du sommeil (Klein et al., 2019).

Dans le système nerveux central des mammifères, les neurones dopaminergiques sont répartis dans 10 noyaux, nommés A8 à A17 (Dahlstroem and Fuxe, 1964). L'étude génétique du profil d'expression des neurones dopaminergiques a mis en évidence plusieurs sous-types de neurones, projetant dans des zones spécifiques du striatum (Poulin et al., 2018). Les auteurs proposent que cette classification permettra, à l'avenir, de cibler plus spécifiquement un sous-groupe de neurones dopaminergiques impliqué dans une pathologie (Poulin et al., 2020). Les noyaux du mésencéphale A8, A9 et A10 sont présents, respectivement, dans le champ rétro-rubral (correspondant à la région dorso-caudale de la substance noire), la substance noire et l'aire tegmentale ventrale. Les neurones dopaminergiques des noyaux A8 et A9 constituent le système nigrostrié (Lindvall and Björklund, 1979) et ceux du noyau A10 appartiennent au système méso-cortico-limbique (Dahlstroem and Fuxe, 1964). Les trois noyaux projettent dans le striatum via le faisceau médial du prosencéphale (MFB, *medial forebrain bundle*) (Shimizu and Ohnishi, 1973; Takagi et al., 1980). La dégénérescence des neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée étant la principale cause de la maladie de Parkinson, une lésion dans le MFB est souvent réalisée pour l'obtention des modèles animaux de la maladie de Parkinson (*cf.* Matériels & Méthodes).

Les neurones dopaminergiques sont généralement identifiés par immunohistochimie grâce à l'expression spécifique de la tyrosine hydroxylase (TH) et du transporteur de la recapture de la dopamine (DAT, *dopamine active transporter*). Ces deux protéines sont notamment impliquées dans le métabolisme et la régulation des niveaux de dopamine intra- et extracellulaires. La TH est l'enzyme limitante dans la synthèse de la dopamine. Elle utilise la tyrosine comme substrat pour former la DOPA (3,4-dihydroxyphénylalanine), qui est ensuite rapidement convertie en dopamine par la DOPA décarboxylase (figure 2) (Kaufman and Milstein, 2013). La DOPA décarboxylase effectue une décarboxylation des acides aminés aromatiques et peut donc utiliser d'autres substrats pour former d'autres neuromodulateurs, comme la sérotonine à partir de 5-HTP (5-hydroxy-L-tryptophane). La DOPA décarboxylase est notamment exprimée par les neurones sérotoninergiques. C'est pourquoi dans le cas du traitement lévodopa de la maladie de Parkinson, la L-DOPA recapturée par les neurones sérotoninergiques y est convertie en dopamine (*cf.* 1.5.1 – Les traitements actuels).

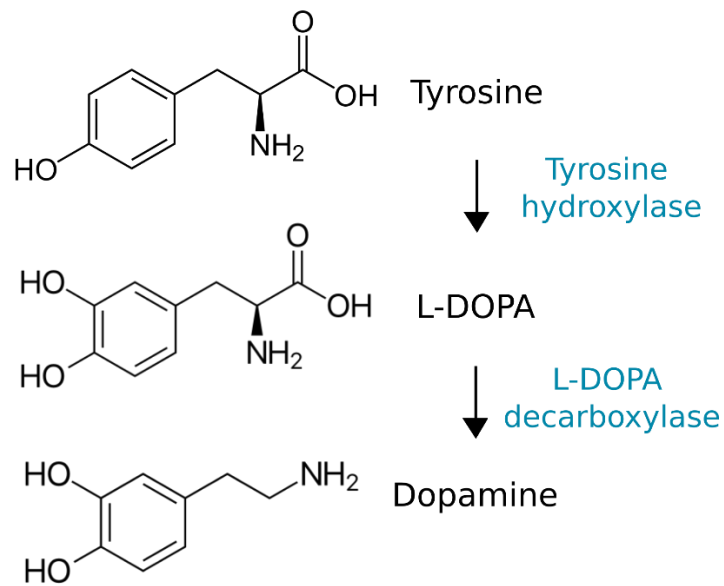


Figure 2 : étapes de synthèse de la dopamine dans les neurones dopaminergiques. La tyrosine est convertie en L-DOPA par la tyrosine hydroxylase, elle-même convertie en dopamine par la L-DOPA décarboxylase.

Une fois synthétisée dans le cytosol, la dopamine est stockée dans des vésicules situées près des sites de libération (Freund et al., 1984). Le transport de la dopamine dans les vésicules se fait par le transporteur vésiculaire des monoamines de type 2 (VMAT-2) (Nirenberg et al., 1996). La haute concentration de ces vésicules au niveau des sites de libération participe à la formation de sites dits actifs, avec une haute probabilité de libération de la dopamine (Freund et al., 1984; Garris et al., 1994; Liu et al., 2018). Ces sites actifs sont présents aussi bien au niveau des varicosités, qu'au niveau de boutons axonaux '*en passant*' (Descarries et al., 1996; Groves et al., 1995, 1994). Lors d'une dépolarisation du neurone dopaminergique, les vésicules fusionnent avec la membrane plasmique, conduisant alors à l'exocytose de la dopamine dans le milieu extracellulaire. L'utilisation de faux neurotransmetteurs fluorescents a par ailleurs mis en évidence que seule une faible fraction des varicosités (environ 20 %) libère la dopamine lors d'un potentiel d'action (Pereira et al., 2016). De plus, la probabilité de libération varie en fonction des régions du striatum. Celle-ci est plus importante dans le striatum dorsolatéral, associé aux aires sensorimotrices, conduisant à une libération de dopamine 20 fois plus importante après un unique potentiel d'action, en comparaison au striatum ventromédial, associé aux aires limbiques (Cragg, 2003).

Contrairement aux synapses glutamatergiques, la libération de dopamine se fait de manière volumique (Fuxe and Agnati, 1992). Ceci est en accord avec l'absence d'une densité post-synaptique des récepteurs à la dopamine (Doucet et al., 1986), qui sont principalement extrasynaptiques (Caillé et al., 1996; Hersch et al., 1995; Rice et al., 2011). Cette transmission volumique a longtemps été associée à un signal lent et

spatialement non sélectif. Pourtant, plusieurs études ont démontré que la spécificité du signal dopaminergique lors d'une transmission volumique est principalement délimitée par trois facteurs : la densité des synapses dopaminergiques, la diffusion et la recapture de la dopamine et la distance des récepteurs à la dopamine par rapport au site de libération.

Bien que peu nombreux par rapport au nombre total de cellules striatales, les neurones dopaminergiques présentent une arborisation axonale très dense (1 à $1,7 \times 10^8$ varicosités par mm^3 dans le striatum dorsal) (Doucet et al., 1986; Matsuda et al., 2009; Pickel et al., 1981). Wickens et Arbuthnott ont estimé qu'une cellule striatale reçoit environ 1000 contacts synaptiques des terminaisons dopaminergiques (Wickens and Arbuthnott, 2005). Ainsi, les sites de libération seraient en moyenne espacés les uns des autres de 3.5 - 4.0 μm (Cragg and Rice, 2004; Gonon et al., 2000). Toutefois, il est important de prendre en considération l'hétérogénéité de la distribution des synapses, comme cela a été observé par microscopie électronique (Freund et al., 1984; Groves et al., 1994). Tenant compte de cette non-uniformité, Arbuthnott et Wickens proposent une distance moyenne de 1.18 μm entre chaque synapse (Arbuthnott and Wickens, 2007). Une fois libérée dans l'espace extracellulaire, la dopamine diffuse en dehors de l'espace synaptique. Considérant la demi-vie de la dopamine, Gonon *et al.* estiment une diffusion de la dopamine jusqu'à 7 μm autour du site de libération. La forte densité des sites de libération et la rapide diffusion de la dopamine conduisent donc à une rapide uniformisation de la concentration extracellulaire en dopamine lors d'une libération synchronisée, estimée à moins de 3 ms (Garris et al., 1994; Gonon et al., 2000).

La diffusion est également limitée par la recapture de la dopamine par les DATs exprimés principalement par les neurones dopaminergiques mais aussi par les cellules gliales. La recapture constitue le mécanisme principal responsable de l'élimination de la dopamine dans l'espace extracellulaire (Benoit-Marand et al., 2000). Ce mécanisme limite la diffusion et la concentration extrasynaptique de la dopamine. Un modèle de souris KO pour les DATs (DAT *knock-out*, $\text{KO}^{-/-}$) présente effectivement une distance de diffusion de la dopamine supérieure (Benoit-Marand et al., 2000; Jones et al., 1998). La recapture de la dopamine joue également un rôle dans le recyclage de la dopamine dans les vésicules présynaptiques, indépendamment d'une nouvelle synthèse (Jones et al., 1998).

Les neurones dopaminergiques présentent deux profils de décharge : tonique et phasique. Le mode de décharge tonique correspond à un profil de décharge à basse fréquence (3 – 8 Hz). Il s'agit d'une activité autonome de type pacemaker qui conduit à une libération faible mais prolongée de dopamine, autour de 10 nM (Barath et al., 2020; Kawagoe et al., 1992; Kim et al., 2021; Oh et al., 2018). Cette activité tonique se fait de

manière asynchrone entre les neurones dopaminergiques ce qui conduit à un équilibre entre la libération et la recapture de la dopamine. A partir de cette concentration uniforme, ce sont les fluctuations en dopamine qui servent de signal biologique. En effet, l'inhibition des neurones dopaminergiques par les afférences GABAergiques du pallidum ventral les hyperpolarise, marquant une pause dans la libération tonique de dopamine (Bunney and Grace, 1978; A. A. Grace and Bunney, 1984). D'ailleurs, seule la moitié des neurones dopaminergiques présente une activité tonique permettant de maintenir un niveau faible de dopamine dans le striatum. A l'inverse, le mode de décharge phasique des neurones dopaminergiques est associé à un mode de décharge à haute fréquence (12 – 40 Hz) et se caractérise par une rafale de potentiels d'action (A. Grace and Bunney, 1984; A. A. Grace and Bunney, 1984; Grace and Bunney, 1983; Hyland et al., 2002; Jin and Costa, 2010). Ce mode de décharge conduit alors à une augmentation rapide des niveaux extracellulaires de dopamine, jusqu'à 10 μ M (Aragona et al., 2008; Kawagoe et al., 1992; Wickham et al., 2013; Wightman and Zimmerman, 1990). C'est la synchronisation des neurones dopaminergiques et donc la sommation de la dopamine libérée qui conduit à cette augmentation rapide des niveaux extracellulaires de dopamine (Chergui et al., 1994). Cette synchronisation se fait par les afférences glutamatergiques provenant du cortex et du noyau sous-thalamique, qui activent les récepteurs ionotropiques NMDA (N-méthyl-d-aspartate) des neurones dopaminergiques (Chergui et al., 1994; Chesselet, 1984; A. Grace and Bunney, 1984; Krebs et al., 1991). Les neurones dopaminergiques ayant une haute probabilité de libération, l'activité phasique conduit rapidement à une diminution des vésicules synaptiques et donc à une dépression (Cragg, 2003). Ce mécanisme de libération de la dopamine, combiné à celui de diffusion et de recapture, déterminent la fenêtre temporelle d'action de la dopamine phasique, située entre 50 et 100 ms (Cragg and Rice, 2004; Liu et al., 2018).

L'activité tonique et phasique des neurones dopaminergiques est également inhibée par une auto-inhibition rétroactive. Effectivement, les neurones dopaminergiques expriment à leur surface les récepteurs à la dopamine de type D₂. Après une libération phasique ou tonique, l'activation de ces autorécepteurs inhibe le neurone dopaminergique et empêche la production de potentiels d'action (Anzalone et al., 2012; Bello et al., 2011; Ford, 2014)

Le signal dopaminergique, bien qu'il se produise de manière volumique, a lieu sur une échelle de temps inférieure à la seconde et est donc un signal rapide. Pourtant, les récepteurs à la dopamine sont des récepteurs couplés aux protéines G qui agissent à une échelle de temps beaucoup plus lente que les récepteurs ionotropiques, représentant donc un facteur temporel limitant. C'est pourquoi Liu et al. proposent un

modèle de chevauchement de régions (*domain-overlap model*) pouvant expliquer le rôle d'un signal dopaminergique rapide. Ils suggèrent que la haute probabilité de libération est essentielle pour permettre une libération synchronisée. Ainsi l'augmentation des niveaux de dopamine est suffisante pour conduire à la saturation des DATs et permettre une diffusion de la dopamine suffisamment loin pour atteindre des récepteurs situés loin des sites de libération (Liu et al., 2021). Ce modèle est en adéquation avec des études montrant que la saturation des DATs suite à une libération phasique conduit à une diffusion de la dopamine jusqu'à 12 μm autour du site de libération (Cragg and Rice, 2004; Rice and Cragg, 2008; Schultz, 2007)

Ces différents modes de décharges sont complémentaires. Ils agissent avec des temporalités différentes et permettent ainsi d'encoder des processus comportementaux d'échelle de temps variable. L'activité tonique participe aux comportements d'échelle temporelle plus longue, comme le stress et l'incertitude (Schultz, 2007). A l'inverse, l'activité phasique permet d'encoder des réponses avec un fort contraste temporel comme l'apprentissage de l'erreur de prédiction de la récompense (RPE, *reward prediction error*) (Hart et al., 2014; Schultz et al., 1997; Waelti et al., 2001). Néanmoins, il reste difficile (et probablement inapproprié) d'associer un mode de libération des neurones dopaminergiques à un comportement précis (Berke, 2018). Le mode d'activité des neurones dopaminergiques dépend des informations qu'ils intègrent, qui diffèrent selon leur localisation et la temporalité des événements. De récentes études ont d'ailleurs montré une hétérogénéité au sein même de la population de neurones dopaminergiques, dépendante des connexions afférentes et efférentes (Morales and Margolis, 2017; Poulin et al., 2014).

1.1.4 – Organisation cellulaire

Le striatum est composé majoritairement (95 %) de neurones épineux striataux (MSN, *medium-sized spiny neurons*) (Figure 3A) (Kemp and Powell, 1971a, 1971b), les autres neurones étant des interneurones modulant l'activité des MSNs (Kawaguchi et al., 1995; Bolam et al., 2000; Tepper and Bolam, 2004). Les interneurones ont été divisés en plusieurs sous catégories, en fonction de leur morphologie et leurs caractéristiques biochimiques : les grands interneurones cholinergiques (*Cholinergic Interneurons*, ChIN) (Figure 3D) (Butcher and Hodge, 1976; Fonnum et al., 1974), les interneurones NOergiques exprimant le neuropeptide Y, la somatostatine et l'oxyde nitrique synthase (NOS, *nitric oxid synthase*) (Figure 3B) (Kawaguchi, 1993), les interneurones GABAergiques exprimant la calrétinine (Jacobowitz and Winsky, 1991) et les interneurones GABAergiques exprimant la parvalbumine (aussi appelé *fast-spiking interneurons*) (Figure 3C) (Bolam et al., 1985, 1983). Dans la suite de l'introduction, les

MSNs, ChIN et interneurons NOergiques seront particulièrement développés.

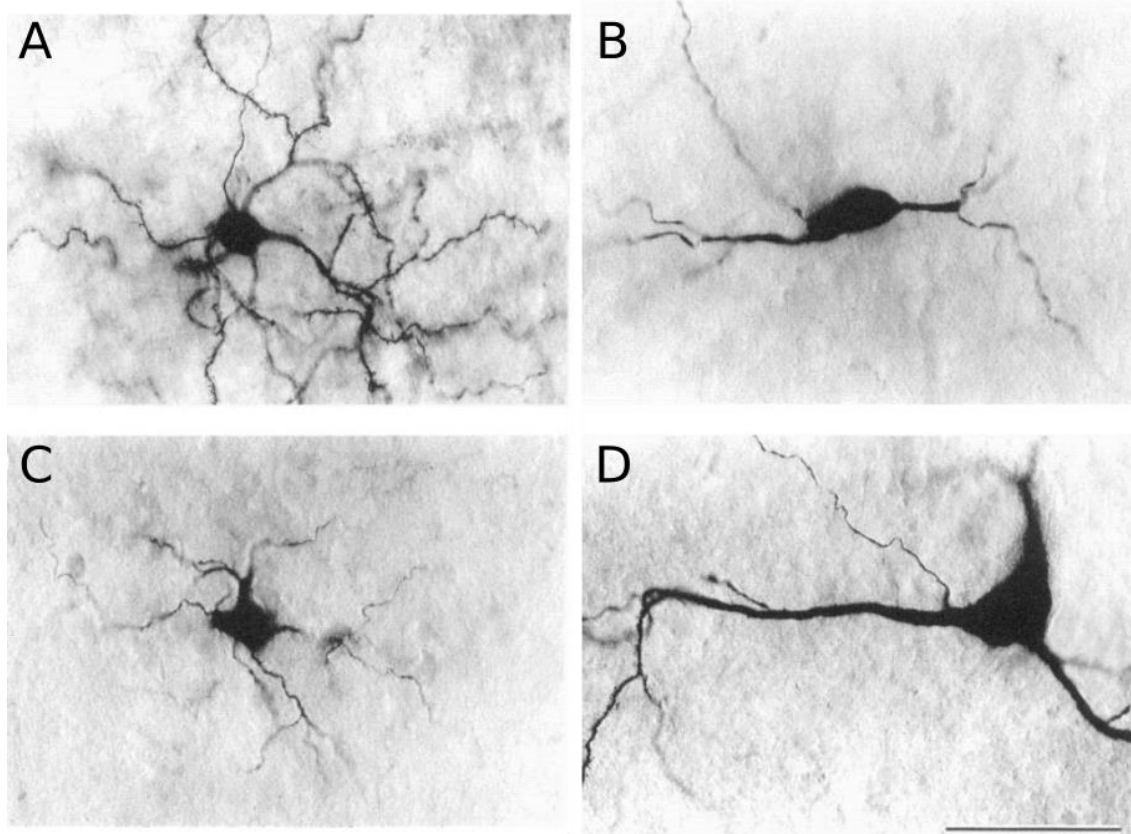


Figure 3 : Neurones du striatum de rat marqués à la biocytine (figure reprise de Kawaguchi, 1993). A : neurone épineux de taille moyenne (MSN) ; B : interneurone NOergique ; C : interneurone parvalbumine ; D : interneurone cholinergique (ChIN) ; barre d'échelle = 50 μ M (Kawaguchi, 1993)

1.2 – Les neurones épineux striataux de taille moyenne

Les neurones épineux de taille moyenne du striatum prennent leur nom de leur morphologie : avec un corps cellulaire d'une taille approchant les 15 μ m (chez le rat), ils présentent, le long de leurs dendrites, de nombreuses épines (Wilson and Groves, 1980).

1.2.1 – Mise en place du mouvement par les MSNs

Les MSNs sont des neurones GABAergiques (Kita and Kitai, 1988). Bien que morphologiquement semblables, deux types de MSNs ont été identifiés en fonction de leur connectivité aux voies de sortie. Les MSNs striato-nigraux appartiennent à la voie dite « directe » et projettent directement vers les noyaux de sortie, c'est-à-dire le globus pallidus interne et la substance noire *pars reticulata*. Les MSNs striato-pallidaux appartiennent à la voie dite « indirecte » et projettent vers le globus pallidus externe, lui-même projetant vers les noyaux de sortie via le noyau sous-thalamique (figure 4).

Les MSNs striato-nigraux conduisent ainsi à une désinhibition des afférences excitatrices thalamo-corticales tandis que les MSNs striato-pallidaux conduisent indirectement à leur inhibition. Ainsi, la représentation classique du modèle voie directe/indirecte représente les MSNs striato-nigraux comme promoteurs du mouvement, tandis que l'activation des MSNs striato-pallidaux favorise l'inhibition du mouvement (Albin et al., 1989; DeLong, 1990).

L'utilisation d'outils génétiques ciblant spécifiquement les MSNs de la voie directe ou indirecte est en faveur de ce modèle (Bateup et al., 2010; Drago et al., 1998; Durieux et al., 2012, 2009). Le développement de l'optogénétique, qui permet un contrôle temporel plus précis de la voie directe ou indirecte (de l'ordre des millisecondes), a confirmé que la stimulation sélective de la voie directe augmente la locomotion, tandis que l'activation sélective de la voie indirecte inhibe le mouvement chez la souris (Kravitz et al., 2010; Tai et al., 2012).

Ce modèle hautement simplifié a permis dans un premier temps de mieux comprendre le fonctionnement du striatum au sein des ganglions de la base en situation saine et pathologique. Toutefois, il ne prend pas en compte de nombreux paramètres comme la modulation de leur activité par les afférences GABAergiques (des interneurons ou d'autres MSNs). De plus, les MSNs striato-pallidaux et striato-nigraux ne reçoivent pas les mêmes afférences glutamatergiques et dopaminergiques et traitent ainsi des informations différentes (Nambu, 2008; Obeso and Lanciego, 2011). Au cours de la dernière décennie, le développement des souris BAC et des sondes calciques (rapporteur de l'activité neuronale) ont mis en évidence une activation de la voie directe et indirecte lors de l'initiation du mouvement. A l'inverse, lorsque l'animal est immobile, l'activité neuronale des deux voies est faible (Cui et al., 2013). Une activité concomitante de ces deux voies semble donc requise pour permettre une sélection de l'action (Tecuapetla et al., 2016).

Lorsque l'on étudie l'incidence de la voie directe et indirecte dans la mise en place du mouvement, il est primordial de considérer également la voie dite « hyperdirecte » correspondant aux afférences corticales projetant directement sur le noyau sous thalamique, sans passer par le striatum (Figure 4) (Coudé et al., 2018; Georgopoulos et al., 1983; Nambu et al., 2002, 1996). Cette voie hyperdirecte agit plus rapidement sur le noyau sous-thalamique que les autres voies et permettrait d'inhiber les mouvements inappropriés (Chen et al., 2020; Nambu et al., 2002; Sano et al., 2013).

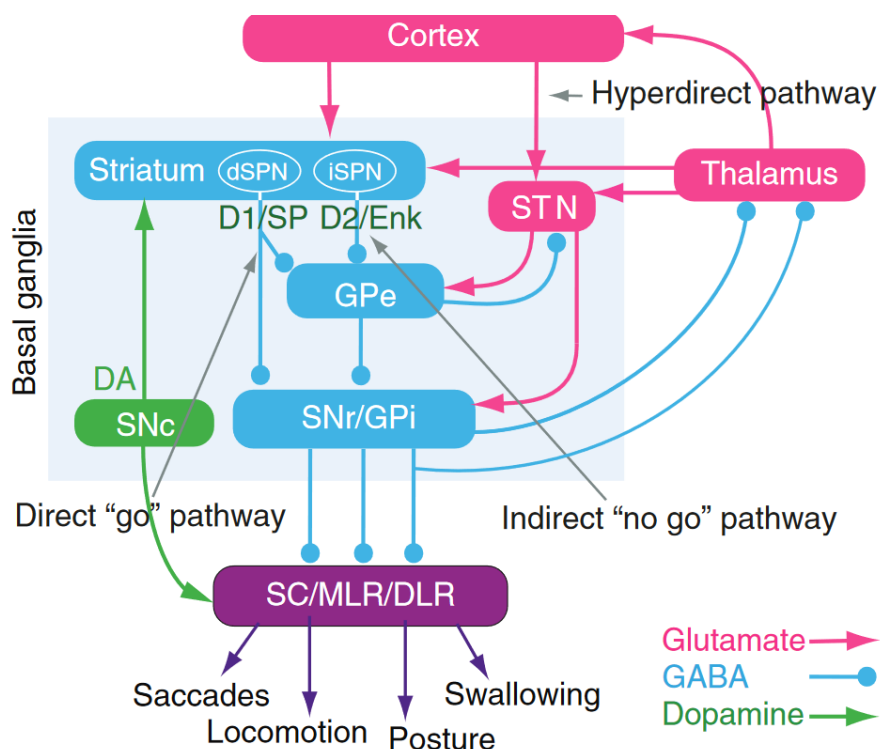


Figure 4 : schéma représentatif de l'organisation des ganglions de la base (figure reprise de Grillner et al. 2020). Les neurones dopaminergiques projettent dans le striatum, voie d'entrée des ganglions de la base, où la dopamine active les MSNs striato-nigraux (dSPN) et inhibe les MSNs striato-pallidaux (iSPN). Les MSNs striato-nigraux forment la voie directe en ciblant la voie de sortie des ganglions de la base : la SNr/GPi (substance noire réticulée et globus pallidus interne). Les MSNs striato-pallidaux forment la voie indirecte via le GPe (globus pallidus externe), STN (noyau sous-thalamique), SNr/GPi. La voie de sortie des ganglions de la base inhibe le colliculus supérieur (SC), la région mésencéphalique (MLR) et diencephalique (DLR) et le thalamus. La voie hyperdirecte correspond aux afférences corticales vers le STN. Les neurones glutamatergiques sont représentés en rose, les neurones GABAergiques en bleu et les neurones dopaminergiques en vert (Grillner et al., 2020)

Ainsi le modèle considérant la voie hyperdirecte, directe et indirecte propose le fonctionnement suivant des ganglions de la base dans l'initiation du mouvement : l'activité neuronale de la voie hyperdirecte agit en premier sur les noyaux sous-thalamiques et inhibe les mouvements inappropriés, ensuite la voie directe via l'inhibition de la substance noire *pars reticulata* favorise le mouvement souhaité et enfin l'action de la voie indirecte sur la substance noire permet de terminer le mouvement (Cui et al., 2013; Sano et al., 2013; Schmidt et al., 2013). Ces données suggèrent que l'aspect temporel d'activation de chaque voie est essentiel au fonctionnement du striatum.

1.2.2 – Propriétés électriques des MSNs

Les MSNs partagent des propriétés électriques communes. Ils peuvent se trouver dans deux états appelés état bas (*down state*) ou état haut (*up state*) correspondant à un potentiel membranaire allant, respectivement, de -94 mV à -60 mV et de -60 mV à 40 mV (Matell and Meck, 2004; Wilson and Kawaguchi, 1996). L'état bas correspond à un potentiel membranaire hyperpolarisé et est dû à l'activation des canaux potassiques entrants rectifiants (canaux Kirs, *inwardly rectifying potassium-selective channel*). Dans cet état, les stimuli glutamatergiques isolés ne sont pas suffisants pour dépolariser la membrane des MSNs et permettre aux MSNs de passer dans un état haut (Kawaguchi et al., 1989; Kita et al., 1984; Nisenbaum and Wilson, 1995). Seule une activité glutamatergique corticale coordonnée permet une désactivation des canaux Kirs et une activation des canaux potassiques voltage dépendant (Kv, *voltage-gated potassium channel*) (Kv4.2, Kv1.2 et Kv7) (James Surmeier et al., 1989; Kreitzer, 2009; Surmeier et al., 1991; Tkatch et al., 2000; Wilson and Kawaguchi, 1996). Les MSNs agissent donc comme des détecteurs de coïncidence de l'activité corticale. C'est dans cet état haut que les MSNs peuvent produire des potentiels d'action à basse fréquence (Wilson and Kawaguchi, 1996). Par ailleurs, les MSNs striato-pallidaux présentent une probabilité de décharge plus grande que les MSNs striato-nigraux causée par une plus faible expression des canaux Kirs (Gertler et al., 2008; Kreitzer and Malenka, 2007; Planert et al., 2013). De plus, seuls les canaux Kirs des MSNs striato-pallidaux sont inhibés par les récepteurs muscariniques M₁, cette différence étant probablement causée par une composition différentes des sous-unités des canaux Kirs (Shen et al., 2007). Cela suggère que les MSNs striato-pallidaux sont plus prompts à passer dans un état haut que les MSNs striato-nigraux.

La libération de dopamine module l'état dans lequel se trouvent les MSNs : la dopamine induit une dépolarisation et augmente l'excitabilité des MSNs striato-nigraux, tandis qu'elle diminue l'excitabilité des MSNs striato-pallidaux (Planert et al., 2013).

1.2.3 – Modulation de la voie AMPc/PKA dans les MSNs

Les MSNs striato-nigraux et striato-pallidaux se différencient également par leurs caractéristiques biochimiques, notamment en exprimant des récepteurs différents. Les MSNs striato-nigraux expriment les récepteurs à la dopamine D₁, les récepteurs muscariniques M₄ et les récepteurs à l'adénosine A₁. Les neurones striato-pallidaux expriment les récepteurs à la dopamine D₂ et les récepteurs à l'adénosine A_{2A}. Plusieurs études ont par ailleurs montré une co-expression des récepteurs D₁ et D₂ : chez le rat, environ 6 % des MSNs du striatum dorsal et 30 % des MSNs du striatum ventral (Bertran-

Gonzalez et al., 2008; Perreault et al., 2010), chez la souris ces chiffres étant, respectivement, 4 % et 15 % (Bertran-Gonzalez et al., 2008; Hasbi et al., 2020).

Dans la suite du manuscrit, je nommerai les MSNs striato-nigraux, MSNs D1, et les MSNs striato-pallidaux, MSNs D2.

1.2.3.1 – Stimulation de la voie AMPc/PKA

1.2.3.1.1 – Les récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs à la dopamine, les récepteurs muscariniques et les récepteurs à l'adénosine appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ces récepteurs sont membranaires et composés de sept hélices α hydrophobes transmembranaires, avec un domaine N-terminal extracellulaire et un domaine C-terminal intracellulaire. Les principaux effecteurs des RCPG sont les protéines hétérotrimériques G. Elles sont composées de trois sous-unités $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$. A l'état inactif, la sous-unité $G\alpha$ lie une molécule de GDP (guanosine diphosphate). Lorsque l'agoniste se lie sur le RCPG, un changement de conformation du récepteur induit un recrutement de la protéine G. Suite à ce couplage, la sous-unité $G\alpha$ libère le GDP pour lier une molécule de GTP (guanosine triphosphate) et se dissocie des deux autres sous-unités. Chaque sous-unité peut alors moduler les protéines cibles, telles que les adénylyl cyclases (AC) ou les phospholipases C. L'extinction du signal se fait par les RGS (*regulator of G-protein signaling*) qui hydrolysent le GTP en GDP. Ainsi la protéine hétérotrimérique G peut se reformer. Contrairement aux récepteurs ionotropiques, l'activation des RCPG induit une suite d'activation de différentes protéines. Ces récepteurs sont donc associés à des réponses intracellulaires plus lentes (de l'ordre de 100 ms). Les RCPG constituent des sites accessibles à la surface membranaire et régulent de nombreux processus physiologiques, tels que la transmission neuronale, la signalisation hormonale, l'inflammation, la vision, etc... Cela les rend particulièrement attractifs pour le développement de nouvelles drogues pharmacologiques. Aujourd'hui, environ 35 % des médicaments approuvés par l'agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux (*U.S. food and drug administration, FDA*) ciblent les RCPG (Hauser et al., 2017).

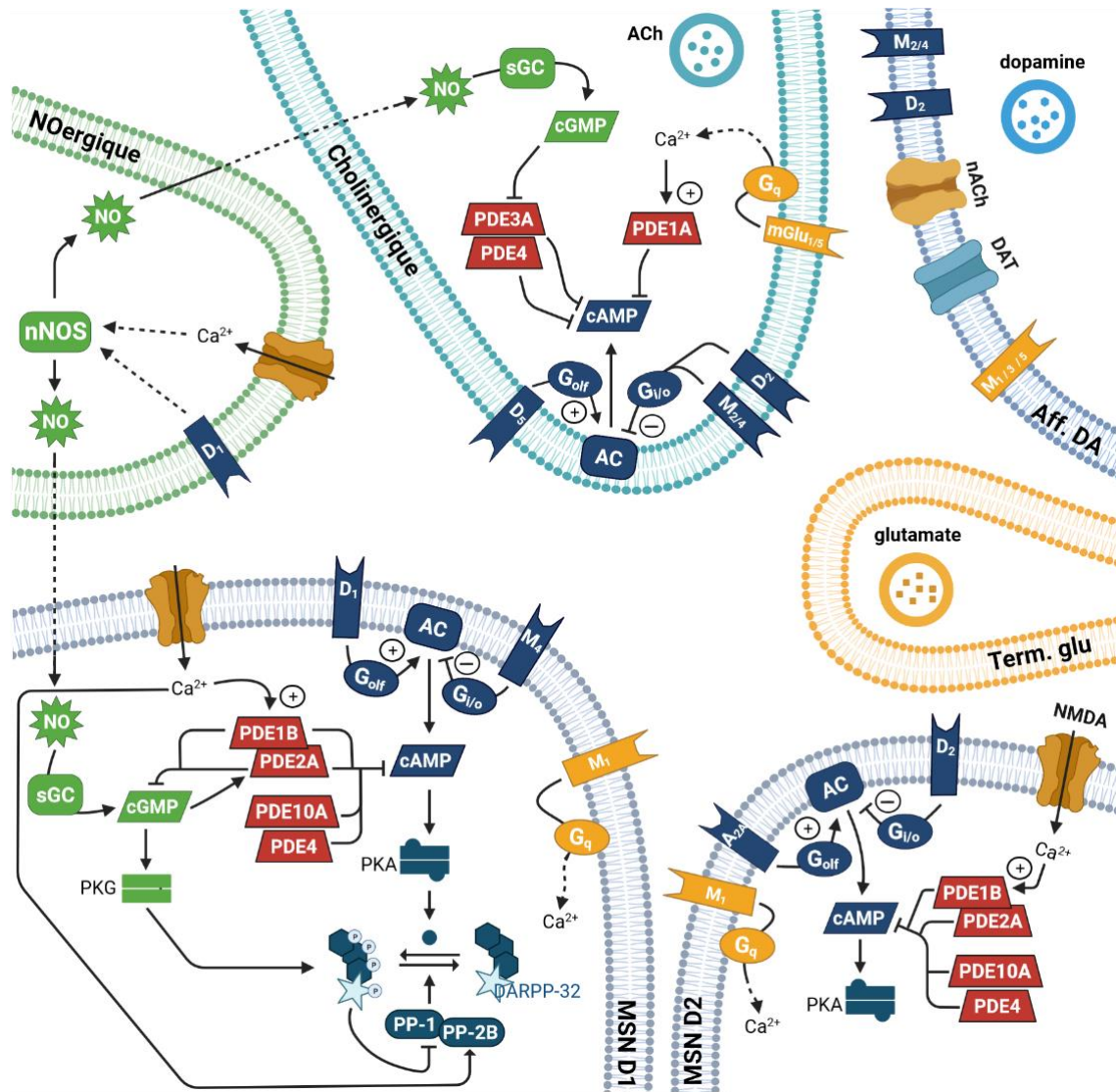


Figure 5 : Voies de signalisation AMPc/PKA, NO/GMPc et calcium dans le striatum. Les afférences dopaminergiques (bleu) et glutamatergiques (jaune) sont représentées dans le coin supérieur droit ; les interneurones NOergiques (vert) et ChIN (turquoise) dans le coin supérieur gauche ; et les MSNs D1 et D2 (gris) dans la moitié inférieure. Les PDE (rouge) sont à l'interface des trois voies de signalisation AMPc/PKA (bleu), NO/GMPc (vert) et calcique (jaune). D_{1/2} : récepteur à la dopamine type 1/2 ; M_{1 à 5} : récepteur muscarinique de type 1 à 5 ; A_{2A} : récepteur à l'adénosine ; NMDA : récepteur au glutamate de type NMDA ; nACh : récepteur nicotinique ; DAT : transporteur à la dopamine ; G_{olf} / G_{ivo} / G_q : protéine G ; sGC : guanylyl cyclase soluble ; AC : adénylyl cyclase ; nNOS : NO synthase neuronal ; cAMP : adénosine monophosphate cyclique ; cGMP : guanosine monophosphate cyclique ; PDE : phosphodiéstérases ; PKA : protéine kinase A ; PKG : protéine kinase dépendante du GMPc ; PP-1/2B : phosphatase 1/2B

Les récepteurs à la dopamine sont couplés à la voie AMPc/PKA (AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; PKA : protéine kinase A) (Girault, 2012) (figure 5) et ont été séparés en deux familles, en fonction de leur action sur cette voie de signalisation : les récepteurs de type D₁ (avec les récepteurs D₁ et D₅) favorisent la production d'AMPc (Tiberi et al., 1991) et les récepteurs de type D₂ (avec les récepteurs D₂, D₃ et D₄)

l'inhibent (Andersen et al., 1990; Niznik and Van Tol, 1992; Sibley and Monsma, 1992; Vallone et al., 2000). Chaque récepteur est codé par un gène et seuls les récepteurs de la famille D₂ présentent des introns et des épissages alternatifs conduisant à des formes courtes ou longues du récepteur (Gingrich and Caron, 1993; Giros et al., 1989). Les récepteurs D₁ sont couplés à la protéine G $\alpha_{s/olf}$. L'activation des récepteurs D₁ mène à l'activation des AC. Les AC catalysent alors la conversion de l'ATP (adénosine triphosphate) en AMPc et pyrophosphate, en présence d'ion magnésium Mg²⁺. Dans les MSNs, l'isoforme majoritairement exprimée évolue au cours de la vie. Effectivement, l'AC1 est majoritairement exprimée dans le striatum du rat jeune, ensuite c'est l'AC5 qui prédomine chez l'adulte (Glatt and Snyder, 1993; Matsuoka et al., 1997). L'activation des récepteurs D₁ conduit à une augmentation des niveaux intracellulaires d'AMPc. A l'inverse, les récepteurs D₂ sont couplés à la protéine G $\alpha_{i/o}$. Le recrutement de cette protéine G induit une régulation négative des AC, et donc une diminution de la production d'AMPc (Enjalbert and Bockaert, 1983; Kebebian and Calne, 1979; Kebebian and Greengard, 1971; Missale et al., 1998).

Le récepteur M₄ et le récepteur A_{2A} sont exprimés préférentiellement dans les MSNs D1 et D2, respectivement (figure 5) (Hersch et al., 1994; Ince et al., 1997; Lillrank et al., 1999; Rosin et al., 1998). Ils sont, respectivement, associés à la protéine G $\alpha_{i/o}$ et G $\alpha_{s/olf}$ et favorisent la dégradation et la production d'AMPc (Nair et al., 2019; Yapo et al., 2017). Ainsi, leur action s'oppose à celle du récepteur D₁ et du récepteur D₂, respectivement.

Parmi ces RCPG, certains peuvent s'associer entre eux et former des complexes hétéro-oligomériques dans les MSNs. Ces hétéromères peuvent se former entre RCPG de même type (par exemple l'hétéromère D₁/D₂ ou D₁/D₃) ou entre RCPG de différents types (par exemple l'hétéromère A_{2A}/D₂). La formation de ces hétéromères modifie leur couplage aux protéines G associées (Misganaw, 2021; Perreault et al., 2014). Par exemple, lorsque le récepteur D₂ s'associe au complexe récepteur A_{2A}/G $\alpha_{s/olf}$, cela conduit à l'activation de la phospholipase C. A l'inverse, lorsque le récepteur A_{2A} s'associe au complexe récepteur D₂/G $\alpha_{i/o}$, cela conduit à une interaction avec la β -arrestin et l'internalisation du complexe (Borroto-Escuela et al., 2011; Ferré et al., 2018; Trifilieff et al., 2011). Ces hétéromères ont principalement été caractérisés dans des cellules en culture (comme les cellules HEK293) (Borroto-Escuela et al., 2011; Guitart et al., 2019, 2014). L'existence de ces hétéromères *in vivo* demeure controversée. Certaines études ont montré l'existence des hétéromères D₁/D₂ dans les MSNs, avec une forte présence dans le striatum ventral (91 % des MSNs) et une plus faible proportion dans le striatum dorsal (24 %) (Lee et al., 2004; Perreault et al., 2010; Rashid et al., 2007b, 2007a). L'activation de l'hétérodimère D₁/D₂ mène d'une part à l'activation de la voie calcique via la protéine G $\alpha_{q/11}$ et la protéine kinase calcium/calmoduline-dépendante (CaMKII) (Hasbi et al.,

2009; Perreault et al., 2016) et d'autre part à l'augmentation de la transmission GABAergique (en augmentant l'expression de l'enzyme de synthèse du GABA) (Perreault et al., 2012). L'utilisation des souris transgéniques BAC exprimant des protéines fluorescentes sous contrôle du promoteur codant pour la récepteur D₁ (*Drd1a*) ou D₂ (*Drd2*) montre une colocalisation des récepteurs D₁ et D₂ dans de plus faibles proportions (17 % dans le striatum ventral « *shell* » et 5-6 % dans le striatum dorsal et striatum ventral « *core* ») (Bertran-Gonzalez et al., 2008). Récemment, une approche génétique a permis de cibler spécifiquement les neurones co-exprimant les récepteurs D₁ et A_{2A} et montre une colocalisation des récepteurs D₁ et D₂ dans 6 à 7 % des MSNs du striatum (ventral et dorsal) (Bonnavion et al., 2022). Cette population de MSNs projette uniquement dans le globus pallidus externe (Bonnavion et al., 2022), en cohérence avec une étude montrant, à l'aide d'un marquage rétrograde, que les neurones projetant dans la substance noire réticulée expriment uniquement le récepteur D₁ (Matamalas et al., 2009). L'optoactivation de cette sous-population de MSNs montre un rôle dans la locomotion qui dépend de l'activation des MSNs D1 ou D2. Effectivement, lors d'une co-activation avec les MSNs D1 ou MSN D2, ils présentent, respectivement, un effet pro- ou anti-kinétique (Bonnavion et al., 2022). Si plusieurs études montrent la présence d'une colocalisation des récepteurs D₁ et D₂ dans une faible proportion des MSNs, cela ne démontre pas la formation d'hétéromères. De plus, leur rôle fonctionnel reste à déterminer. Dans le striatum dorsal, une stimulation pharmacologique spécifique aux récepteurs D₁ ou D₂ conduit à une ségrégation totale entre les MSNs striatonigraux et striatopallidaux (Bertran-Gonzalez et al., 2008). L'étude de la dynamique de la voie AMPc/PKA par imagerie de biosenseurs révèle également une ségrégation totale dans le striatum dorsal lors d'une stimulation pharmacologique des récepteurs D₁ ou D₂ (Mariani et al., 2019; Polito et al., 2015; Yapo et al., 2017).

1.2.3.1.2 – Les effecteurs de l'AMPc

L'AMPc agit sur plusieurs cibles : la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) (Taskén and Aandahl, 2004; Taylor et al., 1990), les canaux membranaires HCN produisant le courant de type I_h (HCN, *hyperpolarisation-activated cyclic-nucleotid modulated cation non-selective channel*) (Kaupp and Seifert, 2001), les canaux activés par les nucléotides cycliques (CNG, *cyclic nucleotide-gated ion channel*) (Craven and Zagotta, 2006) et les protéines Epac liant les nucléotides cycliques (protéine d'échange activée par l'AMPc, *exchange protein activated by cAMP*) (Gloerich and Bos, 2010).

Dans le striatum, les canaux HCN sont particulièrement exprimés par les ChIN (*cf.* 0 Les interneurones cholinergiques) (Bennett et al., 2000; Kawaguchi, 1992; Notomi and Shigemoto, 2004). Concernant les CNG, aucune expression n'a été démontrée dans le striatum jusqu'à aujourd'hui. Quant aux protéines Epac, deux isoformes existent,

Epac 1 et Epac 2, et sont exprimées dans le striatum (Kawasaki et al., 1998). Ces protéines comportent une région catalytique en C-terminal et une région régulatrice en N-terminal. La région catalytique contient un facteur d'échange de la guanine qui permet de catalyser l'échange du GDP en GTP sur les petites protéines G effectrices d'Epac, dont Rap (*Ras related protein*). Au niveau de la région régulatrice se trouve le domaine de liaison à l'AMPc (domaine CNB, *cyclic nucleotide-binding domain*). La liaison de l'AMPc au domaine CNB induit un changement de conformation de la protéine Epac, qui rend alors accessible le site catalytique en faveur de l'activation des protéines Rap. Ce mécanisme d'activation d'Epac par liaison de l'AMPc a été utilisé dans la conception des biosenseurs FRET (transfert d'énergie entre molécules fluorescentes) à l'AMPc (Nikolaev et al., 2004). Dans les neurones, les protéines Epac jouent un rôle dans la libération des neurotransmetteurs et la plasticité synaptique, la différenciation neuronale ou encore la croissance axonale (Gloerich and Bos, 2010; Lee, 2021).

Au sein du striatum, une des cibles de l'AMPc est la PKA. Son activité consiste à phosphoryler les acides aminés sérine et thréonine présents dans des sites consensus des protéines cibles. Ainsi la PKA appartient à la famille des kinases sérine/thréonine. La PKA, dans son état inactif, est constituée de deux sous-unités catalytiques (notées C) et deux sous-unités régulatrices (notées R) qui empêchent l'action catalytique des sous-unités C. Trois isoformes des sous-unités catalytiques (C α , C β et C γ) existent. Dans le striatum sont principalement retrouvées les sous-unités C α et C β . Concernant les sous-unités régulatrices, quatre isoformes (R1 α , R1 β , R2 α et R2 β) existent. Les sous-unités régulatrices ont un site d'ancrage aux protéines d'ancrage de la protéine kinase A (AKAP, *A kinase anchoring protein*), leur permettant d'être ancrées à des compartiments subcellulaires spécifiques, proches de leurs substrats cellulaires (e.g. sites postsynaptiques ou régions périnucléaires) (Girault, 2012; Taylor et al., 2008). Chaque sous-unité régulatrice a la capacité de lier deux molécules d'AMPc. Lorsque quatre molécules d'AMPc se lient aux sous-unités régulatrices, un changement de conformation de ces sous-unités se produit et conduit à la dissociation des sous-unités catalytiques. Les sous-unités R2 présentent une affinité élevée pour les AKAP, de l'ordre du nM, tandis que les sous-unités R1 ont une affinité moins importante (Herberg et al., 2000). Dans le striatum, R2 β constitue la sous-unité régulatrice principale (Brandon et al., 1998). Par liaison à l'AKAP5 et la protéine-2 associée aux microtubules (MAP2), R2 β se trouve majoritairement dans les dendrites des MSNs (Weisenhaus et al., 2010). La sous-unité R1 α est également exprimée dans les MSNs. Elle présente une affinité plus faible pour l'AKAP et est localisée préférentiellement dans le corps cellulaire. L'inactivation de la PKA de type I (contenant R1 α) spécifiquement dans les MSNs diminue l'expression du gène immédiat-précoce c-fos et réduit significativement l'activité locomotrice de ces souris (Yang et al., 2014). Bien que son inactivation réduise l'activité

totale de la PKA de seulement 10 %, la PKA de type I joue un rôle majeur dans la locomotion.

Une fois libérées des sous unités régulatrices, les sous unités catalytiques phosphorylent diverses cibles membranaires (e.g. courants sAHP (*slow afterhyperpolarization*), récepteurs au glutamate de type NMDA et AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid)), cytoplasmiques (e.g. DARPP-32 (*32-kDa DA and cAMP-regulated phosphoprotein*)) et nucléaires (e.g. CREB, *cAMP response element-binding protein*). La phosphorylation des cibles de la PKA joue un rôle essentiel dans l'excitabilité des neurones, la régénération axonale ou encore la formation du cône de croissance (Cheng et al., 2011; Murray et al., 2009).

Les MSNs expriment fortement et spécifiquement la protéine DARPP-32, cible de la PKA (Walaas et al., 1983). L'état phosphorylé de la DARPP-32 dépend de l'activation des récepteurs à la dopamine. Effectivement, les agonistes des récepteurs D₁ et D₂ conduisent, respectivement, à une augmentation et diminution des niveaux de phosphorylation de la DARPP-32 (Calabresi et al., 2000; Girault and Greengard, 2004; Nishi et al., 1997). Plusieurs sites de phosphorylation de la PKA se trouvent sur la DARPP-32 (figure 6) et régulent son activité et sa localisation. Un des sites de phosphorylation correspond à la Thréonine 34 (Thr34) et agit principalement comme un signal d'amplification de la PKA. Effectivement, une fois phosphorylée sur la Thr34, la DARPP-32 devient un puissant inhibiteur de la phosphatase 1 (PP1) (figure 6), avec une concentration inhibitrice médiane de l'ordre du nM ($IC_{50} = 10^{-9}$ M) (Hemmings et al., 1984), inhibant ainsi la déphosphorylation des cibles de la PKA. A l'inverse, la phosphorylation de la thréonine 75 (Thr75) par la protéine kinase cycline-dépendante (CDK5 *cyclin-dependent protein kinase 5*) fait de la DARPP-32 un puissant inhibiteur de la PKA (figure 6) (Bibb et al., 1999). Un autre site de phosphorylation (Serine 97) détermine la localisation de la DARPP-32. Effectivement, la phosphorylation de ce site active le signal d'export nucléaire et favorise une localisation cytoplasmique. A l'inverse, la déphosphorylation de la Ser97 par la PP2A favorise une localisation nucléaire (Stipanovich et al., 2008). Les conséquences de ces mécanismes seront détaillées dans la partie *Transduction du signal dopaminergique dans les MSNs*. L'utilisation des souris BAC a permis d'identifier différenciellement la DARPP-32 exprimée dans les MSNs D1 de celle exprimée dans les MSNs D2 et ainsi de montrer que les phosphorylations de la DARPP-32 sur la Thr34 et sur la Thr75 ont lieu par effet miroir dans les MSNs D1 et les MSNs D2. En effet, sur tranches de cerveau, l'application d'un agoniste des récepteurs D₁ induit, respectivement, l'augmentation et la diminution des niveaux de phosphorylation sur la Thr34 et de la Thr75. L'application d'un agoniste des récepteurs D₂ induit l'effet inverse (Bateup et al., 2008). Un modèle de souris KO pour la DARPP-32

a été développé. Bien que ce modèle murin soit viable et fertile, les souris présentent une réponse aux psychotropes diminuée ainsi qu'une perte de dépression et potentiation à long terme par rapport aux souris *wild-type* (WT) (Calabresi et al., 2000; Fienberg et al., 1998; Hiroi et al., 1999; Svenningsson et al., 2003). Dans ce modèle, la stimulation des récepteurs D₁ induit une réponse électrophysiologique plus faible que chez le modèle WT (Fienberg et al., 1998), suggérant une réduction voire une absence d'amplification du signal de la PKA. L'état de phosphorylation de la DARPP-32 (par exemple Thr34 ou Thr75) détermine alors son effet sur la voie AMPc/PKA et d'autres effecteurs.

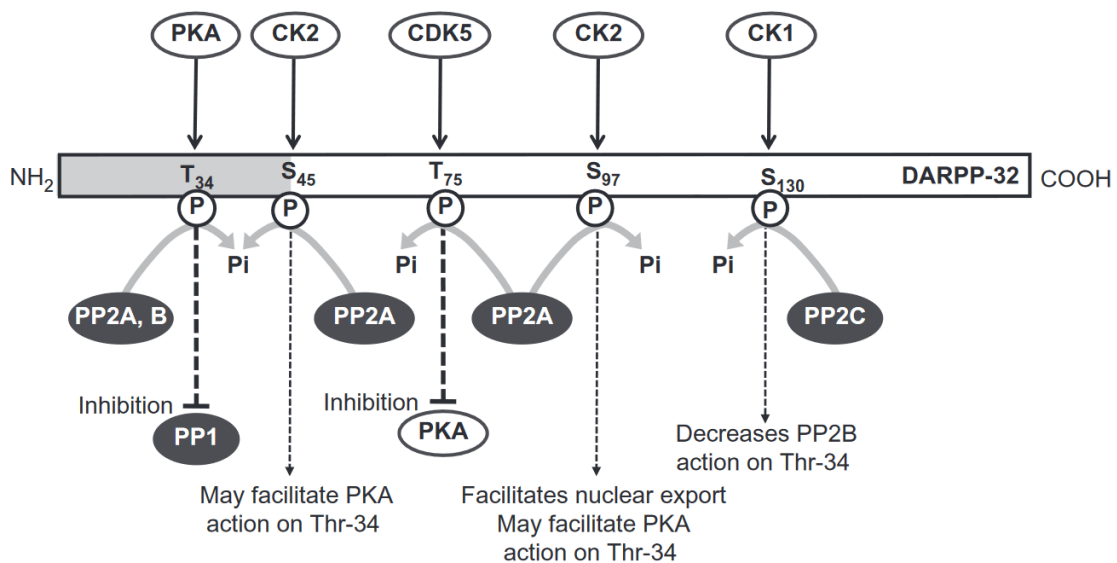


Figure 6 : sites de phosphorylation de la DARPP-32 (figure simplifiée, reprise de Girault, 2012). Les kinases (PKA, protéine kinase A ; CK1/2, caséine kinase 1/2 ; CKD5, kinase dépendante de la cycline) et leurs sites de phosphorylation sur la DARPP-32 sont indiqués en haut du schéma. L'effet de chaque phosphorylation est indiqué en bas du schéma. Les actions de déphosphorylation par PP2A ou PP2C (protéine phosphatase 2A/2C) sont indiquées spécifiquement pour chaque site. Le numéro des résidus correspond à ceux retrouvés chez la souris (Girault, 2012).

1.2.3.2 – Phosphatases et phosphodiesterases : contrôle négatif de la voie AMPc/PKA

Une fois activée, toute voie de signalisation doit être régulée négativement afin de mettre fin au signal. Dans la voie AMPc/PKA, ce contrôle négatif est effectué par deux types d'enzymes qui agissent à deux niveaux de la cascade : les phosphodiesterases (PDE) hydrolysent l'AMPc en AMP (adénosine monophosphate), et les phosphatases déphosphorylent les cibles de la PKA.

1.2.3.2.1 – Les phosphatases

La phosphorylation des protéines est un moyen relativement rapide pour convertir un signal extracellulaire en un signal intracellulaire et engendrer une multitude de processus (e.g. l'internalisation de récepteurs membranaires, l'inactivation de canaux, l'activation de protéines, l'expression de gènes...). Pour que ce signal soit efficace, il doit perdurer pendant un temps précis. Ainsi la suppression du groupement phosphate des protéines est aussi importante que la phosphorylation elle-même. Les phosphatases, en déphosphorylant les protéines phosphorylées par la PKA, délimitent le temps d'action de la voie AMPc/PKA. A l'instar des kinases de la famille Sérine/thréonine, les phosphatases qui déphosphorylent leurs cibles appartiennent à la famille des phosphatases Sérine/thréonine. Toutefois, sachant que la famille des kinases sérine/thréonine est composée d'environ 400 protéines, il est remarquable de constater que la famille de phosphatases ne contient qu'une quarantaine de protéines. Ces phosphatases n'en sont pourtant pas moins diverses, et cette diversité est réalisée par la formation de complexes protéiques. Dans cette famille de phosphatases, un sous type de famille est nommé phosphoprotéine phosphatases (PPP) et contient 7 sous-groupes (PP1 à PP7). 90 % de ces PPP sont représentées par les phosphatases PP1 et PP2A (Bollen et al., 2010; Moorhead et al., 2007; Virshup and Shenolikar, 2009). Dans les MSNs, les phosphatases principalement exprimées sont PP1, PP2A et PP2B (aussi appelé PP3 ou calcineurine)

La phosphatase PP1 est codée par trois gènes, codant pour 3 sous-unités catalytiques PP1 α , PP1 β/δ , PP1 γ (avec l'isoforme PP1 γ_1 et PP1 γ_2) (Bollen et al., 2010; Peti et al., 2013). PP1 peut se lier à plus de 200 protéines et ainsi constituer jusqu'à plus de 650 complexes protéiques différents (Bollen et al., 2010). La nature de ces complexes détermine leur localisation subcellulaire ainsi que leur spécificité de substrat. PP1 est la phosphatase la plus exprimée dans les MSNs. Elle déphosphoryle de nombreuses cibles de la PKA. Son activité catalytique est notamment bloquée par la DARPP-32 (Hemmings et al., 1984). Ce mécanisme d'inhibition par la DARPP-32 renforce l'activation de la voie AMPc/PKA (Walaas and Greengard, 1984), comme décrit précédemment (figure 6).

La PP2A est un hétérotrimère composé d'une sous-unité d'échafaudage notée A, une sous-unité régulatrice variable notée B et une sous-unité catalytique notée C. Il existe plusieurs sous-types de chaque unité, chaque sous-type étant codé par un gène. Ainsi il existe une grande diversité de complexes hétérotrimériques PP2A, chacun ayant, à l'instar de PP1, une localisation et spécificité propre (Slupe et al., 2011). PP2A contient un site de phosphorylation par la PKA (Usui et al., 1998). Une fois phosphorylée, PP2A change de conformation et déphosphoryle, entre autre, le résidu Thr75 de la DARPP-32

(figure 6) (Ahn et al., 2007; Nishi et al., 1999). Ce mécanisme lève l'inhibition de la PKA par la DARPP-32.

La PP2B (aussi nommé PP3 ou calcineurine) est une phosphatase dont l'activité dépend du calcium et de la calmoduline. La PP2B est un hétérodimère constitué d'une sous-unité catalytique A et d'une sous-unité régulatrice B. Les sous-unités A sont codées par trois gènes tandis que les sous-unités B sont codées par deux gènes. Dans le striatum, l'activité de la PP2B est stimulée par l'entrée de calcium suite à l'activation des récepteurs au glutamate AMPA et NMDA. Or, une des cibles majeures de la PP2B est la Thr34 de la DARPP-32 (figure 6). Ainsi l'activation des récepteurs AMPA et NMDA s'oppose à l'activation de la voie AMPc/PKA (Nishi et al., 2002, 1999).

1.2.4 – Les phosphodiésterases

Les PDE, par leur activité d'hydrolyse de l'AMPc, sont essentielles pour déterminer le profil temporel de la voie AMPc/PKA. Elles sont d'importants régulateurs des voies de signalisation cellulaire et jouent un rôle dans de nombreuses pathologies.

Chez les mammifères, les PDE sont codées par 21 gènes et se divisent en 11 familles (PDE1 à PDE11). Chaque gène codant pour une PDE est à l'origine de plusieurs variants d'épissage alternatif qui déterminent les propriétés de localisation subcellulaire, d'activité enzymatique ou encore de régulation allostérique. Toutes les PDE sont composées d'un domaine régulateur N-terminal, d'un domaine catalytique puis d'un domaine C-terminal (Bolger, 1994; Thompson, 1991). Certaines PDE peuvent également former des homodimères. Les PDE peuvent se diviser en trois groupes : les PDE hydrolysant spécifiquement l'AMPc (PDE4, PDE7, PDE8), les PDE hydrolysant spécifiquement le GMPc (guanosine monophosphate cyclique) (PDE5, PDE6, PDE9) et les PDE hydrolysant l'AMPc et le GMPc (PDE1, PDE2, PDE3, PDE10, PDE11). Parmi les PDE hydrolysant les deux seconds messagers, elles présentent toutes une affinité plus élevée pour l'un des deux. Cette affinité serait dépendante de la nature des acides aminés présents autour de la glutamine, hautement conservée, qui établit deux liaisons hydrogènes avec le second messager. Toutefois, les études de cristallographie n'ont pas encore élucidé précisément ce mécanisme (Ke and Wang, 2007; Lau and Cheng, 2012; Zhang et al., 2004).

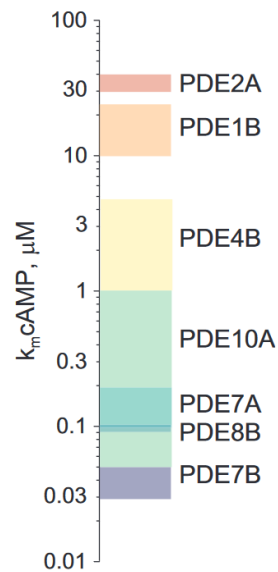


Figure 7 : Affinité des PDE exprimées dans le striatum pour l'AMPC (figure reprise de Neves-Zaph, 2017). L'affinité de chaque PDE est représentée par la constante de Michaelis-Menten (K_m). Chaque boîte colorée représente l'étendue des valeurs de K_m retrouvés dans la littérature pour chaque PDE (Neves-Zaph, 2017).

De nombreux inhibiteurs pharmacologiques ont été développés. La structure moléculaire de ces enzymes permet effectivement la conception de ligands présentant une haute affinité. Des inhibiteurs spécifiques à chaque type de PDE ont été développés. L'inhibiteur de la PDE5 est l'un des inhibiteurs le plus connu, et le seul véritablement utilisé à grande échelle en clinique. Il est utilisé pour le traitement des dysfonctionnements érectiles et de l'hypertension artérielle pulmonaire (sildenafil, tadalafil, vardenafil) (Gomez and Breitenbucher, 2013). Le succès de ce traitement a ainsi motivé le développement d'autres inhibiteurs de PDE. Aujourd'hui, plusieurs inhibiteurs spécifiques à chaque PDE sont disponibles. Et plusieurs essais cliniques ciblant les PDE sont en cours concernant des pathologies du système nerveux central, principalement les déficits cognitifs (Sanders and Rajagopal, 2020).

Toutes les PDE sont exprimées dans le cerveau. Dans les MSNs, seuls les messagers des Pde1b, Pde2a, Pde7b et Pde10a sont fortement exprimés, les Pde4b et Pde8b l'étant plus marginalement (Kelly et al., 2014; Lakics et al., 2010). Toutefois, aucune étude n'a pu démontrer la présence des protéines PDE7B et PDE8B. Ainsi, je détaillerai dans la suite de cette partie uniquement la PDE1B, PDE2A, PDE4B et PDE10A. La PDE3, exprimée par les interneurons cholinergiques striataux, est détaillée dans la partie 1.3.4 – les PDE dans les CHIN ?.

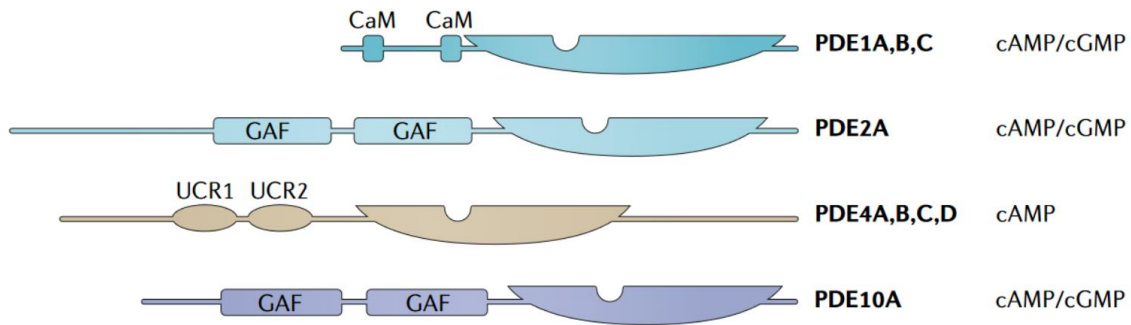


Figure 8 : Structure schématique des PDE1, PDE2, PDE4 et PDE10 (figure reprise et simplifiée de Baillie et al. 2019). La partie N-terminal (gauche) contient les domaines régulateurs spécifiques à chaque PDE, tandis que la partie C-terminal (droite) contient les domaines catalytiques (représentés par les demi-ellipses). La taille relative des PDE ainsi que la distance relative entre chaque domaine est basé d'une estimation à partir de la base de données Pfam/Uniprot. La plus longue isoforme est représentée pour chaque PDE. PDE : phosphodiesterase ; GAF : cGMP : binding PDE *Anabaena* adenylyl cyclases and *Escherichia coli* FhlA ; CaM : Calmoduline ; UCR1/2 : upstream conserved region 1/2 (Baillie et al., 2019)

1.2.4.1 – Phosphodiesterase 1

La PDE1 est la seule PDE dont l'activité dépend du calcium régulé par la calmoduline. C'est la raison pour laquelle elle fut d'abord nommée PDE stimulée par la calmoduline (*calmodulin-stimulated PDE*). Ainsi la PDE1 se trouve à l'interface entre les voies de signalisation de l'AMPC, du GMPc et du calcium, respectivement stimulées dans les MSNs par la dopamine, la production de NO et l'activité électrique combinée aux récepteurs NMDA au glutamate. Trois gènes codent pour la PDE1 (PDE1A, B et C) et conduisent à plus de 10 isoformes (Bolger, 2006). La PDE1B est fortement exprimée dans le striatum (Repaske et al., 1993). Dans les MSNs, elle est cytosolique et hydrolyse préférentiellement le GMPc ($K_m = 5 \mu\text{M}$ pour le GMPc, $K_m = 33 \mu\text{M}$ pour l'AMPC) (figure 7) (Keravis and Lugnier, 2012; Poppe et al., 2008). Son domaine régulateur contient deux sites de liaison au complexe calcium/calmoduline (figure 8). Le changement de conformation induit par la liaison du complexe calcium/calmoduline augmente la vitesse d'hydrolyse des nucléotides cycliques sans impacter l'affinité pour chacun d'eux. La phosphorylation de la PDE1B par la CaMKII diminue l'affinité de la PDE1B pour le complexe calcium/calmoduline et ainsi diminue sa vitesse de dégradation (Keravis and Lugnier, 2012). Le rôle fonctionnel de la PDE1B dans la régulation des niveaux d'AMPC et de GMPc a été étudié à l'aide de l'imagerie de biosenseur FRET Epac-S^{H150} et cyGNAL, respectivement (Betolngar et al., 2019). L'activation des récepteurs NMDA induit une entrée de calcium qui active la PDE1B. Cette activation est nécessaire à la dégradation de l'AMPC et du GMPc par la PDE1B (Betolngar et al., 2019). De plus, l'activation concomitante des récepteurs à la dopamine et NMDA conduit à une diminution de la réponse transitoire à la dopamine dans les MSNs D1 et à une réduction de la plasticité

synaptique de type potentiation à long terme médiée par l'activité de la PDE1 (LTP, *long term potentiation*) (Betolngar et al., 2019). Par ailleurs, ce mécanisme ne semble pas être spécifique au striatum. Effectivement, l'inhibition de la PDE1 (par l'inhibiteur ITI-214) conduit à une amélioration des performances cognitives chez le rat (Snyder et al., 2016) et de la mémoire de travail via l'augmentation de la transmission synaptique dans le cortex préfrontal (Pekcec et al., 2018).

1.2.4.2 – Phosphodiesterase 2

La PDE2A est exprimée dans l'ensemble du striatum et est également retrouvée dans d'autres régions cérébrales telles que l'hippocampe, le cortex, le cervelet (Repaske et al., 1993; Sonnenburg et al., 1991; Stephenson et al., 2012). En dehors du cerveau, elle est principalement exprimée dans le cœur et le rein (Sonnenburg et al., 1991). La PDE2A est codée par un seul gène, avec trois variants d'épissage : PDE2A1 (Sonnenburg et al., 1991), PDE2A2 (Yang et al., 1994) et PDE2A3 (Rosman et al., 1997). Ces variants diffèrent par leur séquence N-terminale sur les résidus 25 à 46 qui déterminent leur localisation subcellulaire : la PDE2A1 est soluble et cytoplasmique tandis que les PDE2A2 et PDE2A3 sont membranaires (Murashima et al., 1990; Whalin et al., 1991; Yang et al., 1994). L'ancrage de la PDE2A2 se fait par un domaine hydrophobe (Yang et al., 1994) tandis que la PDE2A3 est associée à la membrane synaptique par la myristoylation d'une glycine en N-terminal (Russwurm et al., 2009). La PDE2A2 a également été retrouvée dans la matrice mitochondriale où elle est responsable de la dégradation de l'AMPc (Acin-Perez et al., 2011). Cet adressage mitochondrial est possible via 17 résidus situés en N-terminal de la PDE2A2 (Acin-Perez et al., 2011). Ces isoformes possèdent toutefois les mêmes propriétés enzymatiques et aucune spécificité concernant leur expression tissulaire n'a été mise en évidence (Beavo et al., 2007). La PDE2A a une meilleure affinité pour le GMPc ($K_m = 10 \mu\text{M}$) que pour l'AMPc ($K_m = 30 \mu\text{M}$) (figure 7), avec toutefois une vitesse de dégradation similaire ($V_{\max} = 120 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) (Martins et al., 1982; Neves-Zaph, 2017; Thomas et al., 1990). La PDE2A possède sur son site régulateur N-terminal deux domaines GAF hautement conservés (*cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases and FhlA*) nommés GAF-A et GAF-B (figure 8) (Martinez et al., 2002). Le domaine GAF-B présente un site de liaison aux nucléotides cycliques, avec une haute affinité pour le GMPc ($K_D < 10 \text{nM}$), soit 10 à 30 fois supérieure de celle pour l'AMPc (Martinez et al., 2002; Pandit et al., 2009; Wu et al., 2004). Lorsque la PDE2A se trouve sous forme d'un homodimère, l'étude structurale par cristallographie montrent que le domaine catalytique d'un monomère repose sous le domaine GAF-B de l'autre monomère, en défaveur de l'accessibilité du domaine catalytique au substrat (Pandit et al., 2009). La liaison du GMPc sur les domaines GAF-B conduit à un changement de conformation de l'homodimère : l'hélice LH2 reliant le domaine GAF-B au domaine catalytique subit une

réorganisation relative en faveur d'une meilleure accessibilité du domaine catalytique pour le substrat (figure 9). La liaison du GMPc (dans des concentrations physiologiques de GMPc, soit entre 1 et 5 μ M) sur le domaine régulateur augmente jusqu'à 5 à 10 fois l'activité de la PDE2A (Martinez et al., 2002; Martins et al., 1982). Contrairement à la PDE1 dont l'activité catalytique dépend du calcium, la PDE2A conserve une activité catalytique en absence de liaison du GMPc. Le GMPc agit donc comme un stimulateur de l'activité de la PDE2A. La structure de la PDE2A alterne entre une configuration « ouverte » et une configuration « fermée ». La liaison du GMPc au domaine régulateur GAF-B stabilise la configuration « ouverte » (Pandit et al., 2009), augmentant ainsi l'activité enzymatique de la PDE2A. Ainsi, en fonction du niveau de GMPc cellulaire, la PDE2A aura un effet plus ou moins important sur la régulation de l'AMPc et du GMPc. Il est important de noter qu'à forte concentration d'AMPc, il n'est probablement pas à exclure que l'AMPc puisse se lier au domaine GAF-B et stimuler l'activité de la PDE2A. Dans le striatum, les niveaux de GMPc sont notamment régulés par la libération de NO par les interneurons NOergiques, qui diffuse au travers des membranes, active les guanylyl cyclases (GC) solubles en faveur d'une augmentation des niveaux de GMPc. Sur tranche de cerveau, une absence d'activité basale de la GC a été montrée à l'aide du biosenseur FRET pour le GMPc (Polito et al., 2013). Ces résultats s'opposent à ceux obtenus lors d'enregistrements intracellulaires, où une production tonique de GMPc a été observée (Paolo Calabresi et al., 1999). Cela suggère que l'activité basale de la GC varie en fonction de l'activité des interneurons NOergiques dépendante de l'activité cortico-striatale. L'effet du GMPc sur la PDE2A a été montré *ex vivo* dans les MSNs D1 et D2 par imagerie de biosenseurs : lors d'une stimulation des AC conduisant à une augmentation des niveaux d'AMPc, la stimulation de la PDE2A par le GMPc conduit à une diminution significative des niveaux d'AMPc (Polito et al., 2013). Ainsi, l'activation de la voie NO/GMPc conduit à un rétrocontrôle négatif sur la voie NO/GMPc elle-même ainsi qu'à une régulation négative de la voie AMPc. Cette caractéristique place la PDE2A au carrefour des deux voies de signalisation : l'AMPc/PKA et le NO/GMPc. De nombreux inhibiteurs pharmacologiques spécifiques de la PDE2A ont été développés, les plus utilisés étant le EHNA, avec une sélectivité partielle, (Podzuweit et al., 1995) et le BAY 60-7550, hautement sélectif (Boess et al., 2004). La PDE2A étant fortement exprimée dans l'hippocampe et le cortex, son inhibition a montré des intérêts thérapeutiques dans certaines neuropathologies (e.g. spectre autistique, syndrome du X fragile, maladie d'Alzheimer) (Maurin et al., 2018; Schiavi et al., 2022). Plusieurs études ont étudié l'effet de l'inhibition de la PDE2A sur la mémoire et ont montré une amélioration de la mémoire de reconnaissance sociale et d'objets ainsi que des fonctions exécutives chez les modèles murins sains, âgés ou avec des déficits cognitifs (Boess et al., 2004; Domek-Łopacińska and Strosznajder, 2008; Rodefer et al., 2012;

Rutten et al., 2007). Ces études ont toutes été réalisées avec l'inhibiteur sélectif BAY 60-7550. Toutefois, Reneerkens et ses collaborateurs ont montré que le BAY 60-7550 pénétrait très peu le cerveau : 30 minutes après l'injection, la concentration de l'inhibiteur de la PDE2A dans le tissu cérébral est 20 fois inférieure à la concentration plasmatique (Reneerkens et al., 2013). Deux nouveaux inhibiteurs de la PDE2A, le TAK-915 (Mikami et al., 2017b, 2017a; Nakashima et al., 2019) et le LuAF64280 (Redrobe et al., 2014), ont été récemment développés et montrent une meilleure accessibilité cérébrale. Le TAK-915 est notamment en phase clinique pour cibler les altérations cognitives dans la schizophrénie (Baillie et al., 2019). Sachant que l'inhibition de la PDE2A conduit à une augmentation de la contractilité des cardiomyocytes (Maurice, 2005; Vandecasteele et al., 2001; Verde et al., 1999), l'effet du BAY 60-7550 sur les fonctions cognitives pourrait également être causé par une action périphérique. Par ailleurs, l'expression de la PDE2A est augmentée dans l'insuffisance cardiaque (Mehel et al., 2013), ce qui semble être un mécanisme de protection contre l'arythmie ventriculaire (Vettel et al., 2017).

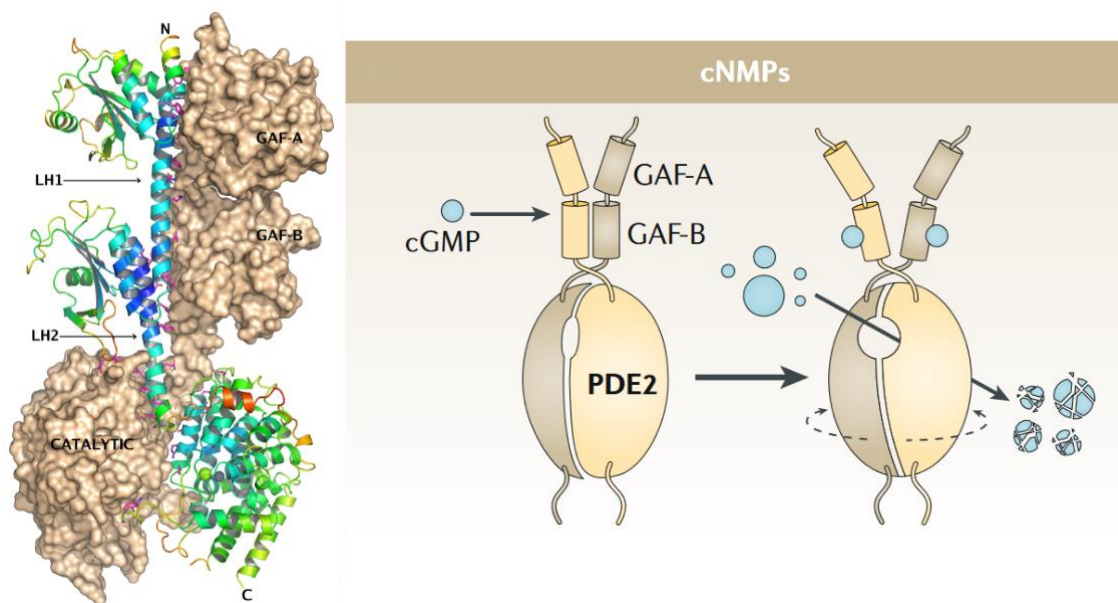


Figure 9 : Structure et régulation de la PDE2A (figures reprises de Pandit et al. 2009 et Baillie et al. 2019). Gauche : Structure de la PDE2A (acide aminés 215 à 900) dimérique. Une molécule est représentée uniquement par sa surface (de couleur beige). L'autre molécule est représentée sous forme de « rubans » colorés. Sur chaque molécule se trouve les sites régulateurs GAF-A (en haut de la structure) et GAF-B (au milieu) puis le site catalytique (en bas). LH1 (linker helix 1) représente l'hélice reliant la partie C-terminal de l'hélice du domaine GAF-A à la partie N-terminale de l'hélice du domaine GAF-B. LH2 représente l'hélice reliant la partie C-terminale de l'hélice du domaine GAF-B au domaine catalytique. C'est par cette hélice LH2 que le domaine catalytique d'une molécule repose sous le domaine GAF-B de l'autre molécule. La liaison du GMPc aux domaines régulateurs conduit à un changement de conformation, notamment à une réorganisation relative de l'hélice LH2, en faveur d'une meilleure accessibilité du domaine

catalytique pour le substrat. Droite : mécanisme d'activation de la PDE2A. La liaison du GMPc sur les domaines GAF-B régulateurs de la PDE2A dimérique induit une rotation externe des domaines catalytiques conduisant à une augmentation de l'accessibilité au substrat (AMPc ou GMPc). PDE2A : phosphodiesterase 2A ; GAF : cGMP : binding PDEs Anabaena adenyl cyclases and Escherichia coli FhlA (Baillie et al., 2019; Pandit et al., 2009)

1.2.4.3 – Phosphodiesterase 4

La PDE4 est codée par 4 gènes (PDE4A à D) et les épissages alternatifs mènent à 25 isoformes chez l'humain (Bolger, 2006; Paes et al., 2021a). La PDE4 est la seule PDE à contenir, pour la plupart des variants, un ou deux domaine(s) hautement conservé(s) nommés *upstream conserved region* (UCR1 et UCR2) (figure 8) qui interviennent dans la dimérisation de la PDE4 (Bolger et al., 1993). Les formes longues de PDE4 comportent les domaines UCR1 et UCR2, les formes courtes uniquement le domaine UCR2 et les formes super-courtes une forme tronquée du domaine UCR2. L'interaction d'UCR1 avec UCR2 tend à réduire l'activité d'hydrolyse de la PDE4. Un site de phosphorylation de la PKA se trouve notamment sur le domaine UCR1. La phosphorylation d'UCR1 par la PKA déstabilise l'interaction des deux domaines et conduit à la stimulation de l'activité de la PDE4 (Beard et al., 2000; Lim et al., 1999). Un deuxième site de régulation se trouve sur le domaine C-terminal de toutes les PDE4, sauf la PDE4A. La phosphorylation de ce site par la protéine ERK (*extracellular signal-regulated kinases*) induit l'activation des formes courtes de PDE4 et l'inhibition des formes longues de PDE4 (Baillie et al., 2000). Ainsi, l'inhibition des formes longues de PDE4 par ERK conduit, *in fine*, via la voie AMPc/PKA, à l'activation de ces isoformes longues (Houslay and Adams, 2003). L'action d'ERK et de PKA sur la PDE4 induit donc un rétrocontrôle négatif de l'activation de la voie AMPc/PKA. Dans le cerveau, la PDE4 intervient notamment dans la dégradation de l'AMPc mitochondrial (Acin-Perez et al., 2011). Dans les MSNs, la PDE4B est majoritairement exprimée et présente une affinité modérée pour l'AMPc ($K_m = 5,5 \mu M$) (figure 7) (Cherry and Davis, 1999; Poppe et al., 2008). La PDE4B est plus fortement exprimée dans les MSNs D2 que les MSNs D1 (Nishi et al., 2008). D'ailleurs, son inhibition renforce l'action d'un agoniste A_{2A} sur la phosphorylation de la Thr34 de la DARPP-32. Ce n'est pas le cas lors de la stimulation des récepteurs D_1 (Nishi et al., 2008).

1.2.4.4 – Phosphodiesterase 10

La PDE10A est encodée par un seul gène menant à 18 variants d'épissage alternatif (Strick et al., 2006), qui diffèrent principalement par leur séquence N-terminale leur conférant des localisations subcellulaires particulières (Charych and Brandon, 2014). La PDE10A contient, comme la PDE2A, un domaine GAF-A et un domaine GAF-B (figure 8) (Gross-Langenhoff et al., 2006; Handa et al., 2008). Tandis que le domaine GAF-B des autres PDE (PDE 2, 5, 6 et 11) lie le GMPc, le domaine GAF-B de la PDE10A est le seul à

lier l'AMPc (Gross-Langenhoff et al., 2006; Zoraghi et al., 2004). L'action de l'AMPc sur le domaine GAF-B reste toutefois ambiguë : certaines études ne montrent aucun effet de l'AMPc sur l'activité de la PDE10A (Matthiesen and Nielsen, 2009), tandis que d'autres montrent que l'AMPc augmente l'activité de la PDE10A (Jäger et al., 2012; Ooms et al., 2016). La PDE10A peut être également phosphorylée par la PKA sur la Thréonine 16 (Charych et al., 2010; Kotera et al., 1999; Russwurm et al., 2015). Toutefois, la forme phosphorylée de la PDE10A ne modifie pas l'activité enzymatique d'hydrolyse de l'AMPc (Russwurm et al., 2015). La PDE10A est la PDE montrant la plus forte expression dans les MSNs (Seeger et al., 2003) et, dans le striatum, elle est exclusivement exprimée dans les MSNs D1 et D2 (Nishi et al., 2008; Sano et al., 2008; Xie et al., 2006). Elle présente une meilleure affinité pour l'AMPc ($K_m = 0,25 \mu\text{M}$) par rapport au GMPc ($K_m = 1,1 \mu\text{M}$) (figure 7) bien que la vitesse de dégradation soit plus rapide pour le GMPc ($V_{\max} = 0,7 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ pour l'AMPc et $V_{\max} = 1,6 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ pour le GMPc) (Poppe et al., 2008). La forte affinité de la PDE10A pour l'AMPc, en comparaison à d'autres PDE, laisse supposer une très bonne efficacité d'action pour les niveaux faibles d'AMPc. Il a d'ailleurs été montré par l'équipe que les niveaux de base d'AMPc dans les MSNs sont régulés par la PDE10A (Polito et al., 2015). L'étude de l'expression des isoformes montre uniquement l'expression de PDE10A2 dans le striatum (Kotera et al., 2004). Cette isoforme est localisée principalement au niveau des membranes, plus particulièrement au niveau des épines dendritiques, suggérant une compartimentation de la PDE10A pour réguler localement les niveaux d'AMPc (Kotera et al., 2004; Xie et al., 2006). Cette localisation membranaire se fait principalement par une interaction avec un complexe multi-protéique postsynaptique composé notamment de l'AKAP150, de sous-unités du récepteur NMDA et de PSD95 (*postsynaptic protein density 95*) (Russwurm et al., 2015). Toutefois, un réadressage sous-cellulaire de la membrane vers le cytosol s'effectue lorsque la PDE10A2 est phosphorylée par la PKA sur la Thr16 (Kotera et al., 2004; Russwurm et al., 2015). Ainsi, en fonction de l'état d'activation de la voie AMPc/PKA, la PDE10A n'est pas dirigée aux mêmes compartiments sous-cellulaires et ne ciblera donc pas les mêmes compartiments d'AMPc. De nombreuses études ont montré l'implication de la PDE10A dans l'activité locomotrice et la coordination des mouvements. Le modèle de souris mutante knock-out pour la PDE10 (PDE10^{-/-}) présente une activité exploratoire diminuée par rapport aux souris contrôles (Siuciak et al., 2008). De plus, les niveaux d'expression de la PDE10A sont augmentés chez les patients Parkinsonien et le modèle murin parkinsonien (Giorgi et al., 2011; Niccolini et al., 2015). Des résultats pré-cliniques ont montré l'efficacité d'un inhibiteur de la PDE10A dans le cas de la schizophrénie, puis de la maladie de Huntington (Beaumont et al., 2016; Menniti et al., 2007). Toutefois, jusqu'à aujourd'hui, aucune étude clinique n'a pu aboutir à la mise sur le marché d'un médicament efficace (Baillie et al., 2019; DeMartinis et al., 2019). Malgré ces échecs

thérapeutiques, de nombreux efforts ont été mis dans la conception d'inhibiteurs sélectifs de la PDE10 et sont utilisés pour comprendre le rôle de la PDE10A.

1.2.4.5 – Rôle distinct des PDE dans la réponse à la dopamine

Bien que les PDE catalysent la même réaction enzymatique, il est évident que chacune présente des caractéristiques qui lui sont propres. Ainsi, l'expression de différentes PDE dans les MSNs (et plus généralement dans d'autres types cellulaires) laisse supposer un rôle précis pour chaque PDE. L'expression et l'affinité des PDE semblent être importantes dans la régulation des niveaux d'AMPC. Sachant que l'AMPC n'est pas distribué de manière homogène dans la cellule (*cf.* 1.2.5 – Compartimentation de l'AMPC par les PDE), la localisation des PDE est également importante. Une modélisation suggère que dans les MSNs, la contribution des PDE varie en fonction du niveau de stimulation des récepteurs à la dopamine (figure 10) (Neves-Zaph, 2017; Song et al., 2013). Lors d'une faible stimulation (0.1 μM de dopamine), la PDE10 semble jouer un rôle prédominant dans la dégradation des niveaux d'AMPC. Ces données sont d'ailleurs cohérentes avec l'étude montrant que la PDE10A régule les niveaux de base d'AMPC dans les MSNs (Polito et al., 2015). Lors d'une stimulation plus physiologique (1.0 μM), la contribution de la PDE4 augmente. Enfin lors d'une forte stimulation des récepteurs à la dopamine (10.0 μM), la PDE2 joue un rôle prédominant dans l'hydrolyse des niveaux d'AMPC.

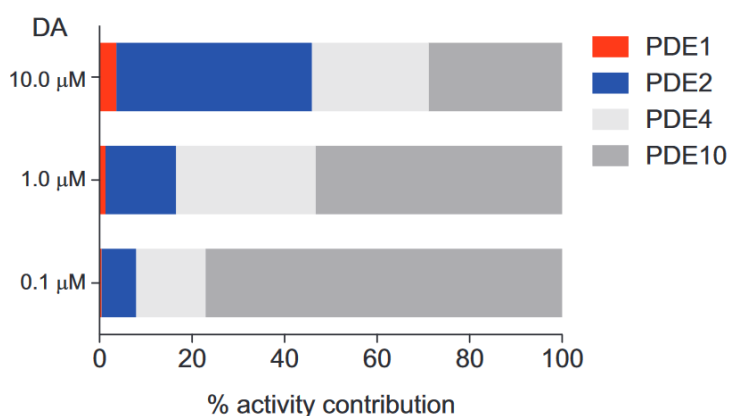


Figure 10 : Contribution des PDE dans l'hydrolyse des niveaux d'AMPC en fonction du niveau de stimulation des récepteurs à la dopamine (figure reprise de Neves-Zaph et al. 2017). Contribution en pourcentage de la PDE1 (rouge), PDE2 (bleu), PDE4 (gris clair), PDE10 (gris foncé) en fonction d'une stimulation faible (0.1 μM), modérée (1.0 μM) ou élevée (10.0 μM) des récepteurs à la dopamine dans les MSNs D1 (Neves-Zaph, 2017).

1.2.5 – Compartimentation de l'AMPC par les PDE

L'AMPC est une petite molécule soluble diffusant depuis son site de production dans l'ensemble du cytosol. Pourtant la concentration d'AMPC n'est pas homogène dans le

cytosol, sa diffusion étant contrainte par les sites de production et sa dégradation par les PDE. Ces contraintes conduisent à la formation de compartiments sous-cellulaires appelés microdomaines. Une élégante étude a permis de mettre en évidence dans des cardiomyocytes intacts l'accumulation de d'AMPC dans des compartiments sous-cellulaires (Jurevicius and Fischmeister, 1996). Pour cela, seule une moitié de la cellule a été exposée à l'isoprotérénol, agoniste des récepteurs β -adrénergique (RCPG) couplés G_s , ou à la forskoline, activateur non spécifique des AC. Le courant des canaux calciques de type L (I_{Ca}) est mesuré dans la partie exposée et non exposée à la drogue. L'application de la forskoline conduit à une activation du courant I_{Ca} aussi bien la partie exposée que la partie non exposée, tandis que l'application de l'isoprotérénol conduit à une activation du courant I_{Ca} 40 fois supérieure dans la partie exposée que celle non exposée. Cet effet est annulé par l'application d'un inhibiteur non sélectif des PDE (IBMX). Ces résultats démontrent une compartimentation de l'AMPC sur le site de production délimitée par l'activité d'hydrolyse des PDE, formant localement une barrière (Jurevicius and Fischmeister, 1996).

Des biosenseurs FRET pour l'AMPC ou la PKA ont également été utilisés dans les neurones (Bacskai et al., 1993; Castro et al., 2010; Gervasi et al., 2010; Nikolaev et al., 2004). Ces biosenseurs ne permettent pas de visualiser directement les microdomaines. Toutefois, ils présentent l'avantage de rendre compte de la dynamique d'un signal intracellulaire, tels que les seconds messagers ou l'activité de kinases. Certains résultats obtenus avec l'imagerie de biosenseurs suggèrent la présence d'une compartimentation des seconds messagers, comme l'AMPC. La restriction de l'AMPC dans des microdomaines semble être régulée par plusieurs facteurs (Neves et al., 2008). D'une part, la morphologie du neurone avec un rapport surface/volume différent entre les dendrites et le corps cellulaire affecte la diffusion de l'AMPC. Des études montrent que, suite à une stimulation des RCPG, les niveaux d'AMPC sont plus élevés dans les dendrites (avec un haut rapport surface/volume) que dans le corps cellulaire (avec un faible rapport surface/volume) (Bacskai et al., 1993; Li et al., 2015; Neves et al., 2008; Nikolaev et al., 2004). L'AMPC semble donc s'accumuler plus rapidement dans des petits compartiments cellulaires. D'autre part, les protéines impliquées dans la régulation de la voie AMPC/PKA, telles que les ACs, la PKA, les PDE et les PPs, semblent impliquées dans la formation de ces microdomaines. Plusieurs études montrent que l'inhibition d'une ou plusieurs PDE conduit à une augmentation des niveaux d'AMPC dans le corps cellulaire, suggérant une restriction de l'AMPC dans les compartiments médiée par les PDE (Castro et al., 2010; Gervasi et al., 2010; Neves et al., 2008). Le rôle des PDE pour limiter la diffusion de l'AMPC est cependant controversé. Effectivement, le coefficient de diffusion de l'AMPC est élevé (de l'ordre de $40 \mu\text{m}^2/\text{s}$) (Nikolaev et al., 2004; Richards et al., 2016), tandis que l'activité enzymatique des PDE (définie par leur K_m et V_{max}) agit

sur une échelle de temps plus longue. L'hypothèse des PDE agissant comme barrière enzymatique étant parfois difficile à démontrer expérimentalement, les modélisations mathématiques ont permis de mieux comprendre le rôle de la diffusion de l'AMPc et des PDE dans la formation des microdomaines (Chen et al., 2009; Lohse et al., 2017; Neves et al., 2008). Les simulations confirment l'importance de la localisation spatiale des PDE dans la formation du gradient AMPc (Lohse et al., 2017). Il semblerait que dans un volume restreint tel que dans les microdomaines, les PDE constituent une contrainte à la diffusion de l'AMPc. D'autres protéines ont également été impliquées dans la formation des microdomaines, tels que les AC (Gervasi et al., 2010) les phosphatases (Luczak et al., 2017) et les sous-unités régulatrices de la PKA (Di Benedetto et al., 2008).

1.2.6 – Transduction du signal dopaminergique dans les MSNs

La libération de la dopamine dans le striatum active les récepteurs à la dopamine de type D₁ des MSNs D1 et ceux de type D₂ des MSNs D2. Dans les MSNs D1, l'activation du récepteur D₁ conduit à la production d'AMPc, l'activation de la PKA, et, *in fine*, à la phosphorylation des cibles cytoplasmiques et nucléaires de la PKA, comme la DARPP-32, qui amplifie alors le niveau de phosphorylation des cibles de la PKA. À l'inverse, dans les MSNs D2, l'activation du récepteur D₂ conduit à l'inhibition des AC et donc l'arrêt de production d'AMPc. La modulation de la voie AMPc/PKA dans les MSNs D1 et D2 est, ci-dessus, hautement simplifiée. Comme décrit précédemment, de nombreux acteurs doivent être considérés : l'activité des PDE et phosphatases, l'activité de la DARPP-32, et l'activation des récepteurs au glutamate, à l'adénosine, à l'acétylcholine (ACh), ainsi que l'interaction avec la voie NO/GMPc et la voie calcique. Ces nombreux modulateurs de la voie AMPc/PKA lui permettent de remplir son rôle initial : celui de traduire une information extracellulaire en un signal intracellulaire, afin, d'à son tour, transmettre l'information à d'autres cellules. Pour remplir ce rôle, cette voie de signalisation doit être hautement dynamique et encoder la temporalité de la réponse à la dopamine. Dans cette partie, *Transduction du signal dopaminergique dans les MSNs*, je souhaiterais réunir les connaissances actuelles sur les mécanismes qui déterminent la temporalité de la réponse à la dopamine dans les MSNs.

1.2.6.1 – Contraste temporel de la réponse à la dopamine

Les afférences dopaminergiques projettent dans plusieurs structures cérébrales dont le cortex et le striatum. Le développement de l'imagerie de FRET a permis l'étude de la dynamique des réponses à la dopamine des neurones corticaux et des MSNs (Castro et al., 2013; Yapo et al., 2018). À l'inverse des neurones corticaux, les MSNs décodent temporellement des stimulations dopaminergiques brèves (protocole de décaillage de la dopamine « cagée »), analogues aux libérations phasiques de dopamine (figure 11).

Cette réponse à la dopamine est caractéristique du striatum, tant au niveau de l'AMPC, de l'activité PKA que de la réponse nucléaire (Yapo et al., 2018).

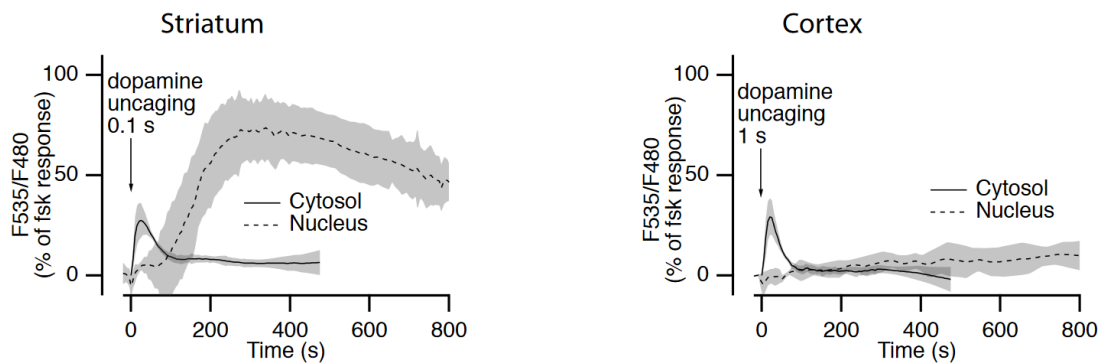


Figure 11 : la stimulation transitoire à la dopamine induit une réponse nucléaire dans le striatum mais pas dans le cortex préfrontal (figure reprise de Yapo et al. 2018). Réponse PKA cytosolique (trait plein) et nucléaire (pointillé) des neurones exprimants le récepteur D₁ en réponse à la dopamine transitoire (NPEC-DA décaagée par un flash de lumière UV) dans le striatum et le cortex. Les traces correspondent aux traces moyennes de toutes les cellules individuelles et sont normalisées à la réponse forskoline. La ligne représente la moyenne et l'ombre grisée représente la s.e.m. (Yapo et al., 2018)

L'activation brève des récepteurs D₁ dans le striatum conduit à une augmentation transitoire rapide et de forte amplitude des niveaux d'AMPC et du signal PKA. La dynamique de cette réponse est en partie médiée par l'efficacité de l'isoforme AC5 exprimée dans les MSNs (Castro et al., 2013). Toutefois, le temps de récupération du signal PKA est plus lent montrant une amplification du signal par rapport aux niveaux d'AMPC. Cette amplification de la réponse PKA est médiée par l'action de la DARPP-32. Effectivement, la récupération du signal PKA est trois fois plus rapide dans un modèle murin contenant une forme inactive de la DARPP-32 (mutation sur la Thr34 de la DARPP-32 (DARPP-32 T34A) (Castro et al., 2013). Jusqu'à présent, cette observation a été faite uniquement dans le striatum (particulièrement dans les MSNs D1), et est absente dans les neurones corticaux. Ainsi, l'activation de la DARPP-32 par l'action de la dopamine sur le récepteur D₁ conduit à l'inhibition de la PP1 et donc à un renforcement de l'action de la dopamine dans ces neurones. La DARPP-32 amplifie le contraste de la réponse à la dopamine et ainsi améliore le rapport entre le signal et le bruit. L'intégration du signal dopaminergique dans le noyau est très différente de celle observée dans les neurones corticaux et thalamiques où la translocation du signal se fait par diffusion lente (Gervasi et al., 2007; Hu et al., 2011). Dans les MSNs D1, en réponse à une activité cytosolique modérée, l'activité PKA est très forte. Cette réponse est très rapide et non linéaire, avec une réponse de type tout ou rien, et présente un délai d'activation d'environ 200s après l'activation du récepteur. Ce délai peut notamment s'expliquer par l'action de la DARPP-32 comme inhibiteur de la PP1 nucléaire (Yapo et

al., 2018). La DARPP-32 cytoplasmique (c'est-à-dire phosphorylée sur la Ser97) est phosphorylée par la PKA sur le Thr34. La déphosphorylation de la Ser97 par la PP2A conduit à l'importation nucléaire de la phospho-Thr34-DARPP-32, qui inhibe alors la PP1 nucléaire (Stipanovich et al., 2008). Ainsi, la translocation de la phospho-Thr34-DARPP-32 dans le noyau favorise le maintien de la forme phosphorylée des cibles nucléaires, comme l'histone 3 impliquée dans la régulation des gènes.

Dans les MSNs D2, le récepteur à la dopamine D₂ présente une meilleure affinité pour la dopamine que le récepteur D₁ (Richfield et al., 1989). Ainsi, il a longtemps été admis que les MSNs D2 répondaient aux niveaux toniques de dopamine tandis que les MSNs D1 répondaient aux niveaux phasiques. L'imagerie de biosenseur a permis une étude dynamique de l'efficacité de transduction du signal dopaminergique en aval du récepteur. Au niveau de l'AMPC, les MSNs D2 intègrent le signal dopaminergique en miroir des MSNs D1, en cohérence avec le couplage opposé des récepteurs aux protéines G. De plus, la concentration efficace médiane (EC₅₀) du récepteur D₂ par rapport au récepteur D₁ n'est meilleure que d'un facteur deux (Yapo et al., 2017). Au niveau de l'AMPC, les MSNs D1 et D2 sont capables d'intégrer la libération phasique de dopamine. Une différence dans l'intégration du signal est observée au niveau de l'activité de la PKA. Dans les MSNs D2, la libération transitoire de dopamine ne suffit pas à réduire l'activité PKA jusqu'au niveau de base (Yapo et al., 2017). Un modèle informatique de simulation suggère que la dopamine transitoire agit pendant une trop courte durée, ne permettant pas de lever l'inhibition de la PP1 par la DARPP-32. La voie AMPC/PKA des MSNs D2 permet donc principalement de détecter une pause dans la libération de dopamine : un arrêt bref de la libération de dopamine tonique conduirait à une augmentation des niveaux d'AMPC dans les MSNs D2 (Nair et al., 2015; Yapo et al., 2017).

La temporalité de la réponse à la dopamine est également fortement régulée par les PDE striatales. La PDE10A joue un rôle crucial dans la régulation des niveaux de base d'AMPC. Sans stimulation, l'inhibition de la PDE10A est suffisante pour élever les niveaux d'AMPC dans les MSNs D1 et D2. Toutefois, cette inhibition a un effet sur l'activation de la PKA que dans les MSNs D2 (Polito et al., 2015). Dans les MSNs D1, l'absence d'effet est due à l'activité de PP1 qui déphosphoryle les cibles de la PKA. Dans les MSNs D2, la forte activité de la DARPP-32 inhibe fortement la PP1, basculant ainsi l'équilibre entre phosphorylation/déphosphorylation en faveur de l'activité PKA. La PDE10A, ayant une haute affinité pour l'AMPC, maintient donc le niveau de base d'AMPC dans les MSNs (Nishi et al., 2008; Polito et al., 2015). A l'inverse, la PDE2A et PDE4 ne semblent pas responsables de l'hydrolyse des faibles niveaux d'AMPC (Castro et al., 2013; Nishi et al., 2008; Polito et al., 2013). Leur faible affinité suggère un contrôle des niveaux élevés

d'AMPC. Il n'est également pas à exclure une activité synergique de la PDE2A et PDE4, comme cela a été démontré dans les processus de consolidation de la mémoire (Paes et al., 2021b) ou dans les cardiomyocytes entre la PDE3 et PDE4 (Mika et al., 2019).

1.2.7 – Transduction du signal glutamatergique

Le striatum recevant des afférences dopaminergiques et glutamatergiques, les MSNs expriment des récepteurs ionotropiques (iGluR, *ionotropic glutamate receptor*) et métabotropiques (mGluR, *metabotropic glutamate receptor*) au glutamate. Les iGluR sont des canaux ioniques et ont donc un temps d'action inférieur à celui des mGluR.

Les MSNs expriment les iGluR de type AMPA, kaïnate et NMDA et leur activation mène à des courants excitateurs postsynaptiques (Bernard et al., 1997; Bernard and Bolam, 1998; Tarazi et al., 1998). Les récepteurs ionotropiques interviennent essentiellement dans la mise en place de la plasticité synaptique (*cf.* 1.2.8 – Plasticité des MSNs).

Parmi les 8 types de mGluR existants (mGluR1 à mGluR8), les MSNs expriment majoritairement le mGluR5 et plus marginalement le mGluR1 (Conn et al., 2005; Testa et al., 1994). Les mGluR appartiennent à la famille des RCPG. Les mGluR1/5 sont couplés à la protéine G_q et leur activation mène à l'activation de la phospholipase C, la formation de l'inositoltriphosphate (IP_3), l'activation de la protéine kinase C (PKC) et, *in fine*, à la libération calcique des stocks intracellulaires et l'activation des canaux potassiques. La localisation du mGluR5 est généralement proche de celle des récepteurs NMDA. Ainsi, ils agissent par interaction bidirectionnelle, l'un amplifiant l'action de l'autre (Pisani et al., 2001b; Tu et al., 1999). L'action combinée mène à l'activation des MAP kinases (*mitogen-activated protein kinase*), l'inhibition de PP1 et PP2A, et donc à l'activation de facteurs de transcription (*e.g.* CREB) (Choe et al., 2004, p. 2; Mao and Wang, 2003, 2001). De plus, l'activation des mGluR1/5 mène à la phosphorylation de la DARPP-32 sur la Thr75 par CDK5, et donc s'oppose à l'activation de la voie AMPc/PKA par la dopamine (Liu et al., 2002, 2001). L'activation des récepteurs mGluR_{1/5} module négativement la réponse à la dopamine. Dans la maladie de Parkinson et les LID, la transmission glutamatergique est suractivée (Cenci, 2007; Chase et al., 2000). L'activation des mGluR1/5 étant associée à la voie du glutamate et de la dopamine, ces récepteurs ont beaucoup été étudiés comme cible thérapeutique pour améliorer l'efficacité du traitement L-DOPA dans la maladie de Parkinson. L'inhibition du mGluR5 empêche le développement des LID chez le modèle murin parkinsonien traité à la L-DOPA (Mela et al., 2007) et amplifie également l'effet positif de la L-DOPA sur les capacités motrices (Rylander et al., 2009). Dans le modèle parkinsonien et dyskinétique, une présence accrue des hétéromères mGluR₅/récepteur D₁ couplés à la protéine G_{α_q} explique le double effet bénéfique de l'inhibiteur mGluR₅ dans la maladie de Parkinson

(Sebastianutto et al., 2020). Un inhibiteur mGluR₅, le dipraglurant, est actuellement en phase clinique 2b/3 (voir ClinicalTrials.gov, référence NCT04857359) (Cenci et al., 2022).

1.2.8 – Plasticité des MSNs

Le striatum est impliqué dans les mécanismes d'apprentissage et la mémoire, deux phénomènes rendus possibles par l'existence d'une plasticité synaptique à long terme. Calabresi et ses collaborateurs ont mis en évidence l'existence d'une dépression à long terme (*long term depression*, LTD) et d'une LTP entre les fibres glutamatergiques corticales et les MSNs (Calabresi et al., 1992b, 1992a). Cette plasticité est bidirectionnelle : une potentiation et une dépression peuvent avoir lieu dans les MSNs (Fino et al., 2005; Shen et al., 2008). Cette plasticité synaptique se présente notamment sous la forme d'une plasticité fonction du temps d'occurrence des impulsions (*spike-timing-dependent plasticity*, STDP) où le temps entre l'évènement présynaptique et l'évènement post-synaptique entre en jeu (Fino et al., 2005; Pawlak and Kerr, 2008; Shen et al., 2008).

Que ce soit la dépression ou la potentiation, les deux plasticités synaptiques sont dépendantes de la voie calcique (Fino, 2010; Shindou et al., 2011). La LTP est principalement dépendante des récepteurs NMDA postsynaptiques (Fino, 2010). Par ailleurs, une augmentation des niveaux d'AMPC est nécessaire pour permettre la LTP médiée par les récepteurs NMDA (Augustin et al., 2014). La STDP-LTD dépend de la production des endocannabinoïdes et est exprimée en présynaptique : l'activation des récepteurs métabotropiques du glutamate mGluR₅ et des canaux calciques de type L Ca_v1.3 dans les MSNs engendre la production de l'endocannabinoïde 2-AG (2-Arachidonoylglycol) qui agit de manière rétrograde sur les récepteurs CB1 présynaptiques des terminaisons glutamatergiques réduisant la probabilité de libération de glutamate (Kreitzer and Malenka, 2005).

L'occurrence d'une dépression ou potentiation dépend également de la libération de modulateurs, comme la dopamine ou l'ACh. Il est proposé que les neuromodulateurs permettent d'associer temporellement et spatialement une activité pré- et postsynaptique, en faveur du LTP ou d'une LTD (Deffains and Bergman, 2015).

Un lien a été établi entre la plasticité cortico-striatale et la libération de dopamine (Calabresi et al., 1992b, 1992a). L'action de la dopamine est essentielle pour conserver la plasticité bidirectionnelle des MSNs D1 et D2 (Fino et al., 2005; Shen et al., 2008) et permet le changement d'une LTD vers une LTP (Shindou et al., 2019). Dans les MSNs D2, cette plasticité est dépendante des récepteurs D₂ et des récepteurs A_{2A} : la LTD nécessite l'activation des récepteurs D₂ et l'absence d'activation des récepteurs A_{2A}, et inversement pour la LTP (Kreitzer and Malenka, 2005; Shen et al., 2008). L'activation des

récepteurs D₂ conduit à une réduction des niveaux d'AMPC, ces faibles niveaux étant requis pour la mise en place de la LTD (Augustin et al., 2014; Lerner and Kreitzer, 2012). Concernant les MSNs D1, l'activation des récepteurs D₁ est nécessaire pour la potentiation (Kerr and Wickens, 2001; Pawlak and Kerr, 2008; Shen et al., 2008). Par ailleurs, l'inhibition de la PDE1B, lors d'une activation concomitante des récepteurs à la dopamine et NMDA, augmente la réponse AMPC des MSNs D1 et amplifie la potentiation (Betolngar et al., 2019). La PDE1B réduit donc la réponse AMPC lors d'une activité concomitante dopamine/glutamate. Il semblerait que la plasticité synaptique induite par une activation concomitante de ces récepteurs soit le résultat d'une fine régulation entre les voies AMPC et calcium. La voie AMPC/PKA est donc impliquée dans la plasticité bidirectionnelle des MSNs et détermine la fenêtre de temps d'expression de la plasticité synaptique (Centonze et al., 2003a; Kheirbek et al., 2009; Shindou et al., 2019; Yagishita et al., 2014) : la libération de dopamine doit suivre celle du glutamate dans une fenêtre de temps précise (libération de la dopamine entre 0,3 – 2s après le protocole de STDP) (Yagishita et al., 2014).

L'activité des ChIN module également la plasticité synaptique des MSNs. Il a été montré que l'activation des récepteurs D₂ des ChIN conduit à une diminution de la libération d'ACh. Les récepteurs M₁ étant moins activés, celui conduit à une libération d'eCB, favorisant la LTD, comme décrit ci-dessus (Surmeier et al., 2007; Wang et al., 2006). A l'inverse, l'activation pharmacologique des récepteurs M₁ favorise une LTP induite par une stimulation à haute fréquence (P. Calabresi et al., 1999a). Dans les MSNs D1, l'activation des récepteurs M₄ par un modulateur allostérique positif favorise la LTD (Shen et al., 2015).

Ces différentes études présentent les MSNs comme détecteurs de coïncidence de l'activité glutamatergique et dopaminergique, dont l'activité est modulée par les neuromodulateurs tels que la dopamine et l'ACh. Cela montre ainsi l'importance de la temporalité dans le striatum pour la mise en place de la plasticité synaptique.

1.3 – Les interneurones cholinergiques

Les ChIN représentent entre 1 et 2 % des neurones du striatum (Bolam et al., 1984; "The synaptic organization of the caudate nucleus," 1971). Ils ont été identifiés dès la fin du 19^{ème} siècle et ont été nommés « interneurones géants » (*giant interneurons*) (Kölliker, 1889). Ils présentent effectivement un large corps cellulaire (entre 40 et 50 µm de diamètre) duquel partent entre 2 et 4 prolongements dendritiques qui se ramifient par la suite. Ils ont ensuite été spécifiquement identifiés par l'expression de la choline acetyltransférase (ChAT), une enzyme responsable de la synthèse de l'acétylcholine (ACh), et ont ainsi été nommés interneurones cholinergiques.

Les ChIN reçoivent des afférences glutamatergiques du thalamus et dans une moindre mesure du cortex (Guo et al., 2015; Lapper and Bolam, 1992; Wilson et al., 1990), et des afférences dopaminergiques du mésencéphale (Chang, 1988; Kubota et al., 1987). Il est important de noter que les ChIN reçoivent une plus grande proportion d'afférences intrastriales que les MSNs (Guo et al., 2015), en cohérence avec leur rôle de modulateur de l'activité striatale.

Les ChIN ont une activité tonique spontanée autonome. C'est pourquoi les ChIN ont été nommés chez le primate neurones toniquement actifs (*tonically active neurons TANs*) (Aosaki et al., 1995). Cette activité tonique peut être simple (*single-spike*) (3 à 10 Hz), ou sous forme d'une décharge rythmique en rafale (*burst*) (< 1 Hz) ou d'une décharge irrégulière (Bennett and Wilson, 1999; Reynolds et al., 2004; Wilson et al., 1990). La dépolarisation des ChIN est induite par un courant sodique sensible à la tétrodotoxine (TTX) conduisant à une entrée de calcium par les canaux Ca_v2 . L'entrée de calcium active ensuite plusieurs types de courants potassium qui contribuent à la repolarisation de la membrane, suivie d'une AHP de type medium (mAHP) ou lent (sAHP), déterminant le type de décharge. La mAHP favorise la décharge simple (*single-spike*) tandis que la sAHP favorise la décharge rythmique en rafale (Goldberg et al., 2009; Goldberg and Wilson, 2005). L'hyperpolarisation résultant de l'AHP conduit ensuite à l'activation d'un courant de type I_h , responsable d'une dépolarisation progressive des ChIN. Ce courant I_h détermine ainsi la durée de l'hyperpolarisation médiée par l'AHP (Deng et al., 2007). Or, ce courant I_h est régulé par l'AMPc : une augmentation intracellulaire de l'AMPc déplace la courbe d'activation du courant I_h vers un potentiel plus dépolarisé, favorisant ainsi l'excitabilité du ChIN (DiFrancesco and Tortora, 1991). La modulation des niveaux d'AMPc des ChIN influence donc directement l'activité électrique du ChIN.

1.3.1 – Les pauses dans l'activité tonique : contraste essentiel à l'apprentissage

L'activité tonique des ChIN conduit à une libération régulière d'ACh dans le striatum, contrastée par de brèves pauses. La libération tonique d'acétylcholine (ACh) active les récepteurs M_4 des MSNs D1 et inhibe ainsi la voie AMPc/PKA (Nair et al., 2019, 2015) tandis que les pauses lèvent cette inhibition. Dans un premier temps, ces pauses ont été associées à l'apprentissage associatif, puis ensuite plus largement aux stimuli positifs comme négatifs (Aosaki et al., 1994; Apicella, 2002; Morris et al., 2004). D'une part, la libération de dopamine active les récepteurs D_2 des ChIN et conduit à une pause de l'activité cholinergique (Deng et al., 2007). Réciproquement, cette pause lève l'inhibition de l'ACh sur les neurones dopaminergiques et ainsi coïncide avec l'activité phasique des neurones dopaminergiques pendant l'apprentissage (Joshua et al., 2008; Morris et al.,

2004). D'élégants travaux ont récemment montré que la coïncidence temporelle entre la pause des ChIN et l'activité phasique des neurones dopaminergiques est requise pour la mise en place de la LTP dans les MSNs (Reynolds et al., 2022). Ces résultats sont cohérents avec l'étude montrant que l'action de l'ACh sur les récepteur M₄ des MSNs D1 est suffisante pour supprimer la réponse AMPc médiée par les récepteurs D₁ : une pause dans l'activité des ChIN est nécessaire pour permettre l'action de la dopamine sur les MSNs D1 (figure 12) (Nair et al., 2019, 2015).

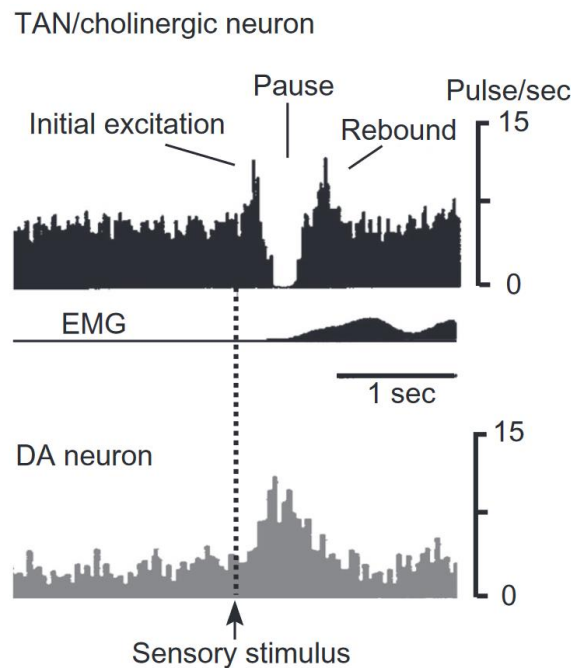


Figure 12 : représentation de la pause dans l'activité tonique des ChIN et de l'activité des neurones dopaminergiques lors d'un stimulus sensoriel (figure reprise d'Aosaki et al. 2010).

Le stimulus sensoriel conduit à une pause dans l'activité tonique des ChIN (TAN) du striatum (en haut) et à une rafale de potentiels d'action dans les neurones dopaminergiques (DA neuron) de la substance noire (en bas). La pause est constituée d'une excitation initiale, d'une pause puis d'une rafale de potentiels d'action (Aosaki et al., 2010)

L'action de l'ACh sur les neurones dopaminergiques est quant à elle controversée et peut s'expliquer par l'expression de différents types de récepteurs muscariniques (M₁ à M₅) et nicotiques (nACh) par les neurones dopaminergiques (Sulzer et al., 2010; Wess, 1996). D'une part, l'utilisation de souris *knock-out* pour les différents types de récepteurs muscariniques montre que la stimulation des récepteurs M₄ et M₅ favorise la libération de dopamine, tandis que la stimulation des récepteurs M₃ l'inhibe (Zhang et al., 2002). D'autre part, la stimulation des ChIN par les afférences thalamiques ou corticales conduit à une libération d'ACh qui, via les récepteurs nACh, stimule les neurones dopaminergiques et la libération de dopamine, induisant alors une pause dans l'activité des ChIN (Ding et al., 2010; Kosillo et al., 2016). Les afférences dopaminergiques n'exprimant pas les récepteurs ionotropiques au glutamate, il est

proposé que la synchronisation de l'activité des ChIN par les afférences corticales et thalamiques permette de contrôler la libération de dopamine (Kosillo et al., 2016). D'ailleurs, l'activation des ChIN par les afférences glutamatergiques entraîne une libération de dopamine, indépendamment d'une activation du soma des neurones dopaminergiques (Kosillo et al., 2016; Threlfell et al., 2012).

1.3.2 – L'action de l'ACh dans la terminaison du mouvement

En plus de leur importance dans l'apprentissage associatif, les ChIN ont un rôle majeur dans le contrôle moteur. L'utilisation de souris transgéniques ChAT-CRE et l'imagerie calcique biphotonique a montré, *in vivo*, que l'activité des ChIN synchronise l'activité des MSNs et permet de mettre fin à un mouvement (Gritton et al., 2019).

L'action de l'ACh sur les MSNs se fait exclusivement via les récepteurs muscariniques, principalement de type M₁ et M₄ couplés à la protéine G_{q/11} et G_{i/o}, respectivement (Lin et al., 2004; Wess, 1996). Le récepteur de type M₁ est exprimé par les MSNs D1 et D2, tandis que le récepteur de type M₄ est exprimé exclusivement par les MSNs D1. L'utilisation d'un agoniste des récepteurs M₁ augmente l'excitabilité des MSNs D1 et D2 (Galarraga et al., 1999; Shen et al., 2005). Toutefois, dans les MSNs D1, l'utilisation d'un agoniste muscarinique non sélectif (oxotremorine) conduit à une diminution des niveaux d'AMPC. Cet effet n'est pas bloqué par un antagoniste des récepteurs M₁ mais l'est par un antagoniste des récepteurs M₄ (Nair et al., 2019). Ces résultats sont cohérents avec l'étude montrant que l'activation du récepteur M₄ conduit à une diminution de l'excitabilité des MSNs D1 (Howe and Surmeier, 1995). Cependant, cela s'oppose à une étude plus récente réalisée sur les MSNs D1, où l'utilisation d'un agoniste des récepteurs M₄ augmente leur excitabilité (Hernández-Flores et al., 2015). Dans cette étude, l'application de l'agoniste des récepteurs M₄, postérieure à une stimulation des récepteurs D₁, diminue l'excitabilité des MSNs D1 (Hernández-Flores et al., 2015). Les effets semblent donc dépendants de la temporalité d'activation des récepteurs. *In vivo*, l'administration d'un modulateur positif du récepteur M₄ inverse l'hyperlocomotion d'un modèle murin d'hyperactivité (souris DAT-KO) (Nair et al., 2019). Ces résultats concordent avec l'étude démontrant *in vivo* l'implication des ChIN dans la terminaison des mouvements (Gritton et al., 2019).

L'utilisation d'agents pharmacologiques n'étant pas représentative d'une libération endogène d'ACh, l'optogénétique a été utilisée pour contrôler l'activité électrique des ChIN et en mesurer les conséquences sur l'activité électrique des MSNs. Il a ainsi été montré que la photoinhibition des ChIN conduit à une diminution d'activité des MSNs D1 et D2 (Maurice et al., 2015; Zucca et al., 2018). Ces résultats sont cohérents avec le fait que l'ACh stimule l'activité des MSNs via les récepteurs M₁. Par ailleurs, lorsque la

souris est en mouvement, la photo-inhibition des ChIN ne modifie pas l'activité des MSNs (English et al., 2011).

La libération tonique d'ACh ainsi que la pause de cette libération interviennent donc dans l'information sortante des ganglions de la base. Il est donc crucial de mieux comprendre comment les différents neurotransmetteurs du striatum modulent l'activité des ChIN.

1.3.3 – Régulation de la voie AMPc/PKA par différents récepteurs métabotropiques

Les ChIN expriment de nombreux types de récepteurs. Ainsi, leur excitabilité est affectée par plusieurs types de molécules, tel que le GABA, le glutamate, la dopamine, l'ACh, l'histamine et la sérotonine. Parmi ces récepteurs, certains récepteurs métabotropiques affectent le niveau d'AMPc intracellulaire. Or, comme décrit précédemment, l'AMPc module directement le courant I_h essentiel à l'activité électrique du ChIN. Ces récepteurs métabotropiques ont donc une influence directe sur cette activité électrique des ChIN.

Les ChIN expriment aussi bien les récepteurs D_5 couplés à G_s , que les récepteurs D_2 couplé $G_{i/o}$ (Bergson et al., 1995; Le Moine et al., 1990; Yan et al., 1997). Certaines études réalisées sur des tranches de cerveau ont montré que l'activation des récepteurs D_5 favorise la décharge des ChIN (Aosaki et al., 1998; Centonze et al., 2003a; Yan and Surmeier, 1997) tandis que d'autres études ont montré que l'activation des récepteurs D_2 produit l'effet inverse (Ding et al., 2010; Maurice et al., 2004). La dopamine est donc capable d'activer et d'inhiber l'activité électrique des ChIN, respectivement. A l'aide de l'optogénétique, l'activation des terminaisons dopaminergiques produit majoritairement une réponse biphasique dans les ChIN : tous montrent une diminution du taux de décharge causée par l'activation du récepteur D_2 . Chez 76 % d'entre eux, cette hyperpolarisation est suivie par une rafale de potentiels d'action (Straub et al., 2014). Il semblerait que l'action de la dopamine soit dépendante du contexte environnant du neurone (Chuhma et al., 2014). D'autres études sont donc nécessaires pour mieux comprendre l'action de la dopamine sur l'activité électrique des ChIN.

Les ChIN expriment également des autorécepteurs muscariniques. Bien que les cinq types de récepteurs muscariniques soient exprimés, les récepteurs M_2 et M_4 , couplés à la protéine G_{α_i} , sont majoritaires (Levey et al., 1991; Weiner et al., 1990; Yan et al., 1997). L'activation de ces récepteurs prolonge le temps de repolarisation par l'AHP et est corrélée à une diminution du courant I_h et *in fine* inhibe l'activité spontanée des ChIN. Cette action implique la voie $G_{i/o}$ /AMPc, indépendamment de la PKA (Deng et al., 2007; Zhao et al., 2016). Les canaux HCN de type I_h étant modulés par l'AMPc dans les

ChIN (Deng et al., 2007), il est possible que l'action des récepteurs M_4 et M_5 passe par une action directe de l'AMPc sur les canaux I_h . Un couplage similaire a été mis en évidence entre le récepteur D_2 et les canaux I_h chez les ChIN (Deng et al., 2007).

L'activité électrique des ChIN peut être augmentée par l'action de la sérotonine via trois récepteurs : 5-HT_{2C}, 5-HT₆ et 5-HT₇. Tandis que le récepteur 5-HT_{2C} est couplé à la protéine G_q , les récepteurs 5-HT₆ et 5-HT₇ sont couplés à la protéine G_s . Bonsi *et al.* ont par ailleurs montré que cet effet est dépendant de la phospholipase C (mais indépendant de la PKC) et dépendant de l'AC (mais indépendant de la PKA), respectivement (Bonsi et al., 2007)

Les ChIN expriment également plusieurs types de récepteurs métabotropiques au glutamate, notamment les récepteurs du groupe I de type mGluR1 et mGluR5 couplés à la protéine G_q , et les récepteurs du groupe II et III de type mGluR2 et mGluR7 couplés à la protéine $G_{i/o}$ (Bell et al., 2002; Tallaksen-Greene et al., 1998). Tandis que la stimulation des récepteurs du groupe I conduit à l'excitation du ChIN via la phospholipase C (Bell et al., 2002; Paolo Calabresi et al., 1999; Pisani et al., 2001a), l'activation des récepteurs du groupe II et III induit une dépression (Bell et al., 2002).

1.3.4 – Les PDE dans les ChIN ?

Les récepteurs métabotropiques modulent l'activité tonique des ChIN via la voie AMPc. Or, comme décrit précédemment, les PDE effectuent un contrôle négatif de la voie AMPc. Toutefois, peu d'étude ont étudié spécifiquement l'expression et le rôle des PDE dans la régulation de la voie AMPc et de l'activité électrique des ChIN. Il a été montré par immunomarquage et microscopie confocale que la PDE10A est spécifiquement exprimée dans les MSNs et ne l'est pas dans les interneurons striataux (Xie et al., 2006). Parmi les PDE exprimées dans le striatum mais non exprimées par les MSNs, on retrouve notamment la PDE3A (Reinhardt and Bondy, 1996). Bien que plusieurs études montrent une très faible expression voire une absence du messenger de la PDE3 dans le cerveau (Kelly et al., 2014; Lakics et al., 2010), l'ARNm de la PDE3A a été fortement détecté par hybridation *in situ* dans de larges neurones du striatum (Reinhardt and Bondy, 1996). Cette étude suggère la présence du messenger de la PDE3A dans des interneurons striataux avec un large corps cellulaire, tels que les ChIN. Récemment, l'expression du gène de la Pde3a a été retrouvée dans les interneurons parvalbumine du striatum à l'aide de la technique du FACS (*fluorescence activating cell sorting*) (Enterría-Morales et al., 2020). Par ailleurs, le séquençage à l'échelle de cellules individuelles indique la présence de messagers codants pour la PDE3A dans le cluster correspondant aux interneurons ChIN (Saunders et al., 2018). Des études complémentaires sont toutefois nécessaires pour confirmer l'expression protéique de la PDE3A dans le striatum. De plus,

l'utilisation de marqueurs protéiques spécifiques des ChIN ou d'autres interneurons du striatum permettraient de préciser la localisation cellulaire de la PDE3A.

La PDE3 fait partie des PDE hydrolysant aussi bien l'AMPc que le GMPc et présente une très bonne affinité pour les deux seconds messagers. Bien que le K_m pour l'AMPc ($K_m = 0,47 \mu\text{M}$) soit sensiblement semblable à celui du GMPc ($K_m = 0,29 \mu\text{M}$), la vitesse maximale de dégradation de l'AMPc est 10 fois supérieure à celle du GMPc (Beavo, 1995; Conti et al., 1995; Harrison et al., 1986; Manganiello et al., 1995). La PDE3 est l'unique PDE présentant une insertion de 44 acides aminés dans le domaine catalytique hautement conservé parmi les PDE. Sa fonction exacte reste toutefois encore inconnue. La liaison du substrat induirait un changement de conformation menant à une interaction entre le substrat et certains acides aminés présents dans cette insertion (Degerman et al., 1997; Hung et al., 2006). Les PDE3 sont codées par deux gènes : Pde3a et Pde3b. Tandis que la PDE3B ne présente pas de variant d'épissage, trois variants existent pour la PDE3A (PDE3A1 à PDE3A3) (Choi et al., 2001; Wechsler et al., 2002). Les PDE3A2 et PDE3A3 sont des variants dont le codon d'initiation est décalé par rapport à celui de la PDE3A1. Ainsi la PDE3A3 représente la protéine la plus courte et PDE3A2 est plus petite que PDE3A1. Les PDE3A sont fortement exprimées dans les cardiomyocytes, cellules musculaires lisses vasculaires ainsi que les thrombocytes, tandis que la PDE3B est majoritairement exprimée dans les adipocytes, hépatocytes et cellules pancréatiques (Choi et al., 2001; Shakur et al., 2001). Dans le cerveau, la PDE3A et PDE3B sont présentes dans l'hippocampe, le cortex et bulbe olfactif. Seule la PDE3A se trouve dans l'amygdale, l'hypothalamus et le striatum (Bolger et al., 1994; Xu et al., 2011). Tandis que la présence du messenger de la PDE3B est constante au cours du développement et à l'âge adulte, celle du messenger de la PDE3A peut varier. Pendant le développement postnatal, la PDE3A est fortement exprimée dans le bulbe olfactif, le cerveau antérieur et le cortex, tandis qu'à l'âge adulte, la PDE3A est principalement exprimée dans les neurones matures de l'hippocampe et les ChIN du striatum (Reinhardt and Bondy, 1996). Les PDE3 (A1, A2, A3 et B) diffèrent par leur séquence N-terminale, sur laquelle peuvent se trouver plusieurs domaines hydrophobes faits de structures transmembranaires hélicoïdales (NHR, *N-terminal hydrophobic region*). La présence de ces domaines hydrophobes détermine la localisation cellulaire de la PDE3. Les PDE3A1 et PDE3B contiennent deux domaines NHR (NHR1 et NHR2) et sont donc principalement membranaires, la PDE3A2 contient uniquement le domaine NHR2 et peut être aussi bien membranaire que cytoplasmique, la PDE3A3 ne contenant pas de domaine NHR est uniquement cytoplasmique (Shakur et al., 2001; Wechsler et al., 2002). A l'exception de la PDE3A3, deux sites de phosphorylation par la PKA et un site de phosphorylation par la PKB se trouvent de part et d'autre de ces domaines NHR. La phosphorylation de ces sites favorise la dégradation de l'AMPc par la PDE3 (Shakur et al., 2001; Wechsler et al.,

2002). Il s'agit ainsi d'un mécanisme de rétro-contrôle négatif qui freine l'activation de la voie de signalisation AMPc/PKA. Grâce à sa capacité d'hydrolyse de l'AMPc et du GMPc, la PDE3, comme la PDE2, se trouve à l'interface de ces deux voies de signalisation. Ainsi, les deux seconds messagers se retrouvent en compétition pour le site catalytique de la PDE3. Cette compétition confère probablement un rôle inhibiteur du GMPc sur l'activité catalytique d'hydrolyse de l'AMPc (Maurice and Haslam, 1990). Ainsi, l'activation de la voie NO/GMPc réduit la dégradation de l'AMPc par la PDE3 et est en faveur d'une augmentation des niveaux d'AMPc. Ce mécanisme a notamment été démontré dans les trombocytes du lapin (Maurice and Haslam, 1990) et de la souris (Marcoz et al., 1993), dans les cardiomyocytes (Kirstein et al., 1995; Méry et al., 1993) ainsi que dans des cellules HEK293 à l'aide d'un biosenseur FRET pour l'AMPc fusionnée à la PDE3 (Herget et al., 2008).

1.4 – Les interneurones NOergiques

Les interneurones NOergiques ont un corps cellulaire d'une taille d'environ 20 μm , avec 2 à 5 dendrites primaires (Kawaguchi, 1993). Ils sont caractérisés par l'expression de la NO synthase, du NPY et de la SOM, et sont donc la source de production du monoxyde d'azote (NO) et des peptides NPY et SOM dans le striatum (Chesselet and Graybiel, 1986; Kubota et al., 1993; Smith and Parent, 1986; Vincent et al., 1983). Bien qu'ils soient des interneurones GABAergiques, leur connectivité avec les MSNs et autres neurones striataux est éparsée et faible, laissant supposer un rôle médié par une libération diffuse de NO et une libération des peptides NPY et SOM, plutôt qu'une libération synaptique de GABA (Gittis et al., 2010; Kubota et al., 1993).

1.4.1 – Activité électrique des interneurones NOergiques

Les interneurones NOergiques sont caractérisés par un potentiel membranaire relativement dépolarisé, autour de -56 mV (Gittis et al., 2010; Kawaguchi, 1993). Ils présentent une activité de décharge dite à bas seuil (*low threshold calcium spike*). Cette activité peut parfois être prolongée par un plateau dépolarisant persistant dépendant du sodium. C'est pourquoi ces interneurones sont aussi appelés interneurones PLTS (*persistent and low-threshold spike interneurons*) (Kawaguchi, 1993).

1.4.2 – Modulation de la production du NO

Le NO est un neuromodulateur gazeux, de courte demi-vie biologique, impliqué dans de nombreux processus physiologiques dans le système nerveux central et en périphérie. Le NO peut être synthétisé par trois enzymes NOS : NOS neuronal (nNOS), NOS inductible et la NOS endothéliale (Garthwaite, 2008). Dans le striatum, les interneurones

NOergiques expriment la nNOS dont l'activité dépend du calcium intracellulaire (Bredt et al., 1990; Vincent, 1994). Lors d'une activité synchronisée des fibres corticostriatales, une augmentation du calcium intracellulaire dépendante des récepteurs NMDA active la nNOS et conduit à la libération de NO (Marin et al., 1992; Sammut et al., 2007). L'activation des récepteurs D₁ (D₁/D₅) exprimés par les interneurons NOergiques est également suffisante pour induire une dépolarisation des interneurons NOergiques, une activation de la nNOS et un efflux de NO (Centonze et al., 2002; Sammut et al., 2006). Par ailleurs, une interaction réciproque entre les récepteurs NMDA et D₁ favorise la libération de NO *in vivo* (Park and West, 2009). L'utilisation d'un agoniste du récepteur D₂ (quinpirole) bloque cet effet via un mécanisme indirect, dépendant de l'activité électrique des neurones striataux (Centonze et al., 2002; Hoque et al., 2010). Il semblerait que la libération phasique de dopamine facilite l'activité de la nNOS et l'efflux de NO, tandis que la libération tonique de dopamine empêche la production de NO via les récepteurs D₂ (West and Tseng, 2011). L'effet du récepteur D₂ est probablement un effet indirect puisqu'aucune co-localisation des récepteurs D₂ avec un marqueur des interneurons NOergiques n'a été établie. Cet effet passe probablement par une inhibition des terminaisons synaptiques glutamatergiques et cholinergiques (Lorenc-Koci and Czarnecka, 2013).

1.4.3 – Action du NO sur les MSNs

Le NO diffuse librement au travers des membranes cellulaires et stimule la GC (de Vente and Steinbusch, 1992; Garthwaite and Boulton, 1995). Dans le striatum, les MSNs expriment fortement la GC (Ariano et al., 1982; Ding et al., 2004; Matsuoka et al., 1992). A l'instar de l'AC avec l'AMPC, la GC convertit le GTP (guanosine triphosphate) en GMPC et pyrophosphate. Ainsi, la production de NO par les interneurons NOergiques conduit à une augmentation des niveaux de GMPC dépendante de la GC dans les MSNs (Lin et al., 2010; West et al., 2002; West and Grace, 2004; West and Tseng, 2011). Le GMPC cible majoritairement deux types d'enzymes : la protéine kinase dépendante du GMPC (PKG) et les PDE régulées par le GMPC (PDE2 dans les MSNs, PDE3 exprimée dans les ChIN, et également PDE5 et PDE6 non exprimées dans le striatum). Dans le striatum, la PKG étant faiblement exprimée (El-Husseini et al., 1999, 2002), cela suggère que l'effet physiologique principal du GMPC est la modulation de l'activité de la PDE2 et PDE3. Une étude sur tranche de cerveau de souris a montré que, lors d'une augmentation transitoire d'AMPC induite par une stimulation des AC, le NO réduit l'amplitude de cette réponse dans les MSNs. Cet effet est causé par la stimulation de l'activité de la PDE2A, qui dégrade alors plus efficacement l'AMPC (Polito et al., 2013). Ces observations concordent avec celles réalisées sur cultures primaires de neurones striataux du rat dans

laquelle l'activation de la nNOS par un agoniste D₅ stimule l'activité de la PDE2A (Lin et al., 2010). Ainsi la PDE2A se trouve à l'interface des voies de signalisation NO/GMPc et AMPc/PKA dans les MSNs.

1.4.4 – Action du NO sur les ChIN

Une élégante étude montre que la libération de NO dans le striatum dépolarise les ChIN. Cette action est directe et indépendante des canaux calciques, des canaux sodium sensibles à la tétrodotoxine (TTX), ainsi que de la libération de la dopamine ou du glutamate. Cette dépolarisation est causée par l'activation de la voie GC/GMPc qui active la PKG. De plus, l'inhibition de la PP-1 ou la PP-2A amplifie légèrement la dépolarisation induite par le donneur de NO indiquant que les PP-1 et PP-2A limitent l'action de la PKG activée par le NO (Centonze et al., 2001). De plus, il a récemment été montré que l'action du NO facilite la réponse des ChIN au glutamate (Blomeley et al., 2015).

1.4.5 – Rôle du NO dans les fonctions motrices

Plusieurs études ont montré une implication du NO en faveur des fonctions motrices. L'administration systémique de différents inhibiteurs de la nNOS provoque une catalepsie chez la souris, le rat et le pigeon (Cavas and Navarro, 2002; Del Bel et al., 1998; Jewett et al., 1996; Stewart et al., 1994). La catalepsie est atténuée par l'application systémique de donneurs de NO comme la molsidomine (Krzańcik and Kostowski, 1997; Lorenc-Koci and Czarnecka, 2013) ou le précurseur du NO, L-Arginine (Marras et al., 1995). Les mêmes observations sont faites lors d'application intrastriatale d'inhibiteurs sélectifs et non-sélectifs de la nNOS (Del Bel et al., 2005, 2004). Ces effets sont également reversés par l'application intrastriatale de L-Arginine (Del Bel et al., 2004). Les inhibiteurs de la nNOS atténuent également l'augmentation de l'activité locomotrice induite par des antagonistes des récepteurs NMDA ou des agonistes des récepteurs D₁ (Deutsch et al., 1996; Starr and Starr, 1995). Ces données suggèrent un rôle du NO comme facilitateur de l'activité locomotrice.

1.5 – L'implication du striatum dans la maladie de Parkinson et les dyskinésies associées au traitement par la L-DOPA

Le striatum étant hautement impliqué dans la mise en place de mouvements volontaires et la sélection d'actions, il joue un rôle dans de nombreuses pathologies motrices, comme la maladie de Huntington, l'hyperactivité, les dystonies, le syndrome de Gilles

de la Tourette ou encore la maladie de Parkinson que je développerai dans la suite de cette partie (Albin et al., 1989).

Les dysfonctionnements de ces pathologies diffèrent. Par exemple, la maladie de Huntington est causée par la dégénérescence des MSNs D1 (Miller et al., 2008), la maladie de Parkinson par la dégénérescence des neurones dopaminergiques, le syndrome de Gilles de la Tourette par une réduction des interneurons parvalbumine (Kalanithi et al., 2005). Le fonctionnement global du striatum reposant sur l'intégration des connexions extra- et intra-striatales, un dysfonctionnement global du circuit striatal a été mis en évidence dans chacune de ces maladies (Gittis and Kreitzer, 2012).

La maladie de Parkinson est caractérisée par la dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire compacte conduisant à une diminution des niveaux de dopamine libérée dans le striatum. Pourtant, c'est seulement lorsqu'environ 50 % des afférences dopaminergiques dégèrent et que le niveau striatal de dopamine diminue de 70 % que les premiers symptômes moteurs de la maladie de Parkinson apparaissent (Fearnley and Lees, 1991; Marsden, 1990). Cette expression phénotypique tardive est due aux adaptations striatales qui, dans une certaine mesure, compensent la diminution des niveaux de dopamine. Ces nombreuses adaptations anatomiques et cellulaires se produisent et permettent dans un premier temps de maintenir un fonctionnement du striatum. A terme, lorsque les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson apparaissent et que le diagnostic de la maladie est établi, les patients reçoivent le traitement de référence, le lévodopa. Toutefois, sur le long terme, ces adaptations cellulaires associées au traitement lévodopa conduisent au développement des dyskinésies induites par la L-DOPA (LID). Chez les modèles murins et primates non humains, les LID se développent uniquement lorsque la lésion des neurones dopaminergiques est en moyenne supérieure à 80 - 85 % (Cenci, 2014; Guigoni et al., 2005; Winkler et al., 2002). Toutefois, nous avons observé qu'une lésion sévère (vérifiée par immunomarquage) n'est pas toujours associée au développement des LID lors du traitement. Des observations similaires ont par ailleurs été faites chez les patients parkinsoniens (Hong et al., 2014; Manson et al., 2012).

Dans ce prochain chapitre, je développerai les adaptations anatomiques et cellulaires du striatum dans la maladie de Parkinson et les LID.

1.5.1 – Les traitements actuels

Plusieurs traitements sont utilisés de nos jours pour traiter les symptômes de la maladie de Parkinson en ciblant principalement le système dopaminergique.

1.5.1.1 – Le lévodopa : traitement de référence

La L-DOPA, aussi appelée lévodopa, constitue le traitement de référence de la maladie de Parkinson et permet de traiter les tremblements et les bradykinésies. La L-DOPA est un précurseur de la dopamine (et également de la noradrénaline et adrénaline) capable de traverser la barrière hématoencéphalique. Ainsi, la L-DOPA est administrée par prise orale plusieurs fois par jour. Ce traitement est combiné au carbidopa qui inhibe la dopadécarboxylase périphérique et diminue ainsi la dégradation périphérique de la L-DOPA.

La conversion de la L-DOPA en dopamine se fait par la dopadécarboxylase, une enzyme principalement exprimée par les neurones cathécholaminergiques et sérotoninergiques (Andén et al., 1964). Ces neurones expriment également le transporteur VMAT2 responsable du transporteur des monoamines (dont la dopamine) dans les vésicules synaptiques. Seuls les neurones dopaminergiques et sérotonergiques ont été mis en cause dans la libération de dopamine dérivée du lévodopa, principalement car les neurones noradrénergiques transforment la dopamine obtenue à partir du lévodopa en noradrénaline (Cenci, 2014). Le traitement L-DOPA permet de restaurer les niveaux de dopamine et ainsi contrer les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson. D'ailleurs, une étude a montré par microdialyse que les niveaux extracellulaires de dopamine après traitement L-DOPA sont significativement plus élevés dans l'hémisphère de rats lésés comparé à des rats sans lésion (Abercrombie et al., 1990). La même étude a par ailleurs montré que les niveaux de dopamine chez les rats sans lésion étaient augmentés lors de l'inhibition des transporteurs DATs jusqu'à atteindre le même niveau que celui des rats lésés (Abercrombie et al., 1990). Ces résultats ont été complétés par une étude montrant par PETscan (tomographie par émission de positrons) une corrélation négative entre le niveau extracellulaire de dopamine lors du traitement L-DOPA et le niveau des transporteurs DAT, uniquement lorsque la perte des neurones dopaminergiques est inférieure à 90% (Sossi et al., 2009). La dopamine extracellulaire en excès est effectivement recapturée par les transporteurs DATs exprimés par les neurones dopaminergiques encore présents dans le striatum. Dans ces conditions, le traitement L-DOPA est efficace et permet de restaurer, voire augmenter, les niveaux extracellulaires de dopamine.

La dopamine libérée par les neurones sérotoninergiques est considérée comme un « neurotransmetteur faux ». L'implication des neurones sérotoninergiques dans la libération de dopamine dérivée du lévodopa a été mise en évidence par Tanaka et al (Tanaka et al., 1999). Dans un modèle de rat présentant une lésion des neurones dopaminergiques et sérotoninergiques, la libération de dopamine suite au traitement L-DOPA est réduite de 80 % en comparaison avec les rats présentant uniquement la lésion

dopaminergique (Tanaka et al., 1999). Cela signifie que plus la dégénérescence des neurones dopaminergiques progresse, plus la dopamine extracellulaire provient d'une libération par les neurones sérotoninergiques. Or, l'activité électrique des neurones sérotoninergiques et l'anatomie de leur arbre axonal sont différentes des neurones dopaminergiques. De plus, aucun feedback négatif médié par la dopamine ne peut agir comme rétrocontrôle négatif de ces neurones sérotoninergiques. Cela conduit donc à une libération de dopamine aberrante, qui est de plus en plus importante avec l'évolution de la maladie. Ce phénomène entre notamment en jeu dans le développement des LID.

La limite majeure du traitement à la L-DOPA réside dans la réduction temporelle de la fenêtre thérapeutique pendant laquelle le traitement est efficace contre les symptômes moteurs (figure 13). Au fur et à mesure des prises répétées quotidiennes de L-DOPA, des épisodes dits « off » correspondent à un taux plasmatique de lévodopa trop faible et à l'expression des tremblements et bradykinésies. A l'inverse, lorsque le taux plasmatique de lévodopa est trop élevé, des dyskinésies s'expriment pendant des épisodes dits « on ». Le développement des dyskinésies apparaissent chez environ 30 % des patients traités à la L-DOPA depuis 4 à 6 ans, puis 90 % après 9 ans de traitement (Ahlskog and Muentner, 2001) et affectent grandement la qualité de vie des patients.

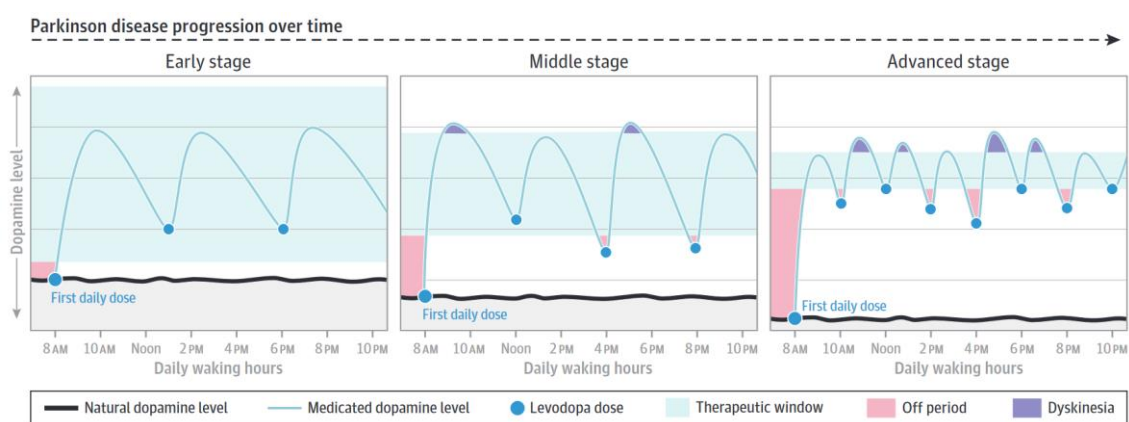


Figure 13 : Interaction entre la dose de levodopa, les épisodes « off » et les LID (figure reprise d'Armstrong et al. 2020). La fréquence de prise du lévodopa est conseillée en début de traitement à trois fois par jour, ce qui assure une concentration adéquat de dopamine au fil de la journée (*early stage*). Au fur et à mesure de la progression de la maladie de Parkinson, des doses plus élevées et plus fréquentes sont requises pour maintenir un niveau suffisant de dopamine au cours de la journée. La fenêtre thérapeutique diminue au cours de l'évolution de la maladie de Parkinson (zone bleue). Les LID se développent au moment où la concentration cérébrale en lévodopa est maximale (zone violette). A l'inverse, lorsque la concentration de lévodopa est au minimum, des périodes « off » apparaissent, pendant lesquelles le traitement n'est pas efficace (zone rose) (Armstrong and Okun, 2020).

Pour contrer ces fluctuations motrices, un système de distribution du lévodopa/carbidopa par une pompe entérale a été développé. Ce système délivre des doses plus faibles de manière plus régulières et permet ainsi de diminuer les fluctuations plasmatiques en lévodopa et d'améliorer la qualité de vie des patients (Virhammar and Nyholm, 2017).

1.5.1.2 – Autres traitements médicamenteux

Plusieurs agents pharmacologiques ciblant le système dopaminergiques sont utilisés, principalement lorsque le traitement lévodopa ne conduit pas à une amélioration suffisante des symptômes moteurs ou en complément du traitement lévodopa pour améliorer son efficacité. Des inhibiteurs des enzymes qui dégradent la dopamine (inhibiteurs des MAO-B (monoamine oxidase B) et COMT (catechol-O-methyl transferase)) permettent de prolonger l'efficacité du lévodopa.

Les pompes à apomorphine, un agoniste de la dopamine, sont principalement utilisées dans des cas avancés de la maladie de Parkinson pour réduire les fluctuations motrices et les dyskinésies (Katzenschlager et al., 2005). Ce traitement constitue une alternative pour les patients non éligibles à la stimulation cérébrale profonde.

D'autres traitements ciblent le système cholinergique. Les traitements anticholinergiques sont majoritairement des antagonistes des récepteurs M₄ et empêchent ainsi l'action de l'acétylcholine. Les traitements anticholinergiques constituent l'un des premiers traitements utilisés avant le développement du lévodopa. Ils sont encore utilisés pour traiter les tremblements, mais semblent moins efficace contre les rigidités musculaires et bradykinésies.

L'amantadine est également régulièrement utilisée pour limiter les dyskinésies. Cet agent pharmacologique est un antagoniste des récepteurs NMDA et semble également agir sur la dopamine en bloquant la recapture de la dopamine.

1.5.1.3 – La stimulation cérébrale profonde et l'échographie focalisée guidée par résonance magnétique

La stimulation cérébrale profonde consiste en l'implantation de deux électrodes permettant la stimulation des noyaux subthalamiques ou du globus pallidus interne. Cette technique permet une stimulation continue et évite ainsi les fluctuations (Chiken and Nambu, 2014). La stimulation cérébrale profonde est une technique nécessitant une intervention chirurgicale. C'est pourquoi elle est généralement proposée lorsque le traitement lévodopa ne permet pas de traiter les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson.

Plus récemment, l'échographie focalisée guidée par résonance magnétique (MRgFUS, Magnetic resonance-guided focused ultrasound) est une technique non invasive qui permet l'ablation du tractus entre le thalamus et le globus pallidus interne. Cette technique réduit immédiatement les tremblements chez les patients parkinsoniens (Schlesinger et al., 2017).

1.5.2 – Adaptations dans la maladie de Parkinson et les LID

La dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques et de leurs projections striatales conduit à une modification des niveaux de dopamine libérés de manière volumique dans le striatum. Toutefois, les premiers symptômes de la maladie de Parkinson se développent seulement lorsque la dégénérescence des afférences striatales atteint les 70 à 80 % de mort neuronale. De nombreuses adaptations pré- et postsynaptiques compensent dans un premier temps la mort des neurones dopaminergiques. Dans la suite de cette partie, je vais d'abord développer les adaptations présynaptiques, plus particulièrement les changements de la libération tonique et phasique de dopamine. Ensuite, je développerai les adaptations postsynaptiques des MSNs, ChIN et interneurons NOergiques impliquées dans cette phase présymptomatique.

1.5.2.1 – Transmission volumique de dopamine

Dans les modèles présymptomatiques de la maladie de Parkinson présentant une neurodégénérescence inférieure à 80 %, les mesures par microdialyse montrent une concentration extracellulaire de dopamine similaire entre le modèle de rat Parkinsonien et le modèle contrôle (Abercrombie et al., 1990; Parsons et al., 1991; Robinson et al., 1994). Des adaptations présynaptiques permettent un maintien des niveaux tonique de dopamine. Un premier modèle établi par Zigmond et al. montre que ce maintien des niveaux de dopamine est causé par une augmentation de la production et libération de dopamine par les neurones dopaminergiques restants, combinée à une diminution de la recapture par les transporteurs présynaptiques à la dopamine (Agid et al., 1973; Bezard and Gross, 1998; Zigmond, 1997; Zigmond et al., 1992, 1990). Ainsi la transmission volumique de dopamine peut se faire dans une zone élargie par diffusion de la dopamine dans des zones affectées par la dégénérescence des afférences dopaminergiques. L'utilisation de la voltamétrie cyclique à balayage rapide (*fast-scan cyclic voltammetry*) a permis d'améliorer la résolution temporelle de ces mesures et d'étudier séparément les mécanismes de libération et de recapture de la dopamine. Ainsi un nouveau modèle de « stabilisation passive » a émergé (Bergstrom and Garris, 2003). En effet, la recapture de la dopamine se fait principalement par les afférences dopaminergiques. Ainsi, la perte des afférences dopaminergiques conduit à une

réduction de la libération et de la recapture de la dopamine dans des proportions similaires, conduisant ainsi à un maintien des niveaux de dopamine (Bergstrom and Garris, 2003; Bezard et al., 2000; Dentresangle et al., 2001; Garris et al., 1997). Ce modèle est cohérent avec une absence de modification de l'activité tonique des neurones dopaminergiques restants (Hollerman and Grace, 1990). A l'inverse, lors d'une activité phasique des neurones dopaminergiques restants, les niveaux extracellulaires de dopamine sont diminués dans la phase présymptomatique de la maladie de Parkinson en comparaison au modèle contrôle (Garris et al., 1997). Une observation similaire a été faite dans un modèle animal de déplétion en dopamine produite par la métamphétamine (Howard et al., 2013, 2011). En effet, la libération phasique conduit à une forte augmentation de la concentration extracellulaire en dopamine, suffisante pour saturer le mécanisme de recapture (Dentresangle et al., 2001; Garris et al., 1997). Ce modèle de stabilisation passive a été confirmé *in silico* (Navntoft and Dreyer, 2016). Par ailleurs, l'absence de symptôme, malgré une diminution progressive des niveaux de dopamine phasique, est possible grâce à mécanismes d'adaptations postsynaptiques (Navntoft and Dreyer, 2016).

1.5.2.2 – Adaptations morphologiques, électrophysiologiques et biochimiques des MSNs

Aussi bien les MSNs D1 que les MSNs D2 sont affectées par cette neurodégénérescence. Suite à la diminution des niveaux de dopamine, les MSNs présentent des changements morphologiques, électrophysiologiques et biochimiques (Albin et al., 1989; Bezard et al., 2001; Day et al., 2006; DeLong, 1990; Fieblinger et al., 2014; Mallet et al., 2006; McNeill et al., 1988; Stephens et al., 2005).

1.5.2.2.1 – Adaptations morphologiques des MSNs

Chez les patients Parkinsoniens, les primates non humains et les modèles murin de la maladie de Parkinson, la longueur des dendrites et la densité des épines dendritiques des MSNs sont réduites (Ingham et al., 1989; McNeill et al., 1988; Smith et al., 2009; Stephens et al., 2005; Villalba et al., 2009; Zaja-Milatovic et al., 2005). Cette réduction est progressive et corrélée à la perte progressive des neurones dopaminergiques (Smith et al., 2009; Villalba et al., 2009; Zaja-Milatovic et al., 2005). L'utilisation des souris transgéniques BAC a permis d'étudier spécifiquement les changements morphologiques des MSNs D1 et des MSN D2 dans des modèles animaux de la maladie de Parkinson. Dans des modèles tardifs de la maladie de Parkinson, la complexité de l'arbre dendritique des MSNs D1 et D2 est significativement réduite. La longueur dendritique ainsi que le nombre de ramifications proximales et distales et le nombre de dendrites primaires sont significativement réduits (Fieblinger et al., 2018, 2014; Gagnon et al., 2017). Ces altérations ne sont pas corrigées par le traitement L-DOPA. Toutefois, dans

un modèle réversible de la maladie de Parkinson (modèle primate non humain traité au MPTP (1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)), la régénération des afférences dopaminergiques après l'arrêt du traitement conduit à une normalisation de la complexité de l'arbre dendritique des MSNs (Witzig et al., 2020). La réduction de la complexité de l'arbre dendritique est donc réversible et dépendante des afférences dopaminergiques mais pas de la libération de dopamine. La dégénérescence des neurones dopaminergiques induit également une réduction de la densité des épines dendritiques dans les MSNs D2 (Fieblinger et al., 2018, 2014; Nishijima et al., 2014). Celle-ci est corrigée par le traitement à la L-DOPA (Fieblinger et al., 2014). Dans les MSNs D1, différentes études montrent des résultats contradictoires en fonction du modèle de la maladie de Parkinson utilisé. Dans des modèles de lésion partielle ou chronique de la maladie de Parkinson, une réduction de la densité des épines est mesurée (Gagnon et al., 2017; Suarez et al., 2018; Suárez et al., 2014; Villalba et al., 2009; Zaja-Milatovic et al., 2005). Dans le modèle induisant une lésion complète des afférences dopaminergiques, la densité des épines dendritiques des MSNs D1 est inchangée (3 à 4 semaines après la lésion) (Day et al., 2006; Fieblinger et al., 2014) mais diminuée lors du traitement à la L-DOPA (Fieblinger et al., 2014). Récemment, l'étude de Graves et Surmeier a montré, dans ce même modèle, une diminution des épines dendritiques des MSNs D1 trois mois après la lésion (Graves and Surmeier, 2019). Les modifications de l'arbre dendritique des MSNs D1 et D2 semblent être médiées par des mécanismes différents. De nouvelles études sont toutefois nécessaires (Shen et al., 2022).

1.5.2.2.2 – Adaptations électrophysiologiques des MSNs

L'activité électrique des MSNs est globalement augmentée suite à la neurodégénérescence des afférences dopaminergiques striatales (Alloway and Rebec, 1984; Chen et al., 2001; Schultz and Ungerstedt, 1978). Toutefois, l'étude des changements électrophysiologiques des MSNs D1 et D2 a mené à des résultats contradictoires. Certaines études ont montré *in vivo* chez le rat hémi-parkinsonien anesthésié que l'activité électrique des MSNs D1 est réduite, tandis que celle des MSNs D2 est augmentée (Mallet et al., 2006). Sachant que l'activation des MSNs D1 et D2 est, respectivement, en faveur et défaveur du mouvement, ces résultats peuvent expliquer le développement des akinésies dans la maladie de Parkinson. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* chez la souris lésée par imagerie calcique et optogénétique quand l'animal est immobile (Parker et al., 2018; Ryan et al., 2018). Lors d'une mise en mouvement, les MSNs D2 présentent une activité inchangée par rapport aux animaux contrôles, tandis que les MSNs D1 maintiennent une activité réduite (Parker et al., 2018; Ryan et al., 2018). Une étude a par ailleurs montré que l'activation par optogénétique des MSNs D1 réduit les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson (Kravitz et al., 2010). Ces résultats s'opposent à ceux de d'autres études, où, respectivement, une

augmentation et réduction de l'activité électrique des MSNs D1 et D2 a été mise en évidence (Day et al., 2006; Fieblinger et al., 2018, 2014; Graves and Surmeier, 2019). Ainsi, Surmeier et al. propose un modèle où les MSNs compensent la perte de dopamine permettant de normaliser leur activité électrique et maintenir le fonctionnement du striatum : les MSNs D1, devenus hypo-excitables par la perte de la signalisation des récepteurs D₁, compensent en augmentant leur activité électrique, et inversement dans les MSNs D2 (Shen et al., 2022). Ces résultats ont été partiellement confirmés dans d'autres équipes, qui ont montré uniquement une augmentation de l'activité électrique des MSNs D1, mais aucun changement dans les MSNs D2 (Ketzer et al., 2017; Maurice et al., 2015). Ces divergences pourraient être dues aux modèles animaux de la maladie de Parkinson : toutes ces études ont induit la maladie de Parkinson par l'injection d'une toxine (la 6-hydroxydopamine, 6-OHDA) dans différentes zones du système nigrostrié. D'une part, ces modèles sont sévères et non progressifs, à l'inverse de la maladie de Parkinson. D'autre part, en fonction de la zone d'injection et de la durée post-lésionnelle à laquelle ont été conduites les expériences, les adaptations des MSNs semblent être différentes (Maurice et al., 2015; Shen et al., 2022; Zhai et al., 2019). De plus, l'activité électrique des MSNs est également influencée par l'activité des interneurons du striatum. Bien que les altérations de l'activité électrique des ChIN dans les modèles murin de la maladie de Parkinson demeurent controversées (Choi et al., 2020; Ding et al., 2006; Maurice et al., 2015; McKinley et al., 2019), la lésion des neurones dopaminergiques affectent l'effet de l'ACh sur les MSNs D1 (Laverne et al., 2022). En effet, l'inhibition des ChIN par optogénétique réduit les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson (Maurice et al., 2015; Ztaou et al., 2016). Cet effet passe notamment par une potentiation de la transmission synaptique des MSNs D1, en levant l'inhibition de la PKA médiée par le récepteur M4 (Laverne et al., 2022).

Lors du traitement L-DOPA et des dyskinésies, les MSNs subissent à nouveau des adaptations : l'activité électrique des MSNs D1 est significativement supérieure aux animaux contrôle, et celle des MSN D2 est réduite (Alcacer et al., 2017; Fieblinger et al., 2014; Parker et al., 2018; Ryan et al., 2018). L'effet du traitement L-DOPA sur l'activité électrique est notamment médié par les récepteurs à la dopamine de type D₁ et D₂. En effet, l'utilisation d'un agoniste des récepteurs D₁ ou des récepteurs D₂ conduit à une régulation bidirectionnelle des MSNs. La voie directe semble par ailleurs particulièrement impliquée dans le développement des LID. Effectivement, l'agoniste des récepteurs D₁ conduit à des dyskinésies similaires à celles causées par le traitement L-DOPA, tandis que l'agoniste des récepteurs D₂ produit des dyskinésies de moindre importance (Ryan et al., 2018). Par ailleurs, seule une sous-population des MSNs D1 semble être responsable de l'expression des LID et présente une activité électrique supérieure aux autres MSNs uniquement pendant l'expression des dyskinésies (Ryan et

al., 2018). Une élégante étude combinant l'optogénétique et les cellules TRAP (*targeted recombination in active populations*) a montré un taux de décharge excessif chez une fraction (environ 20%) des MSNs D1 lors de l'expression des LID. Sans traitement L-DOPA, la réactivation par optogénétique de cette sous-population de MSNs D1 est suffisante pour induire l'expression des dyskinésies. De plus, la sévérité des LID est corrélée au nombre de cellules de cette sous-population (Girasole et al., 2018).

1.5.2.3 – Adaptations biochimiques des MSNs dans la maladie de Parkinson et les LID

1.5.2.3.1 – Hypersensibilité des MSNs D1 dans la maladie de Parkinson

De nombreux changements adaptatifs au cours de la maladie de Parkinson ont été observés au niveau de la signalisation intracellulaire des MSNs. Suite à une lésion des afférences dopaminergiques, l'expression des gènes des MSNs D1 et D2 est notamment affectée de manière opposée. Les messagers pour l'enképhaline et le récepteur D₂ sont augmentés dans les MSNs D2 tandis que les messagers pour le récepteur D₁, la substance P et la dynorphine sont diminués dans les MSNs D1 (Gerfen et al., 1991, 1990; Pavón et al., 2006; Young et al., 1986). Chez l'humain et les modèles murins de la maladie de Parkinson, l'augmentation du message pour le récepteur D₂ est corrélée à une augmentation de la protéine (Beresford et al., 1988; Hurley et al., 2001; Savasta et al., 1988). Concernant le récepteur D₁, aucune modification d'expression n'a été démontrée par analyse autoradiographique (Beresford et al., 1988; Hurley et al., 2001; Savasta et al., 1988). Il n'est pas à exclure que le nombre de récepteurs adressés à la membrane cytosolique soit altéré. Suite à la lésion des neurones dopaminergiques, les MSNs D1 développent une hypersensibilité à la dopamine (Pifl et al., 1992b, 1992a; Ungerstedt, 1971). Cette hypersensibilité permet le maintien de l'équilibre homéostatique par compensation de la diminution des niveaux de dopamine et retarde ainsi l'apparition des premiers symptômes de la maladie. Elle n'est toutefois plus suffisante lorsque la neurodégénérescence est trop importante et que les niveaux de dopamine sont trop faibles.

Plusieurs adaptations en aval du récepteur D₁ ont été mises en évidence et expliquent l'hypersensibilité des MSNs D1 en réponse à la déplétion des neurones dopaminergiques. Une augmentation de la protéine G_{oif} mènent à un couplage exacerbé entre le récepteur D₁ et la protéine G (Alcacer et al., 2012; Corvol, 2004; Herve et al., 1989; Hervé et al., 1993). Ce couplage accru est également renforcé par une augmentation de l'activité de l'AC5 (Rangel-Barajas et al., 2011). L'imagerie ratiométrique de biosenseurs FRET a montré, *ex vivo* et *in vivo*, une augmentation de l'activité de la PKA exclusivement dans les MSNs D1 dans le modèle murin de la maladie de Parkinson (Jones-Tabah et al., 2020; Mariani et al., 2019). Pourtant, certaines cibles de la PKA, telles que la DARPP-32 (sur son site Thr34) ou le récepteur AMPA (sur la sous unité GluA1), ne sont pas hyperphosphorylés (Lebel et al., 2010; Santini et al., 2007;

Sugiyama et al., 2021). Egalement, il n'y a pas d'augmentation de l'expression de c-fos, un gène précoce immédiat (*immediate early gene*, IEG) dont l'expression est dépendante de la phosphorylation de CREB par la PKA (Lebel et al., 2010).

1.5.2.3.2 – Sur-activation des MSNs D1 associée au développement des LID

L'hypersensibilité des MSNs D1 combinée à un traitement chronique de L-DOPA conduit au développement des LID. En effet, l'utilisation d'un agoniste des récepteurs D₁ conduit à une expression des gènes précoces immédiats (*immediate early gene*, IEG) tel que c-fos, tandis qu'aucune modification n'est observée en l'absence d'une lésion dopaminergique (Gerfen, 2003; Robertson et al., 1990). De plus, la transcription de plusieurs messagers est altérée : les messagers de la prodynorphine dans les MSNs D1 et de l'enképhaline dans les MSNs D2 sont augmentés et leur augmentation est positivement corrélée avec la sévérité des dyskinésies (Cenci et al., 1998; Henry et al., 2003; Lundblad et al., 2004; Moratalla et al., 1996; Pavón et al., 2006).

Plusieurs études ont mis en évidence la corrélation entre la sévérité des LID et une activation accrue de la voie AMPc/PKA dans les MSNs D1 spécifiquement. Le développement des LID est associé à une augmentation de l'expression de l'ARNm du récepteur D₁ et une augmentation de la sensibilité de ces récepteurs (la sensibilité du récepteur étant définie par les auteurs comme la capacité du récepteur à activer les protéines G après liaison d'un agoniste) (Aubert et al., 2005). L'expression de la protéine G_{olf}, surexprimée suite à la lésion des neurones dopaminergiques, est réduite lors du traitement des LID, mais demeure supérieure aux souris non lésées (Alcacer et al., 2012; Corvol, 2004; Morigaki et al., 2017; Rangel-Barajas et al., 2011). Le développement des LID est également associé à une phosphorylation accrue de la DARPP-32 sur la Thr34 (Alcacer et al., 2012; Aubert et al., 2005; Bateup et al., 2010; Lebel et al., 2010; Sugiyama et al., 2021) et de la sous-unité GluA1 des récepteurs AMPA (Alcacer et al., 2012; Sugiyama et al., 2021), cibles de la PKA. Une étude conduite chez un modèle primate non humain de la maladie de Parkinson a montré que l'induction d'une surexpression de Δ fosB, sans traitement L-DOPA, est suffisante pour induire des LID (Andersson et al., 1999). Une augmentation de l'expression de ce facteur de transcription fosB/ Δ fosB a été reportée chez les modèles murins dyskinétiques (Andersson et al., 1999; Beck et al., 2019; Darmopil et al., 2009; Feyder et al., 2016; Lebel et al., 2010; Lundblad et al., 2004; Pavón et al., 2006). Cette altération est présente particulièrement dans les MSNs D1 et une fraction des interneurons NOergiques (Cenci et al., 1999; Pavón et al., 2006). Une étude récente a montré plus particulièrement une augmentation de l'expression de fosB/ Δ fosB chez une sous population des MSNs D1 présentant une repousse dendritique et une réduction d'excitabilité suite au traitement à la L-DOPA (Fieblinger et al., 2018). L'ensemble de ces études démontre une suractivation de la voie AMPc/PKA, suggérant qu'une réduction de cette voie de signalisation pourrait réduire les LID. Pour vérifier cela, des modèles de souris KO ont été générés. Chez un modèle de souris Parkinson KO pour le récepteur D₁, le traitement à la L-DOPA ne conduit pas au développement de

dyskinésies (Darmopil et al., 2009). Chez les souris KO pour la DARPP-32 spécifiquement dans les MSNs D1, les LID sont significativement réduites par rapport aux souris *wild-type* (Bateup et al., 2010). Enfin, l'application d'un inhibiteur de la PKA par injection intra-striatale réduit la sévérité des LID lors du traitement à la L-DOPA (Lebel et al., 2010).

Une corrélation entre la sévérité des LID et une augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2 a également été mise en évidence dans les MSNs D1 (Alcacer et al., 2012; Lebel et al., 2010; Pavón et al., 2006; Santini et al., 2009, 2007; Sugiyama et al., 2021; Westin et al., 2007). L'augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2 conduit à une augmentation de l'activation des cibles d'ERK, comme la kinase MSK1 (*mitogen- and stress-activated kinase 1*) qui phosphoryle CREB. Chez la souris KO pour MSK1, les LID sont réduites (Feyder et al., 2016). Cependant, MSK1 étant en aval de la cascade, la délétion du gène n'empêche pas une sur-activation de la voie AMPc/PKA et d'ERK1/2, expliquant une faible expression des LID. D'autres études ont montré que la phosphorylation d'ERK1/2 résulte d'une sur-activation de la voie AMPc/PKA. Chez le modèle de souris KO pour le récepteur D₁ et KO pour la DARPP-32, l'absence et la réduction des LID sont associées à une absence et réduction de la phosphorylation d'ERK1/2, respectivement (Darmopil et al., 2009; Santini et al., 2007). Le développement d'une souris hétérozygote KO pour la protéine G_{olf} *Gnal*^{+/-} a permis d'étudier les LID dans un modèle présentant une réduction de l'activité de la voie AMPc/PKA (Corvol et al., 2007, 2001). Comme chez les souris WT, une lésion du système dopaminergique et un traitement chronique de L-DOPA chez le modèle *Gnal*^{+/-} conduit au développement des LID (Alcacer et al., 2012). Cependant, une diminution de phosphorylation de la DARPP-32 est observée chez le modèle *Gnal*^{+/-} lésé, tandis que le taux de phosphorylation d'ERK1/2 demeure supérieure à celui des souris non lésées. La diminution de la phosphorylation de la DARPP-32 n'est pas suffisante pour permettre une réduction du taux de phosphorylation d'ERK1/2, suggérant qu'un faible taux de DARPP-32 phosphorylée suffit pour permettre la phosphorylation d'ERK1/2 (Alcacer et al., 2012). La phosphorylation d'ERK1/2 est donc dépendante de l'activation du récepteur D₁ et de l'activation accrue de la voie AMPc/PKA.

L'utilisation *in vivo* de l'imagerie ratiométrique de biosenseurs FRET a permis récemment d'étudier l'activité de la PKA et les niveaux de phosphorylation d'ERK1/2 au cours de la vie d'un même animal, de l'état Parkinsonien (lésion des neurones dopaminergiques) à l'état dyskinétique (lésion des neurones dopaminergiques et traitement chronique à la L-DOPA) (Jones-Tabah et al., 2020). Cette étude a confirmé une activité accrue de la PKA et d'ERK1/2 dans l'état Parkinsonien et l'état dyskinétique en comparaison aux souris non lésées. Toutefois, le traitement chronique à la L-DOPA conduit à une réduction de l'activité de la PKA et d'ERK1/2, malgré une augmentation de l'expression des dyskinésies au cours du temps. Le traitement chronique à la L-DOPA semble donc reversé partiellement l'hypersensibilité des récepteurs D₁ à l'état

Parkinsonien. Cependant, le traitement chronique conduit également à une sur-activation de la voie PKA et ERK1/2 et donc à un meilleur couplage entre l'activation du récepteur D₁ et l'induction des LID (Jones-Tabah et al., 2020).

1.5.2.3.3 – Implication des MSNs D2 dans les LID

Bien que plusieurs évidences impliquent hautement les MSNs D1 dans les altérations motrices de la maladie de Parkinson et les LID, les MSNs D2 sont également essentiels au fonctionnement du striatum. Leurs altérations suite à la lésion dopaminergique et au traitement à la L-DOPA sont cependant beaucoup moins connues. Plusieurs raisons peuvent expliquer ce manque de littératures. Tout d'abord, dans le striatum, les récepteurs à la dopamine D₂ sont exprimés dans de nombreux types cellulaires (dans les MSNs D2, mais également dans les ChIN et les afférences dopaminergiques), rendant leur étude plus complexe. De plus, contrairement au modèle de souris KO pour le récepteur D₁, le modèle de souris KO pour le récepteur D₂ ou le récepteur A_{2A} n'empêche pas le développement des LID (Darmopil et al., 2009; Florio et al., 2022; Fredduzzi et al., 2002).

Dans un modèle de souris KO pour le récepteur D₂, une augmentation de l'expression de gènes liés à la voie AMPc est observée (ADCY5 codant pour l'AC5, GNAL codant pour la sous unité α de G_{olf}, GNG7 codant pour la sous unité γ 7 de la protéine G, ainsi PDE10A, PDE7B et PDE1B) (Florio et al., 2022). Cette altération n'est pas rétablie lors du traitement à la L-DOPA (Florio et al., 2022). De plus, le traitement L-DOPA (15 mg/kg) exacerbe l'expression des LID chez le modèle KO et conduit également à une augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2 et de l'expression de c-fos, deux marqueurs de la sévérité des LID. L'activation de la voie de signalisation dépendante du récepteur D₂ semble donc réduire l'expression des LID. Toutefois, il est important de noter que seule une dose supérieure à 6 mg/kg induit une exacerbation des LID. Ces résultats sont cohérents avec une étude montrant que le traitement L-DOPA (25mg/kg) rétablit la densité des épines dendritiques exclusivement dans les MSNs D2 (Suárez et al., 2014). Cela suggère un mécanisme dépendant du récepteur D₂ dans les MSNs D2 qui, au-delà d'un seuil critique de dopamine, permet de réduire les LID.

A l'inverse, dans un modèle murin KO pour le récepteur A_{2A} et indépendamment de la dose de L-DOPA, l'expression des LID est similaire au modèle murin wild-type pendant les premiers jours de traitement. Toutefois, au cours du traitement, l'expression des LID diminue jusqu'à retourner au niveau de base du premier jour de traitement (Fredduzzi et al., 2002). Le récepteur A_{2A} semble donc être impliqué dans le maintien des LID au cours du temps.

1.5.2.4 – Altérations de la voie NO/GMPc

Plusieurs études ont mis en avant une implication des interneurones NOergiques et de la voie NO/GMPc dans la maladie de Parkinson et les LID. L'étude post-mortem de tissus de patients Parkinsoniens montre une réduction du messenger de la nNOS (Eve et al., 1998) associée à une réduction du nombre de neurones produisant le NO (Böckelmann et al., 1994). Ces données sont cohérentes avec celles obtenues chez les modèles de rats avec une lésion sévère des neurones dopaminergiques, qui présentent une diminution de l'expression de la nNOS associée à une diminution des niveaux de GMPc (Sancesario et al., 2004). Cependant, d'autres études réalisées chez la souris traitée au MPTP montrent une augmentation du messenger de la nNOS, du niveau de protéine et de son activité (Chalimoniuk and Langfort, 2007). Ce même modèle présente également une augmentation de l'expression de la GC et plus particulièrement une augmentation de la sous unité GC β 1 (Chalimoniuk et al., 2004). Dans ces deux études, les altérations observées sont corrélées à une augmentation des niveaux de GMPc (Chalimoniuk et al., 2004; Chalimoniuk and Langfort, 2007). Plus récemment, Tseng et al. ont montré une augmentation des niveaux de GMPc chez un modèle de rat avec une lésion sévère et chez un modèle de souris avec une lésion chronique (Tseng et al., 2011). L'inhibition pharmacologique de la GC et donc la diminution des niveaux de GMPc présente par ailleurs un effet anti-akinétique (Tseng et al., 2011). Dans toutes ces études, l'évaluation des niveaux de GMPc a été réalisée avec un test similaire (test ELISA) et le type de lésion ne semble pas expliquer ces divergences. Ces résultats montrent la complexité de la voie de signalisation nNOS/NO/GMPc et ses interactions au sein du striatum.

Lors du traitement à la L-DOPA et l'expression des LID, une sur-activation de la voie NO/GMPc est également mise en évidence. 15 % des interneurones NOergiques expriment la protéine fosB/ Δ fosB, un marqueur des LID (Pavón et al., 2006). Chalimoniuk et Langfort ont montré une augmentation de l'expression de la nNOS ainsi que de la sous-unité GC β 1 associée à une augmentation des niveaux de GMPc (Chalimoniuk and Langfort, 2007). Ces résultats sont cohérents avec une étude montrant une augmentation des niveaux de GMPc dans le sérum de patients Parkinsoniens (Chalimoniuk and Stepień, 2004). De plus, une augmentation de la production de NO a été mise en évidence suite au traitement à la L-DOPA (Itokawa et al., 2006). L'expression des LID est associée à une sur-activation de la voie nNOS/NO/GMPc. D'ailleurs, les inhibiteurs de la nNOS (les inhibiteurs 7-NI (7-nitroindazole) et nitroarginine) présentent un effet anti-dyskinétique tout en conservant l'efficacité de traitement L-DOPA (Padovan-Neto et al., 2009; Fernando Eduardo Padovan-Neto et al., 2015; Solís et al., 2015; Takuma et al., 2012). L'utilisation du 7-NI réduit également la surexpression de la nNOS, l'expression de fosB/ Δ fosB et la

phosphorylation de la DARPP-32, d'ERK/1/2 et de la sous unité GluA1, trois autres marqueurs des LID (Fernando Eduardo Padovan-Neto et al., 2015; Solís et al., 2015; Takuma et al., 2012). La réduction de l'activité de la nNOS et de la voie NO/GMPc est efficace pour réduire les LID. A l'inverse, la stimulation de la voie NO/GMPc devrait amplifier les LID. Pourtant, deux études montrent que le traitement chronique par un donneur de NO (la molsidomine) conduit à une augmentation des niveaux extracellulaires de dopamine mais, paradoxalement, à une réduction du nombre de rotations contra-latérales à la lésion et des LID (Lorenc-Koci and Czarnecka, 2013; Solís et al., 2015). Il est donc possible de réduire les LID en diminuant l'activité de la nNOS ou en renforçant la production de NO. L'interaction de la voie NO/GMPc avec d'autres voies de signalisation dans le striatum rend la compréhension de la situation complexe. Il est probable que l'effet de l'inhibition de la nNOS et l'effet du donneur de NO soient différents sur l'activité électrique des autres neurones du striatum. Des études complémentaires sont donc primordiales pour élucider le rôle de la voie NO/GMPc dans les LID et ainsi mieux comprendre l'action de ces différentes molécules.

1.5.2.1 – Déséquilibre des niveaux de dopamine et d'acétylcholine

La dégénérescence des neurones dopaminergiques conduit à une dérégulation de l'équilibre des niveaux striataux de dopamine et d'acétylcholine. Les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson résulteraient d'un déséquilibre en faveur de l'acétylcholine (Barbeau, 1962). Par ailleurs, des antagonistes muscariniques ont été le premier traitement pharmacologique pour réduire les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson (Katzenschlager et al., 2003). Leur utilisation a été arrêtée suite aux effets secondaires trop importants et remplacée par l'utilisation de la L-DOPA.

L'effet de la lésion dopaminergique sur l'activité électrique des ChIN demeure toutefois controversé. Tandis que certaines études montrent une diminution de l'excitabilité des ChIN lors d'une lésion progressive ou sévère des neurones dopaminergiques (Choi et al., 2020; McKinley et al., 2019), d'autres études montrent une augmentation de l'excitabilité (Ding et al., 2006; Laverne et al., 2022; Maurice et al., 2015; Sanchez et al., 2011; Tubert et al., 2016). Toutefois, l'inhibition par optogénétique atténue les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson (Maurice et al., 2015; Ztaou et al., 2016) et l'administration systémique ou intrastriatale d'un antagoniste des récepteurs M₁ (telenzepine) ou M₄ (tropicamide) montre également un effet anti-akinétique (Ztaou et al., 2016). Ces résultats mettent ainsi en cause une suractivation des récepteurs muscariniques dans les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson, en partie responsable d'une hypo- et hyperactivation des MSNs D1 et D2, respectivement. Par ailleurs, l'effet anti-akinésique des antagonistes des récepteurs M₁ et M₄ (couplés

respectivement G_q et $G_{i/o}$) montre la complexité du système et suggère un mécanisme d'action différent.

Le traitement chronique à la L-DOPA et le développement des LID sont associés à une augmentation de la fréquence de décharge des ChIN (Choi et al., 2020; Paz et al., 2021) et une augmentation de la phosphorylation d'ERK spécifiquement dans les ChIN (Ding et al., 2011; Florio et al., 2022). D'ailleurs, la délétion des ChIN (après la lésion des neurones dopaminergiques) atténue les LID (Won et al., 2014). À l'inverse, une stimulation des ChIN par optogénétique ou chemogénétique les aggrave (Aldrin-Kirk et al., 2018; Bordia et al., 2016). L'effet de l'activation par optogénétique est supprimé lorsqu'un antagoniste non sélectif des récepteurs muscariniques (atropine) est utilisé (Bordia et al., 2016). Une suractivation des récepteurs muscariniques semble être associée à la sévérité des LID. Pourtant, une étude récente a montré qu'un antagoniste spécifique des récepteurs M_1 ne modifie pas les LID (Florio et al., 2022) tandis qu'un modulateur positif allostérique (PAM, *positive allosteric modulator*) spécifique des récepteurs M_4 les atténue (Florio et al., 2022; Shen et al., 2015), et leur utilisation combinée présente un effet synergique dans l'atténuation des LID (Florio et al., 2022). Sachant que les récepteurs M_4 sont couplés négativement à la voie AMPc/PKA et qu'une activité accrue de la voie AMPc/PKA dans les MSNs D1 est associée aux LID, le PAM des récepteurs M_4 cible probablement les MSNs D1. Ces résultats montrent la complexité du striatum et l'importance de la temporalité des réponses dopaminergiques et cholinergiques. La lésion des neurones dopaminergiques et le traitement chronique à la L-DOPA perturbent cette temporalité, conduisant à une dérégulation de la voie AMPc/PKA dans les MSNs D1 et D2.

1.5.2.2 – Implication des phosphodiésterases dans la maladie de Parkinson et les LID

Les altérations de la voie AMPc/PKA et NO/GMPc dans la maladie de Parkinson et les LID résultent d'une altération des niveaux des deux seconds messagers. Or, comme décrit précédemment (*cf.* 1.2.4 – Les phosphodiésterases), les PDE, en hydrolysant l'AMPc et/ou le GMPc, ont un rôle primordial dans l'équilibre de ces voies de signalisation. Parmi celles exprimées dans le striatum, les études ont mis en évidence le rôle des PDE1B et PDE10A dans la maladie de Parkinson et les dyskinésies.

Dans un modèle de souris avec une lésion sévère de la maladie de Parkinson, une diminution des niveaux de GMPc est causée par une diminution de l'expression de la nNOS mais également par une augmentation des PDE hydrolysant le GMPc, notamment la PDE1B (Sancesario et al., 2004). De plus, l'administration en sous-cutanée d'un inhibiteur de la PDE1B (vinpocétine) supprime les déficits locomoteurs chez le modèle

de rat de la maladie de Parkinson, et augmente les niveaux de dopamine dans le striatum (Zaitone et al., 2012). Cependant, une étude conduite chez un modèle de souris avec une lésion dopaminergique chronique a montré des résultats inverses, avec une expression et activité accrue de la GC, une augmentation des niveaux de GMPc et aucune altération de l'activité des PDE (Chalimoniuk et al., 2004). L'absence de modification de l'expression de la PDE10A lors d'une lésion sévère a été confirmée (Sugiyama et al., 2021).

Lors de l'expression des dyskinésies, les niveaux d'AMPC et de GMPc semblent diminués (Giorgi et al., 2008; Sancesario et al., 2014). Une diminution des niveaux de GMPc peut s'expliquer par une augmentation de l'activité des PDE dégradant le GMPc (Giorgi et al., 2008; Sancesario et al., 2014). D'ailleurs l'utilisation d'un inhibiteur de la PDE5 (zaprinast) rétablit les niveaux de GMPc et réduit la sévérité des LID (Giorgi et al., 2008; Picconi et al., 2011). Dans une autre étude réalisée chez les souris avec une lésion chronique (avec ou sans traitement L-DOPA), l'inhibiteur de la PDE2A (BAY607550) augmente les niveaux de GMPc de la même manière chez les souris sans lésion, avec lésion ou dyskinétique (Chalimoniuk and Langfort, 2007). A l'inverse de la PDE5, l'activité de la PDE2A ne semble pas modifiée dans le modèle parkinsonien et dyskinétique. Concernant la réduction des niveaux d'AMPC, celle-ci ne semble pas être causée par une modification de l'activité de l'ensemble des PDE dégradant l'AMPC (Sancesario et al., 2014). Plus particulièrement, aucune modification d'activité de la PDE1B et PDE10A n'est mesurée lors de l'expression des LID chez le modèle murin (Sancesario et al., 2014). A l'inverse, chez les patients Parkinsonien traités à la L-DOPA, une perte de la PDE10A est corrélée positivement à la durée de la maladie et la sévérité des symptômes moteurs (Niccolini et al., 2015). Pourtant, l'utilisation d'inhibiteurs de la PDE10A (TP-10, MR1916 ou PDM-042) dans des modèles murins et primates non-humain montre un effet anti-dyskinétique sans pour autant altérer l'effet antiparkinsonien du traitement L-DOPA (Arakawa et al., 2020; Beck et al., 2018; Guimarães et al., 2022; Padovan-Neto and West, 2017). La dose utilisée semble particulièrement importante. En effet, tandis qu'une faible dose a un effet anti-dyskinétique, à plus forte dose, l'utilisation de PDM-042 à forte dose prolonge la durée des dyskinésies (Guimarães et al., 2022).

Les divergences observées peuvent être d'une part causées par le choix de modèle de la maladie de Parkinson (modèle sévère ou chronique, prélèvement murin, primate humain ou non humain). D'autre part, les niveaux des seconds messagers varient rapidement au cours de temps. En fonction du protocole utilisé et du temps auquel les prélèvements sont effectués, les niveaux d'AMPC et GMPc peuvent différer. Ainsi, les mesures des seconds messagers sur tissu fixé apportent peu d'information. L'imagerie de biosenseurs permet d'outrepasser cette limite par une étude dynamique des

variations des niveaux d'AMPC et GMPc au cours du temps, dans des neurones vivants et intacts. Enfin les mesures des niveaux d'AMPC et de GMPc réalisées dans les études décrites ci-dessus ont été faites sur l'ensemble du striatum, sans différencier les MSNs D1 et D2, ni les interneurones (Giorgi et al., 2008; Sancesario et al., 2014). Or, la lésion dopaminergique et les LID engendrent des adaptations de la voie AMPC/PKA inversées dans les MSNs D1 et D2. L'utilisation des souris BAC permet une étude spécifique aux MSNs D1 et D2 (Valjent et al., 2009). En imagerie de biosenseurs, l'utilisation d'agents pharmacologiques spécifiques à chaque population neuronale permet également l'identification des populations neuronales. Ces deux techniques peuvent d'ailleurs être utilisées pour des études *in vivo* (Jones-Tabah et al., 2020).

1.5.2.3 – L'expression des LID est fluctuante

L'expression des LID se développent chez les patients parkinsoniens entre 5 à 10 ans après le début du traitement. Des études ont mis en évidence un lien entre les LID et une fluctuation importante des niveaux de dopamine dans le striatum (de la Fuente-Fernández et al., 2004a). Une heure après la prise de L-DOPA, l'augmentation des niveaux de dopamine dans le striatum est plus importante chez les patients dyskinétiques que chez les patients non dyskinétiques (de la Fuente-Fernández et al., 2004b). Cependant, les études comparatives entre les patients dyskinétiques et les patients non dyskinétiques sont réalisées sur des cohortes de patients avec des stades de la maladie différents et donc probablement des lésions plus ou moins importantes. C'est pourquoi des études de microdialyse ont été réalisées chez les modèles murins hémi-parkinsoniens, avec une lésion similaire. Une faible dose de L-DOPA permet d'obtenir un groupe dyskinétique et un groupe non dyskinétique. Les mêmes observations que chez les patients ont été faites : les niveaux de L-DOPA (Carta et al., 2006) et de dopamine (Lindgren et al., 2010; Wang et al., 2014) dans le striatum sont plus élevés chez les animaux dyskinétiques que les animaux non dyskinétiques lors du traitement, et cela dès la première prise de L-DOPA (Carta et al., 2006). Cette augmentation est indépendante du niveau basal de dopamine, similaire entre les deux groupes (Lindgren et al., 2010; Wang et al., 2014).

La fluctuation des niveaux de lévodopa est responsable des périodes « off » et périodes « on ». Les LID s'expriment spécifiquement lorsque le niveau plasmatique en L-DOPA est au plus haut. Une élégante étude a d'ailleurs montré chez le rat hémi-parkinsonien que le traitement continu de L-DOPA par une pompe sous-cutanée empêche le développement des dyskinésies. De plus, ce traitement continu ne modifie ni l'expression de Δ fosB ni la phosphorylation de la DARPP-32 et d'ERK, trois marqueurs d'expression des LID lors du traitement pulsatile (Lebel et al., 2010).

Les effets de la fluctuation des niveaux de L-DOPA et de dopamine lors du traitement soulèvent de nombreuses questions expérimentales. Effectivement, en fonction de la durée entre le traitement L-DOPA et le prélèvement du tissu ou l'enregistrement d'une mesure, le niveau de dopamine semble différer. Cela peut engendrer des variations dans les résultats obtenus. Par exemple l'étude des niveaux de seconds messagers dans les LID constitue une étude d'un système dynamique. En fonction de l'état d'activation dans lequel se trouvent les neurones lors de la fixation des tissus, les résultats peuvent différer. Ceci peut expliquer les divergences obtenues. Il pourrait être pertinent de distinguer les périodes « on » avec expression des LID des périodes « off » sans expression des LID.

Dans les modèles murins de la maladie de Parkinson, une seule prise de L-DOPA peut suffire au développement des LID. Cette sensibilité est probablement causée par les modèles utilisés présentant généralement une lésion dopaminergique sévère correspondant à un stade avancé de la maladie de Parkinson. Cette hypersensibilité à la dopamine dans ces modèles murins doit être prise en compte dans les études utilisant divers agents pharmacologiques pour étudier la maladie de Parkinson seule, sans traitement. Dans un système adapté pour de faibles niveaux de dopamine, l'utilisation d'agoniste à dose saturante peut alors s'apparenter à une prise de L-DOPA. Cela doit être pris en considération dans l'interprétation des résultats.

1.5.3 – Pertinence des modèles animaux de la maladie de Parkinson

La partie 1.5 – montre la complexité de la maladie de Parkinson : la perte des afférences dopaminergiques engendre effectivement de nombreuses adaptations striatales. Cela fait de cette maladie une maladie multifactorielle et hétérogène. Dans le but de mieux comprendre les fonctionnements qui la sous-tendent et à long terme de développer des traitements pour traiter voire guérir cette maladie, de nombreux modèles animaux ont été développés. Effectivement, chaque modèle animal reproduit certains stades et certaines caractéristiques de la maladie. Le modèle animal choisi sera celui le mieux adaptée à l'étude en question.

Les modèles animaux peuvent être regroupés en deux catégories. D'abord, les modèles génétiques permettent principalement l'étude des formes familiales et des facteurs de risque génétique. Ces modèles reproduisent également le développement progressif de la maladie. Certains modèles génétiques ciblent par exemple le gène de l' α -synucléine et permettent l'étude des corps de Lewy, caractéristiques de la maladie de Parkinson. La deuxième catégorie concerne les modèles induits par l'utilisation de neurotoxines ciblant directement les neurones dopaminergiques. En fonction de la toxine utilisée, la

lésion peut être chronique ou aiguë. Les lésions chroniques sont généralement engendrées par une absorption orale de la toxine et conduisent à une lésion des neurones dopaminergiques dans les deux hémisphères. A l'inverse, les lésions aiguës sont généralement induites dans un seul hémisphère (l'injection intracérébrale dans les deux hémisphères étant souvent létale ou doit être réalisée avec des faibles doses de toxines (Blesa and Przedborski, 2014). Ces modèles induits par une toxine conduisent à une lésion importante voire totale des neurones dopaminergiques. Ils ne sont pas représentatifs de la neurodégénérescence progressive des neurones dopaminergiques chez les patients. Toutefois, ce sont des modèles pertinents pour étudier les conséquences tardives de la perte des neurones dopaminergiques, tester l'efficacité de nouveaux traitements symptomatiques ou encore de mieux comprendre les mécanismes des LID. Notre projet vise à étudier les conséquences à long terme de la mort des neurones dopaminergiques, c'est pourquoi j'ai utilisé au cours de ma thèse un modèle murin par injection d'une toxine. Uniquement cette catégorie sera développée par la suite.

Le MPTP et la 6-OHDA sont les deux toxines majoritairement utilisées pour induire un modèle Parkinsonien ou hémi-Parkinsonien, respectivement. Historiquement, la toxicité du MPTP sur les neurones dopaminergiques a été découverte en 1982 chez sept patients présentant des symptômes similaires à la maladie de Parkinson. Tous avaient consommé un analogue synthétique de l'héroïne, le MPPP (1-méthyl-4-phenylpropionoxypiperidine). Or, la synthèse du MPPP peut conduire à la formation d'impuretés telles que le MPTP (Langston, 2017). Le MPTP est une neurotoxine qui traverse la barrière hémato-encéphalique (Jagmag et al., 2016) et est converti en MPP⁺ (1-méthyl-4-phenylpyridinium) par la monoamine oxydase B. Le MPP⁺ est recapturé par les neurones dopaminergiques et, en interférant avec le métabolisme mitochondrial, conduit à leur mort cellulaire (figure 14) (Chan et al., 1991). Ce modèle animal développe des bradykinésies semblables à celles observées dans la maladie de Parkinson, ainsi qu'un déficit postural et une réduction globale des mouvements (Crossman et al., 1985). Toutefois l'utilisation de MPTP chez la souris conduit à une déficience motrice transitoire (Sedelis et al., 2001; Willis and Donnan, 1987). C'est pourquoi le traitement chronique au MPTP est majoritairement effectué chez les primates non-humains (Bezard and Przedborski, 2011), mais est également parfois administré aux souris (Smeyne and Jackson-Lewis, 2005). Cependant, les rats présentent une forte résistance au MPTP et ne représentent donc pas à un bon modèle de la maladie de Parkinson (Boyce et al., 1984; Chiueh et al., 1984).

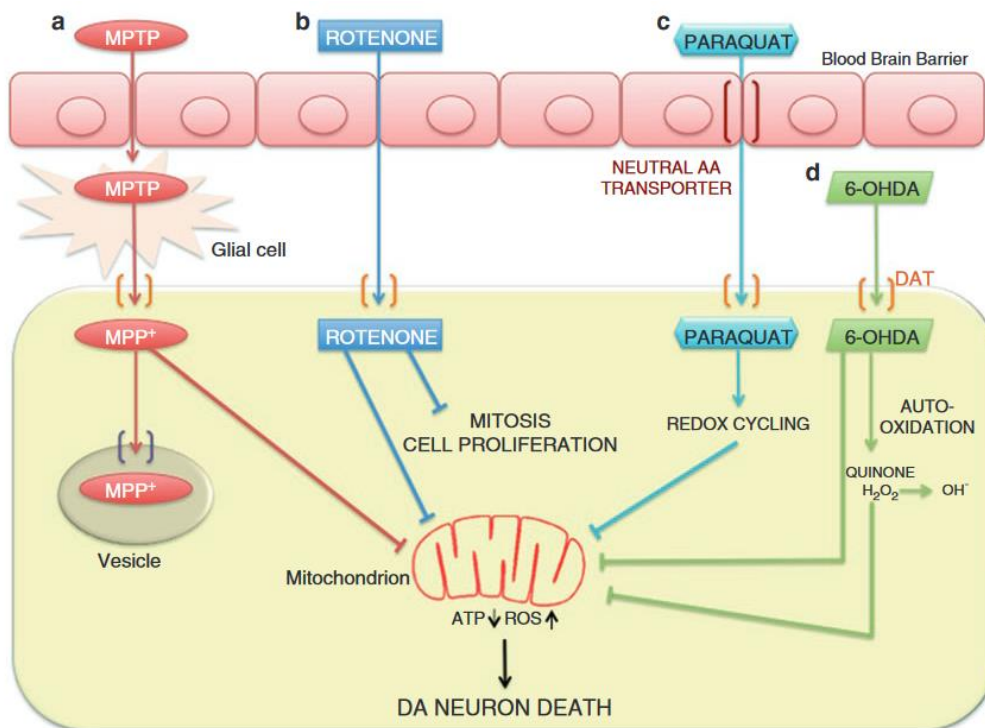


Figure 14 : mécanismes de la mort cellulaire des neurones dopaminergiques induite par l'utilisation de différentes toxines (figure reprise de Rossi *et al.* 2021). Le MPTP (a) est converti en MPP⁺ par les cellules gliales puis recapturé par les neurones dopaminergiques via les transporteurs à la dopamine. La 6-OHDA (d) favorise la production de toxines (telles que les quinones ou le peroxyde d'hydrogène) par un mécanisme d'auto-oxydation. Ces toxines produites à partir de la 6-OHDA, le MPP⁺, la roténone (b) et le paraquat (c) induisent, par inhibition du complexe I mitochondrial, une production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*) et une réduction d'ATP causant la mort cellulaire. Le paraquat bloque également la mitose et prolifération cellulaire (Rossi *et al.*, 2021).

La 6-OHDA est également une neurotoxine interférant avec la chaîne respiratoire mitochondriale (figure 14) (Blesa and Przedborski, 2014; Schober, 2004). Ne traversant pas la barrière hématoencéphalique, elle est directement injectée par stéréotaxie dans la voie nigrostriée où elle est recapturée sélectivement par les neurones exprimant les transporteurs de monoamines, à savoir les neurones dopaminergiques et noradrénergiques. Pour éviter la destruction des neurones noradrénergiques, la 6-OHDA est injectée en présence d'un inhibiteur sélectif de la recapture de la noradrénaline, la désipramine. Contrairement au MPTP injecté en systémique, l'injection intracérébrale unilatérale de la 6-OHDA permet d'induire une lésion unilatérale et permet donc l'obtention de modèles hémiparkinsoniens. En fonction de la zone d'injection (SNc, striatum, MFB) et de la dose injectée, la 6-OHDA conduit à une lésion plus ou moins étendue (Francardo *et al.*, 2011). Effectivement, l'injection de la 6-OHDA dans le striatum conduit plutôt à des lésions partielles du striatum (Francardo *et al.*, 2011; Kirik *et al.*, 1998; Lundblad *et al.*, 2002) tandis que les injections réalisées dans

le MFB ou dans la SNc sont totales dans les 24h post-injections (Carta et al., 2007; Kirik et al., 1998). Les modèles lésés avec la 6-OHDA présentent les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson. La lésion d'un seul hémisphère induit un déficit moteur au côté contra-latéral à lésion, facilitant les observations comportementales. Egalement, l'hémi-lésion, en comparaison à une lésion des deux hémisphères, améliore la survie des animaux. Il est important de noter que dans le cas d'une hémi-lésion, l'autre hémisphère compense la perte de dopamine et ne peut donc pas être utilisé comme contrôle. Cette compensation peut compliquer l'interprétation des résultats (notamment les études comportementales et les études des réseaux neuronaux). Ce modèle de la maladie de Parkinson peut parfois être utilisé pour étudier les symptômes non moteurs de la maladie de Parkinson (altérations cognitives, dépression, anxiété...). Dans ce cas, les lésions bilatérales avec une faible dose de 6-OHDA injectée dans le striatum sont favorisées (Rossi et al., 2021). La 6-OHDA est utilisée aussi bien chez le rat (Ungerstedt, 1968) que chez la souris (da Conceição et al., 2010; Thiele et al., 2012).

Notons que l'administration systémique de la roténone ou du paraquat conduit également à la mort des neurones dopaminergiques en interférant avec le fonctionnement mitochondrial (figure 14) (Cenci and Sgambato, 2021).

Chez les modèles induits par une toxine, le traitement L-DOPA conduit également au développement des LID. Les premiers modèles animaux pour étudier les LID étaient des modèles de primate non humain, avec comme principal avantage celui de la ressemblance symptomatique avec l'humain (Clarke et al., 1987; Crossman, 1987). Leur utilisation étant très coûteuses et ne permettant pas l'établissement de critères méthodologiques homogènes, les modèles murins se sont développés dans les années 1990. Une équipe suédoise a développé un modèle murin parkinsonien dyskinétique chez le rat, puis chez la souris (Cenci and Lundblad, 2007). Ces modèles ont été développés sur la base de modèles murins Parkinsoniens chez qui un traitement chronique à la L-DOPA mène au développement des LID.

L'induction des LID se fait par traitement quotidien de L-DOPA dans ces modèles murins Parkinsoniens. De nombreux facteurs entrent en jeu dans le développement des LID. D'abord, la sévérité des LID est positivement mais non-linéairement corrélée à l'étendue de la lésion dopaminergique chez le rat (Andersson et al., 1999; Peng et al., 2019; Winkler et al., 2002) comme la souris (Lundblad et al., 2005, 2004). De plus, la sévérité des LID augmente pendant les 2 à 3 premières semaines de traitement (Cenci and Crossman, 2018). Les pertes motrices étant transitoires chez le modèle de souris MPTP, il est plus difficile d'utiliser ces modèles pour étudier les LID. La 6-OHDA induit une lésion rapide et importante, facilitant le développement des LID. Cette lésion engendre également un stress cellulaire et une activation des cellules gliales, deux facteurs

observés chez les patients Parkinsoniens. Sachant que l'étendue de la lésion nigrostriatale varie en fonction du site d'injection et de la dose de la 6-OHDA, il est nécessaire d'adapter la dose de L-DOPA en fonction de la sévérité de la lésion. Chez les modèles murins avec une lésion partielle, il est nécessaire d'utiliser des doses importantes et répétées de L-DOPA pour observer des LID, alors que chez les modèles murins avec une lésion sévère, une seule faible dose de L-DOPA peut être suffisante pour générer des LID (Francardo et al., 2011). Ceci est en adéquation avec les études montrant que l'étendue de la perte des neurones dopaminergiques est un facteur déterminant dans l'apparition des LID (Bastide et al., 2015; Guridi et al., 2012; Morigaki et al., 2017). Le développement des LID se traduit chez le modèle murin par trois mouvements anormaux involontaires (AIMs, *abnormal involuntary movements*): dyskinésie axiale (mouvement anormal de la tête vers le tronc), dyskinésie de la patte (tremblement répétitif de la patte avant) et dyskinésie oro-linguale (mouvement anormal de mastication et de la langue) (Cenci et al., 1998; Cenci and Lundblad, 2007). L'évaluation de la sévérité des LID se base sur le temps pendant lequel chaque dyskinésie est apparente (Cenci et al., 1998). Le développement du modèle unilatéral 6-OHDA facilite également l'observation des comportements moteurs associés aux LID (tests AIMs, *abnormal involuntary movements*), ces comportements s'exprimant seulement du côté contra-latéral à la lésion (Cenci and Lundblad, 2007; Peng et al., 2019). Le traitement à la L-DOPA peut conduire également à une dyskinésie locomotrice correspondant à une augmentation de la locomotion et des rotations contra-latérales à la lésion. Toutefois, contrairement aux AIMs axial, oro-lingual et de la patte, les rotations sont également induites par l'utilisation d'agonistes dopaminergiques (Lundblad et al., 2003, 2002) et ne sont pas réduites par des traitements pharmacologiques permettant d'atténuer les LID (Dekundy et al., 2007; Dupre et al., 2008; Lundblad et al., 2002). Ainsi, les rotations contra-latérales ne permettent pas de mesurer les complications liées au traitement L-DOPA.

En prenant en considération l'ensemble des avantages et inconvénients de chacun de ces modèles de la maladie de Parkinson, nous avons utilisé le modèle de souris hémiparkinsonienne avec une injection de la 6-OHDA dans le MFB. Effectivement, notre projet consiste à étudier les conséquences à long terme des adaptations cellulaires et moléculaires lors d'une lésion des neurones dopaminergiques et des dyskinésies. L'injection unilatérale de la 6-OHDA dans le MFB assure une lésion totale des neurones dopaminergiques et un développement des dyskinésies suite au traitement à la L-DOPA.

2 – OBJECTIFS

Dans un premier temps, nous avons caractérisé le rôle fonctionnel de la PDE2A, PDE4 et PDE10A dans l'intégration de la réponse à la dopamine dans les MSNs (*cf. 4.2 – differential regulation of cAMP/PKA signaling pathway by PDE10A, PDE4 and PDE2A in striatal medium-sized spiny neurons*), puis nous avons caractérisé les PDE responsables de l'hydrolyse de l'AMPC dans les ChIN (*cf. 4.3 – Calcium-activated Phosphodiesterase 1 and cGMP-inhibited Phosphodiesterase 3 modulate cyclic nucleotide levels in Striatal Cholinergic Interneurons*). Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la PDE2A comme potentielle cible thérapeutique pour réduire les niveaux excessifs d'AMPC associés aux LID dans les MSNs D1 (*cf. 4.4 – Stimulation of PDE2A activity moderates cAMP/PKA response to D₁ receptor stimulation in dyskinetic mice*). Pour ce faire, nous avons utilisé l'imagerie de biosenseurs FRET sur tranche de cerveau de souris (jeune ou adulte). Cet outil permet de suivre la dynamique spatiale et temporelle de la voie AMPc/PKA au sein de neurones vivants et morphologiquement intacts. Cette imagerie de fluorescence en plein champ permet de mesurer simultanément ces variations dans des types neuronaux différents, comme les MSNs D1, D2, et les ChIN.

La première étude s'inscrit dans la continuité des projets de l'équipe visant à mieux comprendre l'intégration de la réponse à la dopamine sélectivement dans les MSNs D1 et D2. Une application transitoire de dopamine conduit à une augmentation et diminution des niveaux d'AMPC et de l'activité PKA, dans les MSNs D1 et D2, respectivement. La temporalité de cette réponse est déterminée par l'activité des AC (responsable de la production de l'AMPC) et par l'activité des PDE (responsable de l'hydrolyse de l'AMPC). Ainsi, nous avons étudié la contribution fonctionnelle de la PDE2A, PDE4 et PDE10A lors d'une réponse transitoire à la dopamine distinctement dans les MSNs D1 et D2.

La deuxième étude s'est portée sur un autre type cellulaire du striatum, les ChIN. Malgré leur faible proportion dans le striatum, nous avons tiré profit de leur morphologie distincte, nous permettant facilement de les identifier par microscopie de plein champ. Peu d'études aujourd'hui ont été réalisées sur la régulation des seconds messagers, AMPC et GMPc, dans les ChIN. Ainsi, nous avons identifié les PDE responsables de l'hydrolyse des seconds messagers dans ce type neuronal.

Enfin, nous avons souhaité tirer profit de l'ensemble des connaissances acquises sur le rôle des PDE dans le striatum pour tester si l'activation pharmacologique de la PDE2A peut réduire les niveaux excessifs d'AMPC associés aux dyskinésies. La mise en évidence d'un nouveau mécanisme d'action a pour but de motiver le développement de nouveaux médicaments ciblant la PDE2A.

3 – MATÉRIELS & MÉTHODES

3.1 – Modèles animaux

3.1.1 – Modèle murin jeune

Les expériences ont été réalisées en accord avec la réglementation sur l'expérimentation animale de Sorbonne Université et du Ministère de l'Agriculture et des Forêts. Les souris mâles C57Bl/6J, âgées de 8 à 12 jours, provenaient de l'élevage Janvier (Le Genest Saint Isle, France).

3.1.2 – Modèle murin adulte

Nous utilisons des souris C57Bl/6J âgées entre 5 à 12 semaines en début de protocole (Janvier et Envigo). Les souris étaient hébergées dans des cages ventilées, avec un cycle d'éclairage jour-nuit de 12h, à température de 22°C et une hygrométrie de 55 %, avec de l'eau et de la nourriture à volonté. Du matériel végétal est présent pour édifier un nid.

3.1.2.1 – Modèle murin de la maladie Parkinson et des dyskinésies associées au traitement à la L-DOPA

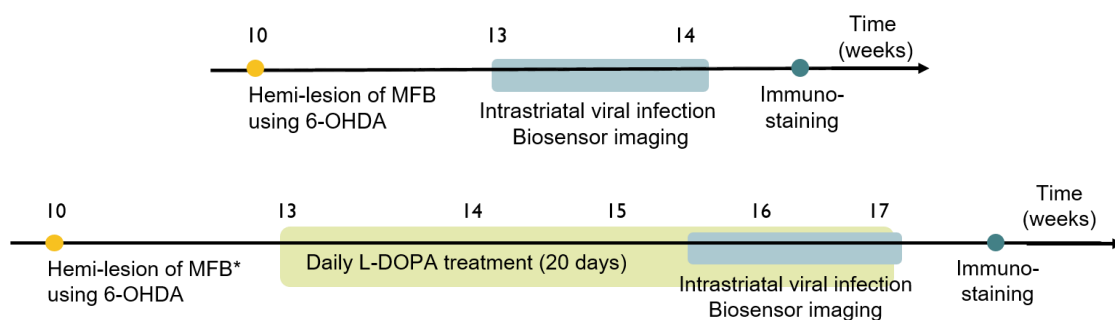


Figure 15 : obtention du modèle murin parkinsonien (en haut) et dyskinétique (en bas). Une injection (solution saline ou 6-OHDA) est réalisée dans le MFB chez des souris adultes âgées de 10 semaines. Trois semaines après l'injection dans le MFB, les souris sham (injection de solution saline dans le MFB) et Parkinson (injection de 6-OHDA dans le MFB) subissent une seconde chirurgie pour l'injection du virus dans le striatum permettant l'expression du biosenseur. Certaines souris parkinsoniennes sont traitées à la L-DOPA pendant 15 jours, les dyskinésies sont quantifiées pendant la seconde semaine de traitement et la seconde chirurgie pour l'expression du biosenseur est réalisée à la fin du traitement.

Pour obtenir le modèle de la maladie de Parkinson et des LID (figure 15), nous utilisons une lésion unilatérale à la 6-OHDA dans le MFB chez des souris C57Bl/6J. Concernant les souris contrôles (sham), la 6-OHDA est remplacée par une solution saline. Les soins

post-opératoires ont été optimisés afin d'améliorer le taux de survie des animaux. Trois semaines après la lésion, nous réalisons le test du cylindre qui permet de valider la lésion des neurones dopaminergiques. Certaines souris reçoivent un traitement quotidien de L-DOPA pendant 2 à 5 semaines. Les dyskinésies sont quantifiées au cours de la deuxième semaine de traitement. A la fin du protocole, les souris subissent une deuxième chirurgie permettant l'injection intra-striatale du virus exprimant le biosenseur d'intérêt. Le lendemain de cette seconde chirurgie, la souris est sacrifiée, des tranches de cerveau sont réalisées et permettent d'effectuer l'imagerie de biosenseurs.

3.1.2.1.1 – Lésions des neurones dopaminergiques

La lésion 6-OHDA est réalisée dans le MFB de l'hémisphère droit. Pour cela, nous utilisons le protocole détaillé de Francardo et al. (2011). 20 minutes avant le début de la chirurgie, la désipramine (25 µg/kg) est injectée en sous-cutanée pour protéger les neurones noradrénergiques. La souris est anesthésiée avec un mélange d'air et d'isoflurane à 3.5 - 4 % puis l'anesthésie est maintenue avec un mélange air et isoflurane entre 1 et 2 %. La souris est maintenue sur un cadre de chirurgie stéréotaxique, avec un masque adapté pour la souris et est placée sur un tapis chauffant. Une injection en sous-cutanée de buprénorphine (Buprécare, 0.1 mg/kg) et une injection de solution saline glucosée (50 mg/ml) sont réalisées. Une injection de lurocaïne (anesthésique local) est réalisée localement sous la peau du crâne. La 6-OHDA (3,2 µg/L ou 4 µg/L) est préparée fraîche le matin de la chirurgie et est diluée dans une solution saline contenant 0,02 % d'acide ascorbique. A l'aide d'une pipette de verre étirée, la 6-OHDA est injectée sur le site du MFB droit aux coordonnées suivantes (en mm, relativement au Bregma) : AP = - 1,2, ML = - 1,3, DV = - 4,75. L'injection est réalisée à l'aide d'un capillaire de verre étiré, attaché à un Nanoject II (Drummond Scientific) et à une vitesse de 0,5 µL/min. Le capillaire est laissé en place deux minutes avant et 2 min après l'injection. Le capillaire est retiré, puis après suture de la plaie, l'animal est mis en salle de réveil sur tapis chauffant.

3.1.2.1.2 – Soins post-opératoires

Afin de favoriser la survie de l'animal, des soins spécifiques sont apportés. Pendant toute la période de récupération, l'animal est placé jour et nuit sur un tapis chauffant afin d'éviter l'hypothermie. La lésion des neurones dopaminergiques entraîne une perte de poids importante. Le poids de l'animal est suivi par une pesée quotidienne jusqu'à une reprise de poids. Pour limiter la perte de poids, un enrichissement de la nourriture sous forme d'un gel (HydroGel, ClearH2O), favorisant la récupération post-chirurgie, est placé à volonté dans la cage d'hébergement. Les souris reçoivent également deux à trois injections quotidiennes de solution saline glucosée (50 mg/ml) pour prévenir la déshydratation. Enfin, elles sont nourries trois fois par jour en leur proposant à la pipette un lait sucré. Une injection d'anti-inflammatoire non stéroïdien (Meloxicam, 5mg/kg)

est administrée en sous-cutanée en cas de signes de douleur. Afin d'optimiser leur récupération, une souris sham est, si possible, présente dans chaque cage. La présence d'un compagnon apporte de la chaleur aux autres souris et favorise la récupération des souris lésées.

3.1.2.1.3 – Test du cylindre

Le test du cylindre permet d'évaluer l'étendue de la lésion dopaminergique par mesure de l'utilisation asymétrique des pattes avant de l'animal. L'animal n'est pas habitué au test du cylindre au préalable, et ce test est réalisé après récupération totale de la chirurgie et avant le début du traitement à la L-DOPA. L'animal est placé dans un cylindre (10 cm de diamètre, 28 cm de hauteur) et est enregistré avec une caméra pendant 3 minutes. En parallèle de l'enregistrement vidéo, l'expérimentateur évalue visuellement : le nombre de fois où l'animal touche le mur du cylindre avec sa patte avant droite ou gauche est compté. La mesure de l'utilisation asymétrique des pattes avant est obtenue en exprimant le rapport entre le nombre de fois où l'animal utilise sa patte avant gauche (contra-latérale à la lésion) sur le nombre total d'utilisation des pattes avant droite et gauche.

3.1.2.1.4 – Traitement à la L-DOPA

Le traitement à la L-DOPA commence 2 à 3 semaines après la lésion 6-OHDA. La L-DOPA méthylester est diluée dans une solution saline (3 mg/kg/jour pendant 5 jours, puis 6 mg/kg/jour ou 20 mg/kg/jour). Elle est injectée en intrapéritonéale en combinaison avec le bensérazide (12 mg/kg), un inhibiteur de la décarboxylase périphérique. Certaines souris reçoivent en même temps une injection de molsidomine, un donneur de NO permettant d'activer la PDE2A (4mg/kg/jour). Le développement des dyskinésies est évalué par le test AIMs. Les jours d'évaluation des dyskinésies, l'injection de L-DOPA/bensérazide est réalisée au début du protocole d'évaluation (*cf.* ci-dessous).

3.1.2.1.5 – Tests AIMs

Le test AIMs permet d'évaluer le développement des dyskinésies et leur sévérité. Nous utilisons le protocole décrit par Francardo et al. (2011). Les souris sont placées dans un espace ouvert après l'injection de la L-DOPA. Chaque souris est seule dans l'espace ouvert et une caméra placée au-dessus de tous les espaces ouverts permet d'enregistrer leur locomotion pendant les trois heures d'enregistrement. Les AIMs sont évalués pendant 1 minute, toutes les 20 minutes, pendant 180 min. L'enregistrement commence 20 minutes après l'injection de la L-DOPA. Trois types de comportements sont évalués : (1) les mouvements dyskinétiques axiaux (mouvement de torsion du cou contra-latéralement à la lésion, torsion du haut du corps vers le flanc contra-latéral à la lésion), (2) les mouvements dyskinétiques orolinguaux (protrusion de la langue) (3) mouvements dyskinétiques des membres antérieurs (mouvements inutiles de la

patte contra-latérale à la lésion et toilettage intensif avec la patte contra-latérale à la lésion). Chaque type de comportement est évalué sur une échelle allant de 0 à 4 : 0, absence du mouvement, 1, présence du mouvement pendant un temps inférieur à la moitié du temps d'observation, 2, présence du mouvement pendant un temps supérieur à la moitié du temps d'observation, 3, mouvement réalisé en continu mais interrompu lors d'un signal visuel bref, 4, mouvement réalisé en continu et ininterrompu lors d'un signal visuel bref. Chaque souris peut théoriquement atteindre un score maximal de 108. L'évaluation des dyskinésies est effectuée manuellement avec une possibilité de re-visualisation par enregistrement vidéo.

3.2 – Biosenseurs FRET

Les voies de signalisation telles que l'AMPC/PKA ou le NO/GMP, permettent de transduire des messages extracellulaires en signaux intracellulaires et ainsi de s'adapter à l'environnement. Ainsi, les voies de signalisation entrent en jeu dans de nombreux processus intracellulaires, comme certaines formes de plasticité synaptique ou la régulation d'expression génique. Afin de s'adapter à des changements extracellulaires rapides (de l'ordre de la milliseconde), ces voies de signalisation sont hautement dynamiques et agissent de manière multidimensionnelle. Les niveaux des seconds messagers peuvent rapidement et transitoirement augmenter ou diminuer, comme dans le cas de l'intégration de la dopamine phasique par les MSNs D1 et D2. La dimension temporelle est donc essentielle, aussi bien concernant les variations de concentration des seconds messagers que l'activation de leur cible. La dimension spatiale de ces variations est également cruciale. D'une part, la concentration des seconds messagers diminue avec la distance. D'autre part, certaines interactions protéiques conduisent à la formation de microdomaines intracellulaires capables de limiter la diffusion des seconds messagers.

Pour mieux comprendre les mécanismes de régulation des voies de signalisation, il est essentiel d'utiliser une approche permettant une résolution spatiale et temporelle. Les biosenseurs FRET permettent d'étudier dans des cellules vivantes et en temps réel, la dynamique spatiale et temporelle des seconds messagers et de l'activité de leur cible. Il existe plusieurs biosenseurs FRET permettant d'étudier spécifiquement un signal biologique comme les variations d'AMPC, de GMPc ou de calcium, l'activité de la PKA ou d'ERK, etc.

3.2.1 – Fonctionnement d'un biosenseur FRET

Un biosenseur FRET est une protéine artificielle, composée de deux fluorophores (un donneur et un accepteur) liés entre eux par un domaine senseur sensible à un signal

biologique spécifique. La liaison du signal biologique d'intérêt induit un changement de conformation du biosenseur qui conduit à un éloignement ou rapprochement des fluorophores modifiant l'efficacité du FRET. Ainsi, les variations du signal biologique conduisent à des changements optiques du biosenseur.

Les biosenseurs FRET peuvent être codés génétiquement et présentent ainsi l'avantage de pouvoir être exprimés dans tout type cellulaire. Certains biosenseurs FRET peuvent également contenir une séquence d'adressage à un organite spécifique ou aux microdomaines sous-cellulaires. L'utilisation de vecteurs viraux permet de cibler des types cellulaires spécifiques. De plus, il s'agit d'une technique d'expression non invasive, conservant les membranes cellulaires intactes.

3.2.1.1 – Principe du FRET

Le FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) consiste en un transfert d'énergie par résonance entre molécules fluorescentes. Ce principe a été décrit par le physicien Theodor Förster au cours des années 1940. Le transfert d'énergie d'un fluorophore à un autre se fait sans émission de lumière. Pour cela, le fluorophore donneur est conduit dans un état excité. Lors de la relaxation, l'énergie est transférée au fluorophore accepteur, qui passe ainsi dans un état excité puis libère l'énergie sous forme de lumière lors de sa relaxation. Le transfert d'énergie est possible uniquement lorsque le spectre d'émission du donneur recouvre en partie le spectre d'absorption de l'accepteur. De plus, l'efficacité du transfert d'énergie dépend de la distance entre les deux fluorophores et de leur orientation relative. Le principe du FRET a permis l'étude des interactions entre deux protéines, chacune fusionnée à un fluorophore.

Les changements d'efficacité du FRET rendent compte des variations du signal biologique mesuré. La mesure de l'intensité de fluorescence du donneur et celle de l'accepteur permet d'obtenir une mesure ratiométrique. Contrairement à d'autres sondes non ratiométriques (comme les biosenseurs calciques GCamp), les biosenseurs ratiométriques permettent de s'affranchir des artefacts physiques (*e.g.*: la dérive de la mise au point) et biologiques (*e.g.*: variation intercellulaire de la concentration du biosenseur) subis par les deux longueurs d'ondes d'émission.

3.2.1.1 – Imagerie ratiométrique

Les images sont acquises à l'aide d'un microscope à épifluorescence, avec un objectif à immersion à eau, 40x 0.8 NA. Un dispositif piézoélectrique permet d'ajuster régulièrement la mise au point tout au long des acquisitions. Le temps d'exposition est adapté en fonction du niveau d'expression de chaque tranche de cerveau imagée. Lors de chaque acquisition, deux images sont prises par le logiciel d'acquisition (iVision-Mac

Software, BioVision technologies, Exton, USA) : l'image du canal A correspond à celle acquise avec le filtre d'émission HQ480/40 pour la CFP et l'image du canal B correspond à celle acquise avec le filtre d'émission D353/40 pour la YFP. Le calcul ratiométrique des deux images est ensuite effectué en temps réel dans un second logiciel (Igor Pro, Wavemetrics, USA) à l'aide d'un logiciel personnalisé Ratioscope (E. Mota et al., 2021). Chaque image est traitée afin de corriger des paramètres instrumentaux fixes : le niveau de fond de la caméra (« offset ») est soustrait, l'intensité de chaque pixel de l'image est divisée par le temps d'exposition, les irrégularités du système d'imagerie sont corrigées à l'aide d'images d'un échantillon homogène de référence. Une correction de décalage entre les deux canaux et une correction de mouvement sont appliquées à chaque image. L'image ratiométrique est alors présentée en temps réel en fausses couleurs où la valeur du ratio est codée en couleur et la fluorescence codée en intensité.

L'imagerie ratiométrique peut permettre de déterminer la concentration absolue des seconds messagers. Les valeurs de ratio répondent à une équation de Hill, du R_{\min} (correspondant au ratio en absence de ligand) jusqu'au R_{\max} (correspondant au ratio en présence d'un ligand saturant) (Grynkiewicz et al., 1985). Ces valeurs R_{\min} et R_{\max} sont des constantes caractéristiques d'un poste d'imagerie et d'un biosenseur.

Pour permettre la conversion des valeurs de ratio en valeurs de concentration d'AMPC, le R_{\min} et le R_{\max} ont été déterminés de la manière suivante pour le biosenseur Epac-S^{H150}. Dans les MSNs, le ratio basal n'est pas exactement identique au ratio minimal (R_{\min}) : cela est démontré par le fait que le ratio diminue si les AC sont inhibées, indiquant donc une production tonique d'AMPC et une activation partielle du biosenseur en l'absence de stimulus. L'application d'un inhibiteur des AC (200 μ M SD22536) diminue le ratio de 0.037 unités de ratio. Si l'on fait l'hypothèse que l'inhibiteur a suffi à réduire la concentration en AMPC en-dessous du seuil de détection du biosenseur, ce niveau de ratio correspond à une concentration de 150 nM d'AMPC. Cette valeur n'est statistiquement pas différente entre les MSNs D1 et D2 (mesure réalisée dans 58 neurones, 8 tranches de cerveau, 7 souriceaux). Lors de l'estimation des concentrations d'AMPC, la valeur de 150 nM a donc été soustraite. Les ChIN ont montré une faible activité de production d'AMPC et nous avons donc considéré le ratio basal comme étant le R_{\min} . Quant au R_{\max} , il correspond à la saturation du biosenseur et a été mesuré pour chaque expérience par l'application, à dose saturante, d'un inhibiteur non sélectif des PDE (IBMX, 3-isobutyl-1-méthylxanthine, 200 μ M) et d'un activateur des AC (forskoline, 12.5 μ M). Ainsi, pour le biosenseur Epac-S^{H150}, les valeurs de ratio ont été converties en valeurs de concentration d'AMPC estimées à l'aide de l'équation de Hill avec un K_d de 10 μ M et un coefficient de Hill de 0,77 (Klarenbeek et al., 2015; Polito et al., 2013).

Pour le biosenseur cyGNAL, le R_{max} est déterminé par l'application d'IBMX et par un donneur de NO à dose saturante (DEANO, 10 μ M). Ainsi, les valeurs de ratio ont été converties en valeurs de concentration de GMPc estimées à l'aide de l'équation de Hill avec un K_d de 0.465 μ M et un coefficient de Hill de 0.80 (Betolngar et al., 2019)

3.2.1.2 – Biosenseurs des niveaux d'AMPc

Nous utilisons le biosenseur Epac-S^{H150} pour mesurer les variations des niveaux d'AMPc (Polito et al., 2013). Ce biosenseur est composé d'un domaine senseur Epac (*exchange protein directly activated by cAMP*) capable de lier l'AMPc, et de deux fluorophores : un donneur mTurquoise 2 (longueur d'onde d'excitation 440 nm – longueur d'onde d'émission 480 nm) et un accepteur cpCitrine (longueur d'onde d'émission 535 nm). La liaison d'une molécule d'AMPc sur le domaine Epac induit un changement de conformation et un changement d'orientation relative des fluorophores conduisant à une diminution de l'efficacité du FRET. Celle-ci est mesurée par une augmentation du ratio donneur/accepteur (F_{480}/F_{535}).

3.2.1.3 – Biosenseur des niveaux de GMPc

Le biosenseur cyGNAL se base sur le même principe qu'Epac-S^{H150}. Ce biosenseur est composé de deux domaines CNB-B (*cyclic nucleotid binding B*) de la PKG-I bovine, capable de lier avec une haute affinité le GMPc, et de deux fluorophores : un donneur mCerulean 3 et un accepteur Ypet (longueurs d'onde d'excitation et d'émission similaires à Epac-S^{H150} ci-dessus) (Betolngar et al., 2019). La liaison du GMPc entraîne un changement d'orientation relative des fluorophores conduisant à une augmentation de l'efficacité du FRET. Une augmentation du ratio donneur/accepteur (F_{480}/F_{535}) correspond à une augmentation des niveaux de GMPc.

3.2.1.4 – Biosenseur de l'activité PKA

Nous utilisons le biosenseur AKAR4 pour suivre le niveau de phosphorylation des substrats de la PKA intracellulaire (Depry et al., 2011). Le biosenseur AKAR4 est composé d'un domaine senseur comportant un domaine FHA (forkhead) et un site de phosphorylation par la PKA (RRATL) placés entre les fluorophores (Cerulean et cpVenus). Lorsque le site de phosphorylation est phosphorylé par la PKA, celui-ci se lie au domaine FHA. Cette liaison change l'orientation relative des fluorophores conduisant à une augmentation de l'efficacité du FRET, soit une augmentation du ratio accepteur/donneur (F_{535}/F_{480}). Ce changement est réversible par l'action des phosphatases. Le biosenseur AKAR4 rend donc compte d'un équilibre entre la phosphorylation par la PKA et la déphosphorylation par les phosphatases. De plus, la PKA ayant une haute affinité pour l'AMPc (environ 100 nM), le biosenseur AKAR4

permet de détecter de faibles augmentations de concentration d'AMPc, en-dessous de la limite de détection du biosenseur Epac-S^{H150}.

3.2.2 – Expression des biosenseurs

Le vecteur viral sindbis (alphavirus à ARN simple brin, de polarité positive) est utilisé pour exprimer les biosenseurs. Ce vecteur viral présente un tropisme neuronal (Ehrenguber et al., 1999) et a été largement utilisé dans l'étude de la plasticité synaptique (Hayashi et al., 2000). Les séquences codantes des biosenseurs ont été insérées dans un plasmide pSinRep5 (Invitrogen, San Diego, Californie) et les virions ont été produits dans des cellules BHK. Cela permet une forte traduction et une expression rapide du transgène, dès 8 heures post-infection, spécifiquement dans les neurones, sans altération morphologique.

Lorsque l'imagerie de biosenseurs s'effectue chez les souris, l'infection virale se fait *ex vivo* sur des tranches de cerveau de 300 µm. 1,5 µl de suspension virale diluée est déposée sur le striatum de chaque demi-tranche, incubée ensuite à 35°C, 5 % CO₂ pendant 12h. Chez les souris adultes, l'infection virale se fait par une double injection intra-striatale lors d'une chirurgie stéréotaxique. Le lendemain, les tranches de cerveau sont préparées. Les protocoles de préparation des tranches de cerveau sont décrits ci-dessous pour le souriceau et la souris adulte.

3.2.2.1 – Préparation des tranches de cerveau et infection chez le souriceau

La solution de coupe est composée de : 125 mM NaCl ; 2,5 mM KCl ; 26 mM NaHCO₃ ; 1,25 mM NaH₂PO₄ ; 0,4 mM CaCl₂ ; 1 mM MgCl₂ ; 20 mM glucose ; 5 mM sodium pyruvate ; 1 mM acide kynurénique, saturée avec 5 % CO₂ et 95 % O₂. La solution d'enregistrement est identique à la solution de coupe à l'exception de la concentration de CaCl₂ de 2 mM, et l'absence d'acide kynurénique.

Les souriceaux sont sacrifiés par décapitation et leur cerveau est prélevé. Des tranches coronales de 300 µm d'épaisseur sont préparées à 4°C avec un microtome VT1200S (Leica, Allemagne), puis incubées dans une solution de coupe à température ambiante pendant 30 minutes, avant d'être placées sur des membranes de Millicell-CM (Millipore) en milieu de culture (50% MEM (minimum essential medium), 50% HBSS (Hank's balanced salt solution), 6.5 g/l glucose, pénicilline - streptomycine, Invitrogen) à 35 °C, 5 % CO₂, 95 % O₂. L'infection virale est ensuite réalisée et les tranches sont mises en incubation pendant la nuit. Le lendemain, elles sont placées dans la solution d'enregistrement.

3.2.2.2 – Injections intra-striatales et préparation des tranches de cerveau chez la souris adulte

La veille de l'imagerie de biosenseurs, la souris adulte subit une chirurgie stéréotaxique se déroulant de la même manière que la chirurgie stéréotaxique pour l'injection de la 6-OHDA. Seules les coordonnées de la zone d'injection diffèrent. Une double injection dans le striatum dorsal est réalisée aux coordonnées suivantes (en mm, relativement au Bregma) : ML = -1,9, AP = +1,3, DV = -2,8 puis ML = -2,0, AP = +0,3, DV = -2,8. Sur chaque site d'injection, 2 µl de solution virale non diluée sont injectés. La pipette est laissée en place pendant 5 min après l'injection avant d'être lentement retirée.

Le lendemain de la chirurgie, l'animal est sacrifié, le cerveau est prélevé et des tranches sont préparées suivant un protocole optimisé pour la survie des neurones adultes. Trois solutions sont préparées. La première est composée de : 130 mM K-gluconate ; 20 mM HEPES ; 25 mM glucose ; 14 mM KCl ; 2 mM EGTA ; 1 mM CaCl₂ ; 6 mM MgCl₂, 0,05 µM D-APV ; 0,5 µM minocycline ; pH 7,4. Cette solution est utilisée froide (environ 4°C) de la décapitation de l'animal jusqu'aux tranches de 250 µM réalisées au vibratome. A chaque tranche réalisée, celle-ci est incubée 15 à 20 min dans une solution à 4°C saturée avec 5 % de CO₂ et 95 % d'O₂, composée de : 225 mM D-mannitol ; 25 mM glucose ; 25 mM NaHCO₃ ; 2,3 mM KCl ; 1,25 mM NaH₂PO₄ ; 1 mM CaCl₂ ; 6 mM MgCl₂ ; 0,05 µM D-APV ; 0,5 µM minocycline. Ensuite les tranches sont placées dans la solution d'enregistrement (identique à celle utilisée pour les tranches de cerveau de souris) à 34°C saturée avec 5 % de CO₂ et 95 % d'O₂.

3.2.3 – Quantification, normalisation des mesures

Dans les différents protocoles, nous appliquons diverses drogues pharmacologiques (agoniste ou antagoniste de cible spécifique) (tableau 1) agissant à différents niveaux de la voie de signalisation AMPc et GMPc afin d'en évaluer les conséquences sur les niveaux d'AMPc et l'activité de la PKA.

A la fin de chaque protocole, l'application d'un agoniste du récepteur D₁ à dose saturante (SKF-81297, 100 nM), en provoquant une réponse AMPc/PKA positive via les récepteurs D₁, permet d'identifier fonctionnellement les MSNs D1. De manière similaire, l'application d'un agoniste A_{2A} (CGS-21680, 1 µM) permet d'identifier les MSNs D2. Les ChIN sont identifiés morphologiquement : ils présentent un corps cellulaire entre 13 et 20 µM, plus large que celui des MSNs. Une pile d'images est enregistrée à la fin du protocole et permet d'examiner la morphologie des cellules et d'identifier les ChIN. Quelques tranches de cerveau ayant été utilisées pour l'imagerie de biosenseurs ont été récupérées afin de réaliser sur tissus fixés un immunomarquage pour identifier spécifiquement les neurones exprimant l'acétylcholine transférase. Ces

immunomarquages ont confirmé que les cellules avec un large corps cellulaire et une faible réponse à la forskoline expriment l'acétylcholine transférase, spécifique des ChIN.

Le ratio maximal (R_{max}) est déterminé pour le biosenseur Epac-SH150 et AKAR4 par l'application, à dose saturante, d'un inhibiteur non sélectif des PDE (IBMX, 3-isobutyl-1-méthylxanthine, 200 μ M) et d'un activateur des AC (forskoline, 12.5 μ M). Pour le biosenseur cyGNAL, la forskoline a été remplacée par un donneur de NO à dose saturante (DEANO, 10 μ M). La quantification ratiométrique est normalisée entre R_{min} et R_{max} .

3.2.4 – Agents pharmacologiques

Divers agents pharmacologiques sont utilisés comme agoniste ou antagoniste de récepteurs, ou encore comme inhibiteur de phosphodiésterases (Tableau 1).

Le décageage de la dopamine photosensible ((N)-1-(2-nitrophenyl)ethylcarboxy-3,4 - dihydroxyphenethylamine (NPEC-DA)) a été réalisé avec une source LED de 360 nm (Mightex, Toronto, Canada) fixée sur le microscope à épifluorescence. La source LED délivre une puissance mesurée en sortie d'objectif de 15 mW et l'illumination a une durée de 0.5 seconde. La période d'acquisition des images, environ une image toutes les 20 à 30 secondes, a été élevée à 1 image toutes les 5 ou 10 secondes lors de la mesure de la réponse à la dopamine.

Agent pharmacologique	Concentration(s) utilisée(s)	Effet pharmacologique
NPEC-DA	1, 3, 9 ou 10 μM	Agoniste des récepteurs D ₁ et D ₂ -like
Dopamine	1 à 10 μM	Agoniste des récepteurs D ₁ et D ₂ -like
GBR12783	1 μM	Inhibiteur de la recapture de la dopamine
Désipramine	1 μM	Inhibiteur de la recapture de la noradrénaline
SKF-81297	1 ou 100 nM	Agoniste des récepteurs D ₁ /D ₅
SKF-38393	1 μM	Agoniste partielle des récepteurs D ₁ /D ₅
quinpirole	5 μM	Agoniste des récepteurs D ₂ -like
CGS-21680	1 μM	Agoniste des récepteurs A _{2A}
PSB36	100 nM	Antagoniste du récepteur à l'adénosine A ₁
TC-E 5005	1 μM	Inhibiteur de PDE10
TP-10 ou PF-03188212	1 μM	Inhibiteur de PDE10
Rolipram	1 μM	Inhibiteur de PDE4
piclamilast	1 μM	Inhibiteur de PDE4
Cilostamide	10 μM	Inhibiteur PDE3
BAY607550	200 nM	Inhibiteur de PDE2A
PF-05180999	1 μM	Inhibiteur de PDE2A
DEANO	10 μM	Donneur de NO
Tétrodotoxine	200 nM	Bloquant des canaux Na ⁺
Forskoline	63 nM ou 13 μM	Activateur des adénylyl cyclases
IBMX	200 μM	Inhibiteur non sélectif des PDE

Tableau 1 : Drogues pharmacologiques utilisées lors de l'imagerie de biosenseur. NPEC-DA : (N)-1-(2-nitrophenyl)ethylcarboxy-3,4 -dihydroxyphenethylamine ; DEANO : diethylamine nitric oxide ; IBMX : 3-isobutyl-1-methylxanthine

3.2.5 – Statistiques

Nous avons utilisé le test de Wilcoxon (test non paramétrique) afin de tester l'hypothèse selon laquelle deux distributions sont proches. Nous avons considéré l'hypothèse comme rejetée lorsque la valeur de p est < 0,05. Dans ce cas, cela est annoté

par le symbole *. A l'inverse, si l'hypothèse ne peut être rejetée, nous l'avons indiqué par le symbole n.s. (non significatif).

3.3 – Immunomarquage

L'étendue de la lésion des afférences dopaminergiques striatales a été évaluée par immunomarquage de la TH. La TH est une enzyme présente dans les neurones dopaminergiques qui permet de convertir la tyrosine en L-DOPA. Lors d'une lésion 6-OHDA complète, une baisse de marquage de la TH supérieure à 80 % est observée entre l'hémisphère lésé et l'hémisphère contrôle.

Après utilisation des tranches de cerveau de souris adultes en imagerie de biosenseurs, les tranches sont fixées dans une solution de PFA 4 % pendant 2h, à 4°C, sous agitation (24 rpm). Concernant les souris non utilisées pour l'imagerie de biosenseur, leur cerveau est récupéré et fixé dans une solution de PFA 4 % pendant 12h, à 4°C sous agitation. Des tranches de 250 µM sont ensuite réalisées.

L'immunomarquage est réalisé sur les tranches de cerveau fixés. Les sites non spécifiques sont bloqués avec une solution bloquante (1% BSA, 0,2% Triton X100, 2% sérum de chèvre) pendant 2h, à température ambiante, sous agitation. L'anticorps primaire anti-TH est incubé toute la nuit, à 4°C, sous agitation (rabbit anti-TH, dilution 1 : 1000, ab152). Après lavage de l'anticorps primaire, l'anticorps secondaire est incubé pendant 2h à température ambiante, sous agitation (goat anti-rabbit couplés Cy5, dilution 1 : 1000, A10523, Life Technologies). Après lavage de l'excès d'anticorps secondaires, les tranches sont observées sous un microscope à épifluorescence, avec un grossissement x4. Pour chaque souris, 4 images sont enregistrées à l'aide du logiciel iVision : le striatum dorsomédial de l'hémisphère lésé et non lésé, et le striatum ventromédial de l'hémisphère lésé et non lésé.

3.4 – Western-Blot

La technique du Western blot a permis de quantifier la PDE2A et la TH sur des demi-striatum (hémisphère droit ou gauche) de souris contrôles et hémi-parkinsoniennes. Après anesthésie de la souris à l'isoflurane 5 %, l'animal est décapité et le cerveau, prélevé. Les striata droit et gauche ont été disséqués sur de la carboglace pour assurer une conservation des protéines puis conservés à -80°C.

Chaque striatum a été resuspendu sur glace dans 200 µL de de tampon N-PER (*neuronal protein extraction reagent*, Thermofischer Scientific) additionné d'un mixte d'inhibiteurs de protéases (*Complete protease inhibitor mixture*, Roche Diagnostics), puis soniqué (5 cycles de 10 secondes) afin d'aider à la dissociation des tissus. Le lysat est centrifugé à

13 000g pendant 10 min, à 4°C et le supernageant est récupéré. Les protéines striatales (30 µg de protéines) ont été analysées par SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) sur un gel gradient 4-12 % (dans un tampon MOPS, Invitrogen NuPAGE system) avant d'être transférées sur une membrane de nitrocellulose. Une coloration au rouge Ponceau a été réalisée afin de vérifier la qualité du transfert et l'homogénéité des dépôts. Les membranes ont été saturées pendant 1h à température ambiante dans une solution Tris-buffered saline (TBS-T) (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,1% Tween 20) contenant 5% de lait. Les membranes ont été incubées pendant la nuit, à 4°C, avec les anticorps primaires anti-PDE2A (rabbit antibody, PD2A-101AP, Fabgennix, dilution 1 : 1000), anti-TH (rabbit antibody, ab152, Merck, dilution 1 : 2000) et anti-β-actin (mouse antibody, A5441, Sigma, dilution 1 : 4000) dilués dans la solution de TBS-T, 5% lait. Les membranes ont été lavées trois fois avec du TBS-T, incubées avec les anticorps secondaires couplés à la HRP (*horseradish peroxidase*) (goat anti-rabbit IgG (H+L)-HRP, 31460, Invitrogen, dilution 1 : 2000 et goat anti-mouse IgG (H+L)-HRP, 1706516, Bio Rad, dilution 1 : 2000) pendant 1h à température ambiante puis lavées à nouveau trois fois avec du TBS-T. Les signaux ont été révélés à l'aide d'un kit de chimiluminescence (Clarity™ Western ECL Substrate, Biorad) et détectés par un système d'imagerie ChemiDoc (Biorad). Les motifs de densitométrie ont été analysés à l'aide du logiciel ImageJ et normalisés à la densité de la β-actin.

4 – RESULTATS

4.1 – Cellular context shapes cyclic nucleotide signaling in neurons through multiple levels of integration

Auteurs : Pierre Vincent, Liliana Castro, Ségolène Bompierre

Journal of Neuroscience Methods, Octobre 2021

DOI : 10.1016/j.jneumeth.2021.109305

Nous avons tiré profit de la période de confinement pendant la crise sanitaire pour rédiger un article de synthèse concernant l'utilisation de l'imagerie de biosenseurs comme outils permettant une meilleure compréhension de la dynamique des voies de signalisation dans les neurones. Cet article expose les différentes approches méthodologiques permettant de mesurer le FRET, aussi bien sur des cultures neuronales et des tranches de cerveau, qu'*in vivo*. Les valeurs de FRET rendent compte des variations de signaux intracellulaires et, dans le cas de seconds messagers, permettent d'obtenir une estimation des variations de concentration. Nous avons rassemblé un ensemble de publications s'étant intéressées à la dynamique spatio-temporelle des voies de signalisation. D'une part, ces études montrent que la régulation temporelle des seconds messagers permet l'intégration de plusieurs signaux extracellulaires par la même voie de signalisation, notamment via différents types de RCPG. D'autre part, les biosenseurs FRET ont mis en évidence une régulation spatiale des voies de signalisation également impliquée dans la spécificité d'un signal. Nous avons particulièrement mis l'accent sur la fonction des PDE dans la régulation spatio-temporelle de ces voies de signalisation.



Cellular context shapes cyclic nucleotide signaling in neurons through multiple levels of integration[☆]

Pierre Vincent^{*,1}, Liliana R.V. Castro², Ségolène Bompierre³

Sorbonne Université, CNRS, Biological Adaptation and Ageing, UMR 8256, F-75005 Paris, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Biosensor imaging
Cyclic AMP
Cyclic GMP
Dopamine
Norepinephrine
Striatum
Cortex
Hippocampus

ABSTRACT

Intracellular signaling with cyclic nucleotides are ubiquitous signaling pathways, yet the dynamics of these signals profoundly differ in different cell types. Biosensor imaging experiments, by providing direct measurements in intact cellular environment, reveal which receptors are activated by neuromodulators and how the coincidence of different neuromodulators is integrated at various levels in the signaling cascade. Phosphodiesterases appear as one important determinant of cross-talk between different signaling pathways. Finally, analysis of signal dynamics reveal that striatal medium-sized spiny neuron obey a different logic than other brain regions such as cortex, probably in relation with the function of this brain region which efficiently detects transient dopamine.

1. Introduction

Neuromodulatory processes are involved in the regulation of a vast number of neuronal properties in the brain, and a good part of their effect is mediated through cyclic nucleotide second messengers. For example, monoaminergic transmitters (dopamine, noradrenaline, serotonin), acetylcholine, and a wide palette of neuropeptides, play important functional roles through the activation of various selective receptors, which ultimately exert their effect through intracellular second messengers (Björklund and Dunnett, 2007; Iversen and Iversen, 2007; O'Donnell et al., 2012; van den Pol, 2012). This non exhaustive review thus focuses on some recent advances in the understanding of the cAMP/PKA and cGMP/PKG signaling pathways in vertebrate neurons. Genetically-encoded FRET biosensors now provide large signals that are fairly easy to record, and we will briefly describe the ratiometric approach to monitor them. By providing measurements with sub-cellular resolution in primary neuronal cultures, brain slices and even *in vivo*, this approach is literally changing our point of view on pharmacology. While a number of GPCR and downstream signaling

enzymes have been studied in heterologous systems, it is now possible to measure the effect of the natural agonist or pharmacological agents *in situ*, sometimes revealing discrepancies with former approaches. Moreover, since many neuromodulators interact *in vivo*, biosensor imaging can reveal how different signaling pathways interact, in particular through the regulation of phosphodiesterase (PDE) activities. Timing is an important aspect of neurophysiology, and biosensors provide a high temporal resolution to measure transient events. Besides, all these studies provide a vast amount of data in spatial and temporal dimensions, which are priceless for the development of numerical models of intracellular signal integration.

2. Methodology

Historically, conformational changes in proteins were detected by labeling specific amino-acids with fluorophores and then measuring FRET changes between these two fluorophores as an indicator of a change in distance and/or orientation. FRET is a physical process whereby the energy of an excited fluorophore (the donor) is transferred

[☆] To be considered as part of "VSI: Imaging neurotransmission" in a Special Issue on "State of the art imaging of neurotransmission in animal models: From single molecule to neural circuits" with Tommaso Patriarchi and Anna Beyeler as Guest Editors.

* Corresponding author.

E-mail addresses: pierre.vincent@sorbonne-universite.fr (P. Vincent), liliana.ribeiro_vivas_de_castro@sorbonne-universite.fr (L.R.V. Castro), segolene.bompierre@upmc.fr (S. Bompierre).

¹ ORCID: 0000-0002-8479-1908

² ORCID: 0000-0001-8902-089X

³ ORCID: 0000-0003-1140-4409

by resonance to a neighboring fluorophore (the acceptor), a phenomenon that strongly depends on the relative distance and/or orientation between the donor and acceptor (Wouters et al., 2001; Jares-Erijman and Jovin, 2003; Padilla-Parra and Tramier, 2012). The Förster distance is the distance between the donor and acceptor at which 50% of FRET efficiency occurs, generally ranges between 2 and 8 nm. This principle has been applied to create the first sensor for cAMP, FICRhr, using recombinant PKA labeled with fluorescein and rhodamine, and detecting cAMP-induced PKA dissociation by a loss of FRET (Adams et al., 1991). Multicolor variants of GFP allowed for the development of biosensors encoded by a single gene and constituted of a sensor domain sandwiched between two fluorophores. Such biosensors exhibit a change in FRET efficacy when the biological signal of interest changes the conformation of the sensor domain (Zhang et al., 2002; Tsien, 2010).

2.1. Measurement methods

There are different methodological approaches to measure FRET between a donor and an acceptor, of which only two are reliable enough to be routinely used for live imaging of biosensor signals in living cells: intensity-based ratiometry and fluorescence life-time imaging microscopy (FLIM). While FLIM imaging has its own merits that have been largely described (Padilla-Parra and Tramier, 2012; Chen et al., 2014, 2017; Tang and Yasuda, 2017; Ma et al., 2018), including in this issue, the ratiometric approach is somewhat underrated, in particular considering that this method is very simple and cheap to implement, and nonetheless provides low-noise quantitative measurements. The biological signal of interest induces a conformational change of the sensor domain, which leads to a change in FRET efficacy between the donor and acceptor fluorophores. This change in FRET efficacy goes from one FRET level, characteristic of the sensor in the “off” state, to another FRET level, characteristic of the sensor in the “on” state. The FRET change can be an increase, such as with AKAR-type biosensors when phosphorylated by PKA, or a decrease, like Epac-based sensors binding cAMP. Although a measurement of absolute FRET change is interesting for theoretical understanding of biosensor conformational changes, a precise quantification of FRET level is useless in routine live cell measurements: it is sufficient to determine the relative fraction of biosensors in the on and off states. This equilibrium level can be directly derived from the ratio of acceptor (IA) and donor (ID) intensities. In the case of a biosensor in which activation increases FRET, the ratio IA / ID conveniently reports biosensor activation as an increase in ratio measurement. If biosensor activation decreases FRET, the ratio ID / IA reports biosensor activation. In both situations, the measured ratio evolves between the ratio for the biosensor in the off state (Rmin), and the ratio when all the biosensor is in the on state (Rmax).

An important strength of the ratio calculation is the cancellation of various experimental artifacts through the calculation of a ratio. Experimental biases such as changes in biosensor concentration, cell movement, focus drift, are canceled through the ratio calculation, as long as IA and ID are affected in a same linear way. It is important to check whether this main advantage of ratiometric calculation might get lost when corrections such as bleedthrough subtraction or correction for direct excitation of the acceptor are applied to either donor or acceptor intensities. While such corrections makes the maximal ratio change appear larger in amplitude, it may be at the expense of losing the aforementioned advantages of ratiometric correction. Moreover, the added calculation step actually increases the noise in the measurement (Ducros et al., 2009).

2.2. Collecting signal

Ratiometric data are easy to collect with a fluorescence microscope equipped with a single excitation wavelength for the donor, and a device like a filter wheel or an emission splitter to measure fluorescence emission at the wavelengths of donor and acceptor. Wide-field

epifluorescence is commonly used, providing minimal donor excitation - and therefore minimal bleaching -, and allowing for the measurement of a large number of data points (up to several hundred). Even though wide-field fluorescence imaging does not provide optical sectioning, it nevertheless appeared quite easy to monitor individual neurons in brain slice preparations, as long as cell bodies are at a sufficient distance. When unambiguous isolation of individual neurons is required, 3D resolution can be obtained with two-photon microscopy with dual emission (Yapo et al., 2017; Nair et al., 2019). Optical fibers can even be used to ratiometrically monitor a biosensor signal in deep brain regions *in vivo* (Jones-Tabah et al., 2020).

2.3. Signal interpretation

2.3.1. Calculating cAMP concentration in brain slices

The ratiometric measurement is intrinsically quantitative, following principles initially established for chemical calcium dyes like fura-2 (Grynkiewicz et al., 1985; Tsien, 1999), and more recently adapted to cyclic nucleotides (Violin et al., 2008; Mironov et al., 2009; Börner et al., 2011; Russwurm and Koesling, 2018). This calibration uses the EC₅₀ and Hill coefficients, determined *in vitro* for most published cAMP sensors. In addition, the conversion of ratio measurements into cAMP concentrations requires the determination of Rmin and Rmax, which are the ratio values in the absence and in the presence of saturating concentrations of cAMP, respectively. Rmax is obtained by maximally stimulating ACs while inhibiting phosphodiesterases or using a membrane permeant cAMP analogue like 8-Br-2'-O-Me-cAMP-AM. As a routine, we terminate all our experiments with an application of forskolin and IBMX to reach biosensor saturation and determine the Rmax value for each cell. It is more difficult to determine Rmin in every experiment and instead, the average basal cAMP level in a typical set of experiment should be determined: ACs can be inhibited with dideoxy-adenosine, SQ22536 or MDL-12,330A (Mironov et al., 2009; Börner et al., 2011; Castro et al., 2013; Polito et al., 2015), and the hypothesis is made that such inhibition is sufficient for the biosensor to reach Rmin. In striatal spiny neurons, SQ22536 (200 μM) slightly decreased the basal ratio of the Epac-S^{H150} biosensor (Mota et al., 2021). Knowing Rmin, Rmax, EC₅₀ and the Hill coefficient, the ratio value can be converted into an estimate of cAMP concentration (Russwurm and Koesling, 2018).

The conversion of ratio to concentration tends to artificially blow up the noise in traces showing calculated cAMP concentrations when the ratio gets close to Rmin and Rmax. Instead of showing traces converted in cAMP concentration on a log scale, which typically enhances these noises, we rather display and perform statistics on ratio values, and add an axis showing the estimated concentration besides the ratio trace (Mota et al., 2021).

Biosensor sensitivity is indeed a key determinant for the detection of a response and recent sensors considerably improved their dynamic range and signal-to-noise ratio. For example, the first generation of cAMP sensor, Epac1-camps, reported no change in response to several monoamine and neuropeptide neuromodulators (Castro et al., 2010, 2013; Hu et al., 2011). Improved sensors such as ^TEpac^{VV} (Klarenbeek et al., 2011), Epac-S^{H150} (Polito et al., 2013) and Epac-S^{H187} (Klarenbeek et al., 2015) with a much larger maximal ratio change and a fairly extended detection range now allow cAMP measurements over a much broader range of concentration. For example, the β-adrenergic response in pyramidal cortical neurons was much better resolved with newer Epac-S^{H150} (Castro et al., 2010; Luczak et al., 2017). Modest cAMP signal are nonetheless sufficient to activate PKA and trigger cytosolic and nuclear responses of AKAR-type sensors, which thus appear as the most sensitive detectors for this pathway (Castro et al., 2010; Hu et al., 2011; Nomura et al., 2014).

Various biosensors for cGMP have also been developed, which have been reviewed in great details (Russwurm and Koesling, 2018). Two more recent biosensors for cGMP have been described: PfpPKG, with a high sensitivity to cGMP (EC50 of ~20 nM) (Calamera et al., 2019), and

cyGNAL, with less sensitivity to cGMP (EC₅₀ of ~0.5 μM) but better selectivity against cAMP (Betolngar et al., 2019).

2.3.2. Buffering effect

Biosensor concentration may complicate the interpretation of measurements: if the biosensor is present in large excess compared to cAMP, only a small fraction of the biosensor will switch to the on state, and the ratio will report a lower cAMP concentration than what would have occurred if the biosensor were at a lower concentration. In parallel, excessive biosensor concentration, by buffering cAMP, may prevent cAMP action on its physiological targets. Biosensor concentration is usually in the low micromolar range, a concentration that should not affect the biological signal. However, biosensor concentrations of several tens of micromolar can be reached easily (van der Wal et al., 2001; Drobac et al., 2010), where it certainly dampens the cAMP signal. While determining accurately the concentration of a biosensor inside a living cell is technically delicate, it is quite easy to verify the impact of biosensor concentration on the cAMP responses by analyzing the relationship between the amplitude of the cAMP measurement of interest and the biosensor fluorescence level. If such buffering effect were involved, neurons showing a low fluorescence intensity, indicative of low biosensor expression level, should display responses of larger amplitude than neurons showing high fluorescence intensities. Such negative trend was not observed in pyramidal cortical neurons showing that a buffering effect did not affect the responses in these conditions (Castro et al., 2013). However, the buffering effect was clearly observed in vascular smooth muscle cells, with a statistically lower cAMP response in the cells expressing the biosensor at the highest level (Figure 5 in (Vallin et al., 2018)). Simulations using a model built from our biosensor recordings showed that this buffering effect is negligible in striatal medium-sized spiny neurons, in relation with the high turn-over of cAMP in this neuronal type (Yapo et al., 2017).

3. Activation of cyclic nucleotide signaling in situ

Cellular environment plays an important role in receptor function and signal integration. Thus, the choice of differentiated neurons in their physiological context, *i.e.*, in brain slice preparations, is of great importance. It provides morphologically intact neurons, which maintain their functional network connections, as well as endogenous receptor expression.

3.1. Functional receptors in specific neuronal types in situ

3.1.1. Various GPCR in pyramidal cortical neurons

Biosensor imaging are ideal tools to reveal *in situ* which G-protein coupled receptors (GPCR) are involved in a neuromodulator's action. Noradrenaline or adrenaline are released in different brain areas where it modulates the activity of neural circuits and enhances synaptic plasticity, by affecting neuronal and non-neuronal cells (O'Donnell et al., 2012). These transmitters activate, among others, β-adrenergic receptors (β-AR). Mouse pyramidal cortical neurons express both β₁-AR and β₂-AR. Selective pharmacology demonstrated that noradrenaline action on the cAMP/PKA pathway selectively involves β₁-AR (Castro et al., 2010). Photostimulation of channelrhodopsins in the *locus coeruleus* fibers in the neocortex triggers the release of noradrenaline. This release transiently increases PKA responses in somata and dendrites of individual pyramidal cells, and this effect is dampened by the co-activation of α₂ adrenoceptors and by noradrenaline re-uptake (Nomura et al., 2014, 2020; Ma et al., 2018). Functional dopamine D₁-like receptors have also been revealed by AKAR or Epac imaging in pyramidal cortical neurons (Castro et al., 2013; Yapo et al., 2018).

A number of neuropeptides are expressed in the brain, each of them accompanied by a group of cognate GPCR. These neuropeptides are involved in a number of physiological functions, from the control of homeostasis to cognition (van den Pol, 2012). Pyramidal cortical

neurons express VPAC1 and PAC1 receptors, both of which can be activated by the local release of the neuropeptide Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP). These neuropeptides are involved in synaptic transmission and neuronal plasticity, with interesting therapeutic potential to treat cognitive defects (Ciranna and Costa, 2019; Cunha-Reis and Caulino-Rocha, 2020). Using AKAR2 biosensor and pharmacological receptor modulation, Hu et al. (2011) demonstrated that VIP and PACAP action are mostly mediated in neocortical neurons by VPAC1 receptor and PAC1 receptor, respectively (Hu et al., 2011). AKAR measurements also revealed important differences in the efficacy of these neuropeptides, in terms of response amplitude and time-course.

3.1.2. Dopamine receptors in the striatum

Dopamine plays a critical functional role in the striatum, where it binds to D₁ or D₂ receptors, expressed on two distinct sub-populations of medium-sized spiny neurons (MSNs). It is widely accepted that D₂-expressing MSNs respond to low dopamine concentrations, resulting from the tonic activity of dopaminergic inputs, whereas D₁-expressing MSNs respond to the high dopamine concentrations resulting from phasic activity in dopaminergic inputs. This notion derived from binding measurements or analyzing dopamine receptors in heterologous systems, which showed, in these conditions, that D₂ receptors had a much higher affinity for dopamine than D₁ receptors. This static view must be revised with novel evidences indicating that D₂ receptors *in vivo* can exist in low and high affinity states (Skinbjerg et al., 2012). This question could be addressed with biosensor imaging in striatal brain slices, where the effect of dopamine on D₁ and D₂ receptors could be measured simultaneously on the two distinct sub-populations of MSNs. Caged-dopamine (NPEC-DA) was used to deliver dopamine for a short and specific time mimicking transient dopamine. EC₅₀ displayed similar value for D₁ and D₂ MSN in the range of sub-micromolar, differing only by a factor of two (Yapo et al., 2017), a much smaller difference than commonly assumed, but consistent with early biochemical measurements (Enjalbert and Bockaert, 1983; Weiss et al., 1985). Modeling of the cAMP/PKA cascade suggest that, independently of low receptor affinity, D₂-expressing MSNs could respond to an interruption in the tonic release of dopamine (Yapo et al., 2017).

This novel view on dopamine receptor sensitivity was confirmed in an interesting transgenic mouse model expressing ^TEpac^{VV} developed recently: primary neuronal cultures from these animals showed a sensitivity to dopamine that was even higher in D₁ MSNs than in D₂ MSNs (Muntean et al., 2018). This work also analyzed adenosine and opioid responses, and imaged in brain slices cAMP responses to endogenous dopamine released by optogenetic stimulation of dopaminergic neurons (Muntean et al., 2018).

In Parkinson's disease, the degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra deprives the striatum from its physiological dopamine input. This lack of dopamine on D₁ MSNs induces an hypersensitivity through a more efficient D₁R-Golf coupling (Corvol et al., 2004). Biosensor imaging showed these hypersensitive responses in brain slices (Mariani et al., 2019) and *in vivo* (Jones-Tabah et al., 2020).

3.1.3. Monitoring the activation of the cGMP signaling pathway

NO-mediated activation of guanylyl cyclase pathway plays an important role in neurobiology, in synaptic plasticity and in the regulation of glutamate release (Kleppisch and Feil, 2009; Garthwaite, 2019). For example, cerebellar LTD requires glutamate-induced calcium signals, leading to the release of NO and activation of PKG (Daniel et al., 1998). Such signaling cascade was explored in great details using a transgenic mouse line expressing the cGi-500 sensor (Giesen et al., 2020). Using primary cultures and hippocampal and cortical brain slices from this mouse line, the authors characterized the successive steps: a glutamate signal, acting on NMDA and AMPA receptor, triggers a calcium influx through L-type calcium channels which leads to NO production by nNOS enzyme, eventually increasing cGMP.

Another source of cGMP production is the activation of natriuretic peptide receptors. The recent development of highly sensitive cGMP biosensors of the PfPKG series reported cGMP signals in response to brain natriuretic peptide (BNP) in cardiac stellate ganglia (Liu et al., 2018; Calamera et al., 2019).

4. Shaping the cyclic nucleotide signal

4.1. Receptors crosstalk at the level of adenylyl cyclases

Biosensor imaging opens up a novel way to analyze the competing or synergistic interactions between different extracellular signals. Indeed, neurons express a wide diversity of GPCR, some of them coupled to cAMP signaling, either positively or negatively. While the main coupling is generally well documented for each GPCR, it is much more difficult to predict the outcome of simultaneous activation of GPCR coupled in an opposite way, as is occurs in physiological situation.

The sub-population of striatal medium spiny neurons which express G_i -coupled D_2 dopamine receptors also express the G_{olf} -coupled adenosine A_{2A} receptor. Both dopamine and adenosine are present simultaneously in the striatum, with large variations of dopamine levels depending on the tonic or phasic activity of dopaminergic inputs. In the continuous presence of adenosine, biosensor imaging indeed shows that D_2 receptors efficiently switches off cAMP production in spiny neurons, leading to PKA de-activation (Yapo et al., 2017; Mota et al., 2021).

Symmetrically, the other sub-population of striatal medium-sized spiny neurons express the G_{olf} coupled D_1 receptor together with the $G_{i/o}$ -coupled M_4 muscarinic receptor. Although rare in number, cholinergic interneurons in the striatum cover a wide territory with their axonal arborization and play an important functional role (Gonzales and Smith, 2015). While these neurons release acetylcholine tonically, a phasic dopamine signal stops their activity (Aosaki et al., 2010). Theoretical work suggested that this transient lack of acetylcholine might be required to let a positive cAMP signal develop in response to D_1 receptor stimulation (Nair et al., 2015). Biosensor imaging confirmed the high affinity of M_4 muscarinic receptors and their efficacy in shutting-off cAMP production. *In vivo*, this effect of M_4 receptor was sufficient to reverse the increased locomotor activity present in a mouse model of hyperactivity (Nair et al., 2019).

It is interesting to note that MSNs mainly express type 5 adenylyl cyclase, which is specific of this brain region (Matsuoka et al., 1997). Recent molecular modeling work revealed that type 5 adenylyl cyclase can bind both G_s and $G_{i/o}$ simultaneously, switching the catalytic site into the inactive conformation (van Keulen et al., 2019). Whether other adenylyl cyclases in other brain regions also give preeminence to $G_{i/o}$ remains to be determined.

Another signaling situation involving complex receptor to cyclase coupling was addressed with biosensor imaging: the authors show that the activation of M_1 muscarinic receptors, in spite of being coupled to G_q proteins, leads to an activation of an AKAR-type biosensors (Chen et al., 2017). The precise mechanism, which remains to be identified, probably involves calcium and PKC. This work highlights the complexity of cross-talks between signaling pathways and the importance of direct measurements at different levels of a signaling cascade in the native environment.

4.2. Phosphodiesterase activities determine the profile of cyclic nucleotide signals

The cAMP signal results from a constant equilibrium between cAMP production by adenylyl cyclases and cAMP degradation mainly by phosphodiesterases (PDEs), which hydrolyze cAMP and/or cGMP into the AMP and/or GMP. More than 50 PDE isoforms, encoded by 21 genes have been described so far (Keravis and Lugnier, 2012). In the last decade, the development of a large palette of specific PDE inhibitors allowed for a better understanding of specific phosphodiesterase

functions in cAMP and/or cGMP signaling in various cell types (Maurice et al., 2014; Baillie et al., 2019), in parallel with the development of a number of novel drug development programs (Menniti et al., 2006; Baillie et al., 2019). Indeed, multiple PDE isoforms are expressed in a same cell, with specific regulatory domains, enzymatic properties and multiple intracellular localizations. Their affinity for different substrate concentrations as well as modulation by other intracellular signals, places them at the crossroad between different signaling pathways, allowing for a finely tuned interplay between different neuromodulatory signals.

4.2.1. PDE10A: a major regulator of cAMP/PKA signals in the striatum

The complexity of the regulation exerted by PDEs can be observed in striatal neurons, which express high levels of PDE1B, PDE2A and PDE10A, and moderate levels of PDE4B (Seeger et al., 2003; Coskran et al., 2006; Heiman et al., 2008; Lakics et al., 2010; Kelly et al., 2014). The PDE10A protein is present almost exclusively and at very high levels in both D1 and D2 MSNs (Seeger et al., 2003; Coskran et al., 2006; Lakics et al., 2010). PDE10A displays high (sub-micromolar) affinity for cAMP (Wang et al., 2007; Poppe et al., 2008) and biosensor imaging highlights PDE10A as the main regulator of tonic AMP production by adenylyl cyclases (Polito et al., 2015).

In addition, PDE10A shows a prominent functional role in the regulation of the cAMP/PKA response in both D1 and D2 MSNs (Mota et al., 2021), as shown by cAMP measurements in striatal brain slices. This work showed that PDE10A is required to degrade cAMP to a sufficiently low level to allow for PKA de-activation: when PDE10A is blocked, dopamine signals can no longer be detected at the level of PKA. Previous studies showed differences between D1 and D2 MSNs in their responsiveness to PDE10A inhibitors, both *in vivo* and in brain slices (Threlfell et al., 2009; Polito et al., 2015). This D2/D1 imbalance was consistent with PDE10A inhibitors mimicking the D_2 antagonistic action of antipsychotic agents, which had sparked considerable interest in PDE10A as a potential therapeutic target to treat schizophrenia (Kehler and Nielsen, 2011; Schülke and Brandon, 2017; Harada et al., 2020). So far, this hope has not met clinical success (Menniti et al., 2020), possibly because inhibiting such an essential signaling enzyme profoundly destabilizes signal integration in MSNs (Mota et al., 2021). Compared to PDE10A, PDE2A and PDE4 display much lower affinity for cAMP and therefore preferentially regulate high cAMP concentration. Although not critically required, modulation of these PDEs may be of therapeutic interest, since they determine the maximal amplitude as well as steady-state cAMP levels that can be obtained in striatal neurons with dopamine or adenosine (Mota et al., 2021).

4.2.2. PDE2A: Mediator of the NO/cGMP signaling

PDEs can mediate interactions between different signaling pathways. For example, LTS interneurons in the striatum express high levels of neuronal nitric oxide synthase (Tepper et al., 2018), suggesting that NO may play a role in the regulation of dopamine action. Indeed, NO diffuses throughout the striatum and activates cGMP production by soluble guanylyl cyclases (GCs), which is highly expressed in MSNs (Ariano et al., 1982; Matsuoka et al., 1992; Ding et al., 2004). Biosensor imaging clearly confirmed the powerful activating action of NO donors on cGMP production in various brain regions (Hepp et al., 2007; Betolngar et al., 2019; Giesen et al., 2020). This cGMP signal can activate PDE2A, which specific feature is its allosteric activation by cGMP binding to a regulatory domain. cAMP/PKA imaging showed that this NO/cGMP/PDE2A cascade indeed reduced cAMP and PKA responses triggered by transient dopamine in striatal neurons (Polito et al., 2013). A similar observation was made in hippocampal and cortical neurons, where PDE2A contributes efficiently to the degradation of glutamate-induced cGMP signal (Giesen et al., 2020). However, and in agreement with its low affinity for cAMP, PDE2A only regulates high cAMP levels such as those reached during peak cAMP response to D_1 receptor stimulation, or elevated steady-state cAMP levels induced by the activation of adenosine A_{2A}

receptors (Mota et al., 2021).

The fragile X syndrome (FXS) is a neurodevelopmental disease leading to inherited intellectual disability. The FMR1 gene encoding the fragile X mental retardation protein (FMRP) is not expressed in this disorder. FXS patient and Fmr1-KO mice have a deficit in the regulation of mRNA translation in neuronal cells. One target of FMRP is PDE2A (Maurin et al., 2018) and in Fmr1-KO mice, enhanced PDE2A activity was observed in hippocampal slices expressing the cAMP biosensor Epac-S^{H150} (Maurin et al., 2019). Pharmacological inhibition of PDE2A durably reversed the behavioral phenotype of Fmr1-KO mice, suggesting a novel therapeutic strategy for the treatment of mental retardation.

In peripheral neurons, PDE2A also plays an important role in the regulation of cardiac neurotransmission (Liu et al., 2018; Li and Pateron, 2019). More precisely, in cardiac stellate ganglia, brain natriuretic peptide (BNP) efficiently regulates norepinephrin release, through an increase in cGMP signaling. In rats and human patients with sympathetic hyperactivity, the effect of BNP/cGMP signaling is reduced due to enhanced PDE2A activity. Interestingly, inhibition of PDE2A activity restored norepinephrin levels induced by the BNP/cGMP, suggesting that PDE2A may be a therapeutic target to reduce sympathetic hyperactivity (Liu et al., 2018).

4.2.3. PDE1B: mediator of Glutamate/Ca²⁺ signaling

PDE1, which is activated by calcium-calmodulin, is highly expressed throughout the brain. PDE1 degrades both cAMP and cGMP, with a relatively low substrate affinity. While cGMP was produced as a result of calcium influx and nNOS activation, this intracellular calcium also activated PDE1 which largely contributed to the degradation of cGMP, in a negative feedback loop (Giesen et al., 2020). The details of PDE1 action was also studied in brain slice preparations where NMDA uncaging transiently decreased cGMP or cAMP levels, an effect lost in the presence of a highly selective PDE1 inhibitor (Betolngar et al., 2019). Such transient PDE1 activation may be of particular importance when dopamine is released simultaneously with glutamate or with a post-synaptic action potential, a situation known to induce synaptic plasticity. Indeed, in striatum slices, simultaneous release of dopamine and NMDA showed that PDE1 activity reduces the amplitude of the D1-mediated cAMP response (Betolngar et al., 2019). Finally, synaptic plasticity appeared enhanced when PDE1 was inhibited (Betolngar et al., 2019), suggesting that PDE1 inhibition may be a novel therapeutic strategy to treat cognitive deficits (Li et al., 2016; Snyder et al., 2016).

5. Spatial and temporal integration

5.1. cAMP/PKA compartmentation in developing neurons

Even though cAMP is a small water-soluble molecule that diffuses freely in the cytosol, the propagation of a cAMP signal throughout the cell is severely constrained by the highly efficacious degradation mediated by phosphodiesterases. Since cAMP is produced at the plasma membrane and degraded by membrane and cytosolic PDEs, local cell geometry - i.e. surface to volume ratio - plays a critical role in the propagation of this signal. This is of particular importance in the case of neurons which bear cellular compartments of widely different sizes. In addition, local changes in the density of signaling enzymes adds a further level of complexity to signaling compartmentation. For example, PDE interaction with scaffolding proteins, such as AKAP, favors the local degradation of cAMP and efficiently controls the spread of cAMP around its production site. This regulation was observed in a recent study in which an AKAR sensor was targeted to the peri-nuclear compartment in embryonic cultured neurons. This work revealed an mAKAP-PKA-PDE4D complex at the peri-nuclear membrane that efficiently controls neurite growth and neuron survival (Boczek et al., 2019).

Spatially regulated cAMP signals were also observed in the axonal compartment, in early stages of the embryonic development. At later developmental stages, this axonal compartmentation achieved by AKAP-

PDE is reduced, and the cAMP signal rises locally in the axon favoring axonal growth (Averaimo et al., 2016; Gorshkov et al., 2017).

Another important sub-cellular compartment in immature migrating neurons is the primary cilium. This small organelle forms close to the centrosome and changes dynamically during the various migration steps. The cAMP biosensor Epac-S^{H187} revealed that this primary cilium is associated with a cAMP hot spot that forms transiently in the leading process of the migrating neuron, in synch with the different steps of cell movement (Stoufflet et al., 2020).

5.2. Membrane - cytosol - nucleus attenuation in most neurons

In pyramidal cortical neurons or intralaminar thalamic neurons, cAMP levels in the somatic cytosol remain relatively low, in the sub-micromolar range, in response to the activation of a wide range of GPCR, such as serotonin 5-HT₇, dopamine D₁, β_1 -adrenergic or neuropeptide receptors (Gervasi et al., 2007; Castro et al., 2010, 2013; Hu et al., 2011; Nomura et al., 2014). This low cAMP response is sufficient to trigger PKA activation, that differed in amplitude and kinetics depending on the compartment where the signal was recorded (Fig. 1A,B). For example, in thin dendrites where the biosensor reports the signal mainly in the sub-membrane compartment, cAMP accumulates easily and activates PKA, but its concentration fades away in the somatic cytosol and large primary dendrites (Castro et al., 2010; Luczak et al., 2017; Tang and Yasuda, 2017). Electrophysiological recordings of a PKA-sensitive potassium channel confirmed that full and fast PKA activation occurs at the sub-membrane domain. This effect has been theoretically predicted and would be favored by a higher surface to volume ratio, leading to cAMP accumulation in a confined space and its functional coupling with PKA and target channels (Neves et al., 2008; Luczak et al., 2017). It must be noted that when the AKAR biosensor is targeted to microtubules, the time-course of the biosensor is faster - similar to the time-course of sAHP modulation - than the AKAR signal measured in the bulk cytosol, illustrating the importance of sub-cellular compartmentation of PKA action (Ma et al., 2018).

In pyramidal cortical neurons and thalamic neurons, the targeting of the AKAR sensor to the nuclear compartment clearly shows that the PKA signal in the nucleus is further dampened in both amplitude and kinetics, with more than 10 min being required to get a sizable nuclear response (Gervasi et al., 2007) (Fig. 1B). This effect is in agreement with the passive diffusion of the catalytic subunit of PKA through the nuclear pore (Hagiwara et al., 1993; Harootunian et al., 1993) as well as high phosphatase activity. Indeed, type 1 phosphatase (PP-1) efficiently counteracts PKA activity in the nuclear compartment, and is probably responsible for the lower sensitivity of these neurons to initiate gene expression in response to brief dopamine stimulations (Castro et al., 2013; Yapo et al., 2018).

In the cytoplasm and sub-membrane compartment, the major negative control of intracellular cAMP is achieved by PDE4. In thin dendrites, PDE4 tightly controls tonic cAMP production, PKA activation and consequently neuronal excitability (Castro et al., 2010, 2013). This regulation of tonic cAMP level probably allows for multiple possibilities of signal integration and cross-talks with other cascades. Since PDE4 inhibitors can render the neurons responsive to low levels of agonist, it probably restores or amplifies the postsynaptic response when neuro-modulator levels fall or loose part of their effect, such as in depressive or memory disorders (Bolger, 2017; Blokland et al., 2019).

Overall, this profile of rapid and powerful cAMP/PKA responses at the sub-membrane compartment that progressively fades as the signal progresses through the cytosol and into the nucleus is the most commonly accepted mechanism for cAMP/PKA signaling and was also reported in many other cell types (DiPilato et al., 2004; Sample et al., 2012; Haj Slimane et al., 2014; Yang et al., 2014).

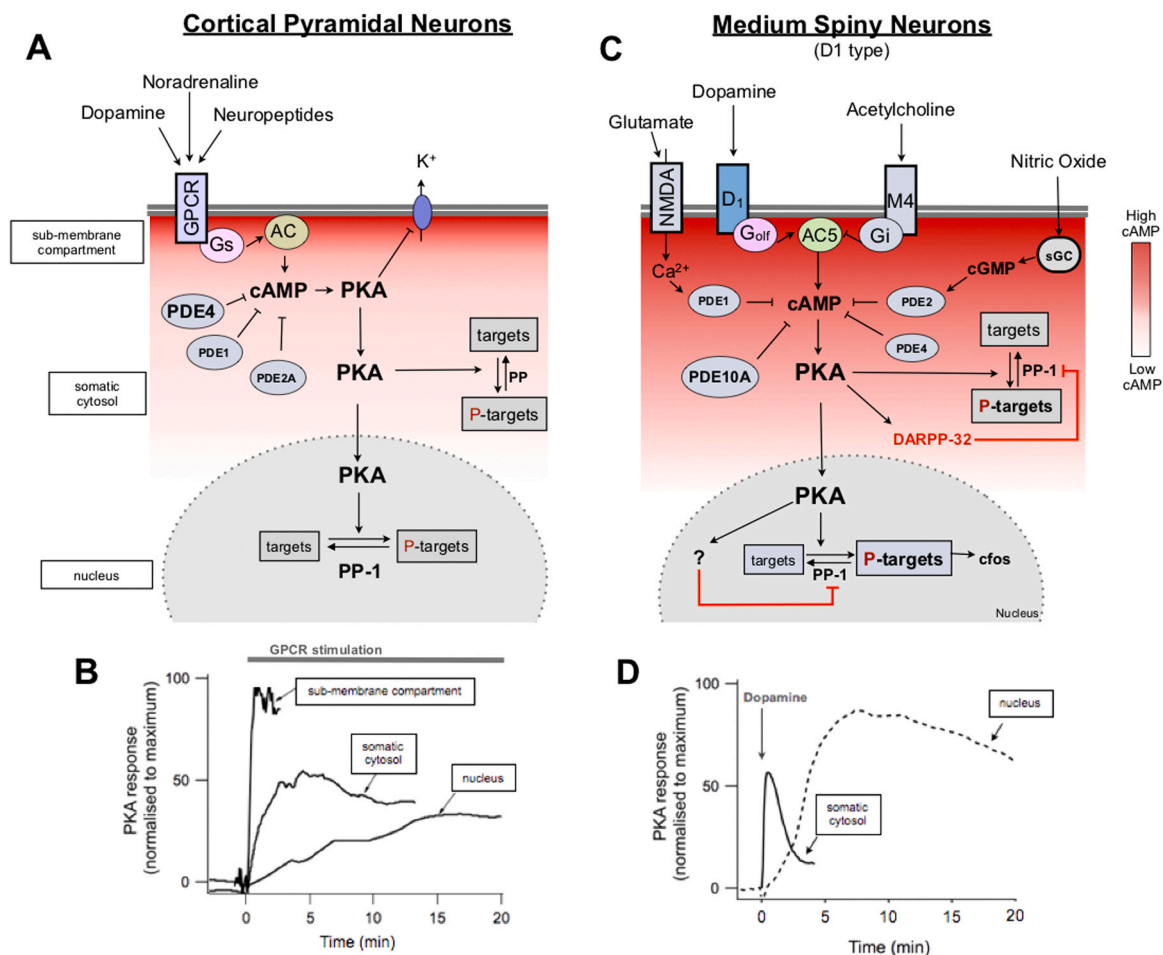


Fig. 1. Schematic representation of the cAMP/PKA signaling pathway and its regulation in pyramidal neurons of the cortex and in medium-sized spiny neurons (MSNs) of the striatum. A) In cortical pyramidal neurons (as in many other cell types), G protein coupled receptor stimulation results in a moderate increase in cAMP level and PKA activation, that is progressively attenuated as it diffuses from the membrane through the cytosol and into the nucleus. B) PKA-dependent phosphorylation is measured electrophysiologically in the sub-membrane compartment through the inhibition of a potassium current, using the AKAR2 biosensor in the somatic cytosol and using AKAR2-NLS in the nucleus, showing decreasing efficacy and slower action (Gervasi et al., 2007); copyright 2007 Society for Neuroscience. C) Striatal D1-type medium spiny neurons (MSNs) can detect brief dopamine release and induce a large increase in cAMP/PKA signaling with a specific temporal profile. D) Dopamine (1 μ M) was released from a “caged” precursor by a flash of UV light while PKA-dependent phosphorylation was monitored in the cytosol with AKAR3 (plain trace) and in the nucleus with AKAR2-NLS, as described in (Yapo et al., 2018): in contrast with the cortex, a brief cytosolic signal of moderate amplitude is associated with a much larger and longer lasting nuclear signal.

5.3. Specific dynamic features of striatal neurons

In vivo, phasic dopamine release in the striatum lasts less than a second, but is sufficient to modulate striatal plasticity and trigger the induction of gene expression (Howard et al., 2013). In brain slices, dopamine released from caged precursor or from dopaminergic fibers by optogenetic stimulation induces a robust PKA response (Yapo et al., 2017; Ma et al., 2018). This transient release of dopamine triggers transient and opposite cAMP/PKA responses in D1 and D2 MSNs over a time scale of a few minutes. Surprisingly, the profile of signal transduction in MSNs profoundly differ from what was observed in cortical pyramidal neurons, described above (Fig. 1A–C). D1-type MSNs exhibit much faster, larger, and longer lasting cytosolic cAMP and PKA responses (Castro et al., 2013). This high sensitivity is most likely related to the expression of an unusual set of signaling enzymes in MSNs, such as $G_{\alpha olf}$ instead of G_s , type 5 adenylyl cyclases (Matsuoka et al., 1997), PDE10A (Seeger et al., 2003; Coskran et al., 2006; Lakics et al., 2010) and dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein 32 kDa (DARPP-32) (Nishi et al., 2011). DARPP-32, when phosphorylated by PKA, becomes a strong inhibitor of type 1-phosphatase (PP-1) activity (Hemmings et al., 1984; Svenningsson et al., 2005). This positive

feed-forward control amplifies PKA response by increasing the duration of cytosolic PKA responses to transient dopamine in D1 MSNs (Castro et al., 2013). DARPP-32 is also required for spine enlargement (Yagishita et al., 2014). Such mechanism also promotes a peculiar all-or-none responsiveness in the nuclear compartment and was associated with the expression of c-fos (Yapo et al., 2018) (Fig. 1D). Biosensor imaging and computer modeling suggest that striatal PKA follows the classic mechanism of passive diffusion of the catalytic sub-unit from the cytoplasm through the nucleus, but with an additional amplification of its own diffusion in the nuclear compartment at the level of the nuclear pore. An additional amplification mechanism is based on PP-1 inhibition in the nucleus, possibly mediated by DARPP-32. Such positive feed-forward control loop clearly contributes to produce all or none responses to dopamine (Yapo et al., 2018).

Beyond these specific biochemical features, neuronal geometry also adds more complexity to the integration of dopamine signals. An observation of importance is that, depending on the location where the cAMP/PKA signal is initiated in the dendritic tree, its propagation through the dendritic tree towards the nucleus does not follow the expected linear diffusion pattern (Li et al., 2015). In another study, the authors analyzed dendritic spine enlargement following the coincident

release of glutamate, dopamine, and post-synaptic action potential (Yagishita et al., 2014). This effect requires DARPP-32, as well as the calcium-activated adenylyl cyclase 1. This work also reports a decrease in the PKA response to dopamine release as the distance from the cell body increases, an effect that depends on PDE10A activity. This is the opposite of what was observed in the cortex, possibly because PDE10A is associated with the membrane whereas PDE4 is cytosolic. Most importantly, spine enlargement was only observed when preceded in less than 1 s by a calcium signal, and biosensor imaging revealed the successive steps for achieving this temporal specificity. This highlights the importance of the precise timing and spatial localization of signaling events in a fundamental process involved in learning and memory.

6. Perspectives

There are many steps in the integration of an extracellular neuro-modulatory signal to a change in phosphorylation of a target protein, and each of these steps allow for cross-talks with other signaling pathways. These events take place in different sub-cellular compartments, with different geometries and different equipments in signaling enzymes. In most cases, the signal gets progressively attenuated during its journey through different cell compartments, consistent with homeostasis tending to reduce any deviation from equilibrium. MSNs clearly depart from this logic by integrating very efficiently brief dopamine signals - a core feature of reward-mediated learning - into powerful cAMP/PKA signals, a feature associated with the expression of unusual signaling enzymes. Further work is needed to explore other brain regions - and possibly *in vivo* -, to determine if other specific neurobiological functions are associated with other peculiarities of integration mechanisms.

Funding

This work was supported by Association France Parkinson, France.

CRedit authorship contribution statement

Pierre Vincent: Writing – review & editing. **Liliana R.V. Castro:** Writing – review & editing. **Ségolène Bompierre:** Writing – review & editing.

Acknowledgments

We thank Mrs Violette for helpful discussions, and R.A.A. for providing excellent temporary work conditions.

Competing interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Adams, S.R., Harootunian, A.T., Buechler, Y.J., Taylor, S.S., Tsien, R.Y., 1991. Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells. *Nature* 349, 694–697. <https://doi.org/10.1038/349694a0>.
- Aosaki, T., Miura, M., Suzuki, T., Nishimura, K., Masuda, M., 2010. Acetylcholine-dopamine balance hypothesis in the striatum: an update. *Geriatr. Gerontol. Int.* 10 (Suppl 1 (Suppl 1)), 148–157. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0594.2010.00588.x>.
- Ariano, M.A., Lewicki, J.A., Brandwein, H.J., Murad, F., 1982. Immunohistochemical localization of guanylate cyclase within neurons of rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 1316–1320.
- Averaimo, S., Assali, A., Ros, O., Couvet, S., Zagar, Y., Genescu, I., Rebsam, A., Nicol, X., 2016. A plasma membrane microdomain compartmentalizes ephrin-generated cAMP signals to prune developing retinal axon arbors. *Nat. Commun.* 7, 12896. <https://doi.org/10.1038/ncomms12896>.
- Baillie, G.S., Tejada, G.S., Kelly, M.P., 2019. Therapeutic targeting of 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases: inhibition and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.* 18, 770–796. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0033-4>.
- Betolngar, D.B., Mota, É., Fabritius, A., Nielsen, J., Hougaard, C., Christoffersen, C.T., Yang, J., Kehler, J., Griesbeck, O., Castro, L.R.V., Vincent, P., 2019. Phosphodiesterase 1 bridges glutamate inputs with NO- and dopamine-induced cyclic nucleotide signals in the striatum. *Cereb. Cortex* 29, 5022–5036. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhz041>.
- Björklund, A., Dunnett, S.B., 2007. Fifty years of dopamine research. *Trends Neurosci.* 30, 185–187. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.004>.
- Blokland, A., Van Duinen, M.A., Sambeth, A., Heckman, P.R.A., Tsai, M., Lahu, G., Uz, T., Prickaerts, J., 2019. Acute treatment with the PDE4 inhibitor roflumilast improves verbal word memory in healthy old individuals: a double-blind placebo-controlled study. *Neurobiol. Aging* 77, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2019.01.014>.
- Boczek, T., Cameron, E.G., Yu, W., Xia, X., Shah, S.H., Castillo Chabeco, B., Galvao, J., Nahmou, M., Li, J., Thakur, H., Goldberg, J.L., Kapiloff, M.S., 2019. Regulation of neuronal survival and axon growth by a perinuclear cAMP compartment. *J. Neurosci.* 39, 5466–5480. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2752-18.2019>.
- Bolger, G.B., 2017. The PDE4 cAMP-specific phosphodiesterases: targets for drugs with antidepressant and memory-enhancing action. *Adv. Neurobiol.* 17, 63–102. https://doi.org/10.1007/978-3-319-58811-7_4.
- Börner, S., Schwede, F., Schlipp, A., Berisha, F., Calebiro, D., Lohse, M.J., Nikolaev, V.O., 2011. FRET measurements of intracellular cAMP concentrations and cAMP analog permeability in intact cells. *Nat. Protoc.* 6, 427–438. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.198>.
- Calamera, G., Li, D., Ulsund, A.H., Kim, J.J., Neely, O.C., Moltzau, L.R., Bjørnerem, M., Paterson, D., Kim, C., Levy, F.O., Andressen, K.W., 2019. FRET-based cyclic GMP biosensors measure low cGMP concentrations in cardiomyocytes and neurons. *Commun. Biol.* 2, 394. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0641-x>.
- Castro, L.R., Brito, M., Guiot, E., Polito, M., Korn, C.W., Herve, D., Girault, J.A., Paupardin-Tritsch, D., Vincent, P., 2013. Striatal neurones have a specific ability to respond to phasic dopamine release. *J. Physiol.* 591, 3197–3214. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.252197>.
- Castro, L.R., Gervasi, N., Guiot, E., Cavellini, L., Nikolaev, V.O., Paupardin-Tritsch, D., Vincent, P., 2010. Type 4 phosphodiesterase plays different integrating roles in different cellular domains in pyramidal cortical neurons. *J. Neurosci.* 30, 6143–6151. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5851-09.2010>.
- Chen, Y., Granger, A.J., Tran, T., Saulnier, J.L., Kirkwood, A., Sabatini, B.L., 2017. Endogenous Gαq-coupled neuromodulator receptors activate protein kinase A. *Neuron* 96, 1070–1083.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.10.023>.
- Chen, Y., Saulnier, J.L., Yellen, G., Sabatini, B.L., 2014. A PKA activity sensor for quantitative analysis of endogenous GPCR signaling via 2-photon FRET-FLIM imaging. *Front. Pharm.* 5, 56. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00056>.
- Ciranna, L., Costa, L., 2019. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulates hippocampal synaptic transmission and plasticity: new therapeutic suggestions for fragile X syndrome. *Front. Cell Neurosci.* 13, 524. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00524>.
- Corvol, J.C., Muriel, M.P., Valjent, E., Feger, J., Hanoun, N., Girault, J.A., Hirsch, E.C., Herve, D., 2004. Persistent increase in olfactory type G-protein alpha subunit levels may underlie D1 receptor functional hypersensitivity in Parkinson disease. *J. Neurosci.* 24, 7007–7014. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0676-04.2004>.
- Coskran, T.M., Morton, D., Menniti, F.S., Adamowicz, W.O., Kleiman, R.J., Ryan, A.M., Strick, C.A., Schmidt, C.J., Stephenson, D.T., 2006. Immunohistochemical localization of phosphodiesterase 10A in multiple mammalian species. *J. Histochem Cytochem* 54, 1205–1213. <https://doi.org/10.1369/jhc.6A6930.2006>.
- Cunha-Reis, D., Caulino-Rocha, A., 2020. VIP modulation of hippocampal synaptic plasticity: a role for VIP receptors as therapeutic targets in cognitive decline and mesial temporal lobe epilepsy. *Front. Cell Neurosci.* 14, 153. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00153>.
- Daniel, H., Levenes, C., Crepel, F., 1998. Cellular mechanisms of cerebellar LTD. *Trends Neurosci.* 21, 401–407.
- Ding, J.D., Burette, A., Nedvetsky, P.I., Schmidt, H.H., Weinberg, R.J., 2004. Distribution of soluble guanylyl cyclase in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 472, 437–448.
- DiPilato, L.M., Cheng, X., Zhang, J., 2004. Fluorescent indicators of cAMP and Epac activation reveal differential dynamics of cAMP signaling within discrete subcellular compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 16513–16518. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405973101>.
- Drobac, E., Tricoire, L., Chaffotte, A.F., Guiot, E., Lambolez, B., 2010. Calcium imaging in single neurons from brain slices using bioluminescent reporters. *J. Neurosci. Res.* 88, 695–711. <https://doi.org/10.1002/jnr.22249>.
- Ducros, M., Moreaux, L., Bradley, J., Tiret, P., Griesbeck, O., Charpak, S., 2009. Spectral unmixing: analysis of performance in the olfactory bulb in vivo. *PLoS One* 4, 4418. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004418>.
- Enjalbert, A., Bockaert, J., 1983. Pharmacological characterization of the D2 dopamine receptor negatively coupled with adenylyl cyclase in rat anterior pituitary. *Mol. Pharm.* 23, 576–584.
- Garthwaite, J., 2019. NO as a multimodal transmitter in the brain: discovery and current status. *Br. J. Pharm.* 176, 197–211. <https://doi.org/10.1111/bph.14532>.
- Gervasi, N., Hepp, R., Tricoire, L., Zhang, J., Lambolez, B., Paupardin-Tritsch, D., Vincent, P., 2007. Dynamics of protein kinase A signaling at the membrane, in the cytosol, and in the nucleus of neurons in mouse brain slices. *J. Neurosci.* 27, 2744–2750. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5352-06.2007>.
- Giesen, J., Füchtbauer, E.M., Füchtbauer, A., Funke, K., Koesling, D., Russwurm, M., 2020. AMPA induces NO-dependent cGMP signals in hippocampal and cortical neurons via L-type voltage-gated calcium channels. *Cereb. Cortex* 30, 2128–2143. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhz227>.
- Gonzales, K.K., Smith, Y., 2015. Cholinergic interneurons in the dorsal and ventral striatum: anatomical and functional considerations in normal and diseased conditions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1349, 1–45. <https://doi.org/10.1111/nyas.12762>.

- Gorshkov, K., Mehta, S., Ramamurthy, S., Ronnett, G.V., Zhou, F.Q., Zhang, J., 2017. AKAP-mediated feedback control of cAMP gradients in developing hippocampal neurons. *Nat. Chem. Biol.* 13, 425–431. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2298>.
- Gryniewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y., 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440–3450.
- Hagiwara, M., Brindle, P., Harootyan, A., Armstrong, R., Rivier, J., Vale, W., Tsien, R., Montminy, M.R., 1993. Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. *Mol. Cell Biol.* 13, 4852–4859.
- Haj Slimane, Z., Bedioune, I., Lechene, P., Varin, A., Lefebvre, F., Mateo, P., Domergue-Dupont, V., Dewenter, M., Richter, W., Conti, M., El-Armouche, A., Zhang, J., Fischmeister, R., Vandecasteele, G., 2014. Control of cytoplasmic and nuclear protein kinase A by phosphodiesterases and phosphatases in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* 102, 97–106. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu029>.
- Harada, A., Kaushal, N., Suzuki, K., Nakatani, A., Bobkov, K., Vekich, J.A., Doyle, J.P., Kimura, H., 2020. Balanced activation of striatal output pathways by faster off-rate PDE10A inhibitors elicits not only antipsychotic-like effects but also procognitive effects in rodents. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 23, 96–107. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyz056>.
- Harootyan, A.T., Adams, S.R., Wen, W., Meinkoth, J.L., Taylor, S.S., Tsien, R.Y., 1993. Movement of the free catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase into and out of the nucleus can be explained by diffusion. *Mol. Biol. Cell* 4, 993–1002.
- Heiman, M., Schaefer, A., Gong, S., Peterson, J.D., Day, M., Ramsey, K.E., Suarez-Farinas, M., Schwarz, C., Stephan, D.A., Surmeier, D.J., Greengard, P., Heintz, N., 2008. A translational profiling approach for the molecular characterization of CNS cell types. *Cell* 135, 738–748. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.028>.
- Hemmings, H.C.J., Greengard, P., Tung, H.Y., Cohen, P., 1984. DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature* 310, 503–505.
- Hepp, R., Tricoire, L., Hu, E., Gervasi, N., Paupardin-Tritsch, D., Lamboloz, B., Vincent, P., 2007. Phosphodiesterase type 2 and the homeostasis of cyclic GMP in living thalamic neurons. *J. Neurochem.* 102, 1875–1886. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04657.x>.
- Howard, C.D., Pastuzyn, E.D., Barker-Haliski, M.L., Garris, P.A., Keefe, K.A., 2013. Phasic-like stimulation of the medial forebrain bundle augments striatal gene expression despite methamphetamine-induced partial dopamine denervation. *J. Neurochem.* 125, 555–565. <https://doi.org/10.1111/jnc.12234>.
- Hu, E., Demmou, L., Cauli, B., Gallopin, T., Geoffroy, H., Harris-Warrick, R.M., Paupardin-Tritsch, D., Lamboloz, B., Vincent, P., Hepp, R., 2011. VIP, CRF, and PACAP act at distinct receptors to elicit different cAMP/PKA dynamics in the neocortex. *Cereb. Cortex* 21, 708–718. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhq143>.
- Iversen, S.D., Iversen, L.L., 2007. Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci.* 30, 188–193. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.002>.
- Jares-Erijman, E.A., Jovin, T.M., 2003. FRET imaging. *Nat. Biotechnol.* 21, 1387–1395.
- Jones-Tabah, J., Mohammad, H., Hadj-Youssef, S., Kim, L.E.H., Martin, R.D., Benaliouad, F., Tanny, J.C., Clarke, P.B.S., Hébert, T.E., 2020. Dopamine D1 receptor signalling in dyskinetic Parkinsonian rats revealed by fiber photometry using FRET-based biosensors. *Sci. Rep.* 10, 14426. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71121-8>.
- Kehler, J., Nielsen, J., 2011. PDE10A inhibitors: novel therapeutic drugs for schizophrenia. *Curr. Pharm. Des.* 17, 137–150. <https://doi.org/10.2174/138161211795049624>.
- Kelly, M.P., Adamowicz, W., Bove, S., Hartman, A.J., Mariga, A., Pathak, G., Reinhart, V., Romegialli, A., Kleiman, R.J., 2014. Select 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases exhibit altered expression in the aged rodent brain. *Cell Signal* 26, 383–397. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.10.007>.
- Keravits, T., Lugnier, C., 2012. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. *Br. J. Pharm.* 165, 1288–1305. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01729.x>.
- Klarenbeek, J., Goedhart, J., van Batenburg, A., Groenewald, D., Jalink, K., 2015. Fourth-generation epac-based FRET sensors for cAMP feature exceptional brightness, photostability and dynamic range: characterization of dedicated sensors for FLIM, for ratiometry and with high affinity. *PLoS One* 10, 0122513. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122513>.
- Klarenbeek, J.B., Goedhart, J., Hink, M.A., Gadella, T.W., Jalink, K., 2011. A mTurquoise-based cAMP sensor for both FLIM and ratiometric read-out has improved dynamic range. *PLoS One* 6, 19170. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019170>.
- Kleppisch, T., Feil, R., 2009. cGMP signalling in the mammalian brain: role in synaptic plasticity and behaviour. *Handb. Exp. Pharm.* 549–579. https://doi.org/10.1007/978-3-540-68964-5_24.
- Lakics, V., Karran, E.H., Boess, F.G., 2010. Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. *Neuropharmacology* 59, 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.05.004>.
- Li, D., Paterson, D.J., 2019. Pre-synaptic sympathetic calcium channels, cyclic nucleotide-coupled phosphodiesterases and cardiac excitability. *Semin Cell Dev. Biol.* 94, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.01.010>.
- Li, L., Gervasi, N., Girault, J.A., 2015. Dendritic geometry shapes neuronal cAMP signalling to the nucleus. *Nat. Commun.* 6, 6319. <https://doi.org/10.1038/ncomms7319>.
- Li, P., Zheng, H., Zhao, J., Zhang, L., Yao, W., Zhu, H., Beard, J.D., Ida, K., Lane, W., Snell, G., Sogabe, S., Heyser, C.J., Snyder, G.L., Hendrick, J.P., Vanover, K.E., Davis, R.E., Wennogle, L.P., 2016. Discovery of potent and selective inhibitors of phosphodiesterase 1 for the treatment of cognitive impairment associated with neurodegenerative and neuropsychiatric diseases. *J. Med. Chem.* 59, 1149–1164. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01751>.
- Liu, K., Li, D., Hao, G., McCaffary, D., Neely, O., Woodward, L., Ioannides, D., Lu, C.J., Brescia, M., Zaccolo, M., Tandri, H., Ajijola, O.A., Ardell, J.L., Shivkumar, K., Paterson, D.J., 2018. Phosphodiesterase 2A as a therapeutic target to restore cardiac neurotransmission during sympathetic hyperactivity. *JCI Insight* 3. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.98694>.
- Luczak, V., Blackwell, K.T., Abel, T., Girault, J.A., Gervasi, N., 2017. Dendritic diameter influences the rate and magnitude of hippocampal cAMP and PKA transients during β -adrenergic receptor activation. *Neurobiol. Learn Mem.* 138, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.08.006>.
- Ma, L., Jongbloets, B.C., Xiong, W.H., Melander, J.B., Qin, M., Lameyer, T.J., Harrison, M.F., Zemelman, B.V., Mao, T., Zhong, H., 2018. A highly sensitive A-kinase activity reporter for imaging neuromodulatory events in awake mice. *Neuron* 99, 665–679. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.07.020>.
- Mariani, L.L., Longueville, S., Girault, J.A., Hervé, D., Gervasi, N., 2019. Differential enhancement of ERK, PKA and Ca²⁺ signaling in direct and indirect striatal neurons of Parkinsonian mice. *Neurobiol. Dis.* 130, 104506. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104506>.
- Matsuoka, I., Giuli, G., Poyard, M., Stengel, D., Parma, J., Guellaen, G., Hanoune, J., 1992. Localization of adenylyl and guanylyl cyclase in rat brain by *in situ* hybridization: comparison with calmodulin mRNA distribution. *J. Neurosci.* 12, 3350–3360.
- Matsuoka, I., Suzuki, Y., Defer, N., Nakanishi, H., Hanoune, J., 1997. Differential expression of type I, II, and V adenylyl cyclase gene in the postnatal developing rat brain. *J. Neurochem.* 68, 498–506.
- Maurice, D.H., Ke, H., Ahmad, F., Wang, Y., Chung, J., Manganiello, V.C., 2014. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 290–314. <https://doi.org/10.1038/nrd4228>.
- Maurin, T., Lebrigand, K., Castagnola, S., Paquet, A., Jarjat, M., Popa, A., Grossi, M., Rage, F., Bardoni, B., 2018. HITS-CLIP in various brain areas reveals new targets and new modalities of RNA binding by fragile X mental retardation protein. *Nucleic Acids Res.* 46, 6344–6355. <https://doi.org/10.1093/nar/gky267>.
- Maurin, T., Melancia, F., Jarjat, M., Castro, L., Costa, L., Delhay, S., Khayachi, A., Castagnola, S., Mota, E., Di Giorgio, A., Servadio, M., Drozd, M., Poupon, G., Schiavi, S., Sardone, L., Azoulay, S., Ciranna, L., Martin, S., Vincent, P., Trezza, V., Bardoni, B., 2019. Involvement of phosphodiesterase 2A activity in the pathophysiology of fragile X syndrome. *Cereb. Cortex* 29, 3241–3252. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhy192>.
- Menniti, F.S., Chappie, T.A., Schmidt, C.J., 2020. PDE10A inhibitors-clinical failure or window into antipsychotic drug action. *Front Neurosci.* 14, 600178. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.600178>.
- Menniti, F.S., Faraci, W.S., Schmidt, C.J., 2006. Phosphodiesterases in the CNS: targets for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 660–670. <https://doi.org/10.1038/nrd2058>.
- Mironov, S.L., Skorova, E., Taschenberger, G., Hartelt, N., Nikolaev, V.O., Lohse, M.J., Kugler, S., 2009. Imaging cytoplasmic cAMP in mouse brainstem neurons. *BMC Neurosci.* 10, 209. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-10-209>.
- Mota, E., Bompiere, S., Betolngar, D., Castro, L.R.V., Vincent, P., 2021. Pivotal role of phosphodiesterase 10A in the integration of dopamine signals in mice striatal D1 and D2 medium-sized spiny neurons. *Br. J. Pharmacol.* *In press*.
- Muntean, B.S., Zucca, S., MacMullen, C.M., Dao, M.T., Johnston, C., Iwamoto, H., Blakely, R.D., Davis, R.L., Martemyanov, K.A., 2018. Interrogating the spatiotemporal landscape of neuromodulatory GPCR signaling by real-time imaging of cAMP in intact neurons and circuits. *Cell Rep.* 22, 255–268. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.022>.
- Nair, A.G., Castro, L.R.V., El Khoury, M., Gorgievski, V., Giros, B., Tzavara, E.T., Hellgren-Kotaleski, J., Vincent, P., 2019. The high efficacy of muscarinic M4 receptor in D1 medium spiny neurons reverses striatal hyperdopaminergia. *Neuropharmacology* 146, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.11.029>.
- Nair, A.G., Gutierrez-Arenas, O., Eriksson, O., Vincent, P., Hellgren-Kotaleski, J., 2015. Sensing positive versus negative reward signals through adenylyl cyclase-coupled GPCRs in direct and indirect pathway striatal medium spiny neurons. *J. Neurosci.* 35, 14017–14030. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0730-15.2015>.
- Neves, S.R., Tsokas, P., Sarkar, A., Grace, E.A., Rangamani, P., Taubenfeld, S.M., Alberini, C.M., Schaff, J.C., Blitzler, R.D., Moraru, I.I., Iyengar, R., 2008. Cell shape and negative links in regulatory motifs together control spatial information flow in signaling networks. *Cell* 133, 666–680. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.025>.
- Nishi, A., Kuroiwa, M., Shuto, T., 2011. Mechanisms for the modulation of dopamine D₁ receptor signaling in striatal neurons. *Front Neuroanat.* 5, 43. <https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00043>.
- Nomura, S., Bouhadana, M., Morel, C., Faure, P., Cauli, B., Lamboloz, B., Hepp, R., 2014. Noradrenalin and dopamine receptors both control cAMP-PKA signaling throughout the cerebral cortex. *Front Cell Neurosci.* 8, 247. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00247>.
- Nomura, S., Tricoire, L., Cohen, I., Kuhn, B., Lamboloz, B., Hepp, R., 2020. Combined optogenetic approaches reveal quantitative dynamics of endogenous noradrenergic transmission in the brain. *iScience* 23, 101710. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101710>.
- O'Donnell, J., Zeppenfeld, D., McConnell, E., Pena, S., Nedergaard, M., 2012. Norepinephrine: a neuromodulator that boosts the function of multiple cell types to optimize CNS performance. *Neurochem. Res.* 37, 2496–2512. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0818-x>.

- Padilla-Parra, S., Tramier, M., 2012. FRET microscopy in the living cell: different approaches, strengths and weaknesses. *Bioessays* 34, 369–376. <https://doi.org/10.1002/bies.201100086>.
- Polito, M., Guiot, E., Gangarossa, G., Longueville, S., Doulazmi, M., Valjent, E., Hervé, D., Girault, J.A., Paupardin-Tritsch, D., Castro, L.R., Vincent, P., 2015. Selective effects of PDE10A inhibitors on striatopallidum neurons require phosphatase inhibition by DARPP-32. *eNeuro* 2, 1–15. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0060-15.2015>.
- Polito, M., Klarenbeek, J., Jalink, K., Paupardin-Tritsch, D., Vincent, P., Castro, L.R., 2013. The NO/cGMP pathway inhibits transient cAMP signals through the activation of PDE2 in striatal neurons. *Front Cell Neurosci.* 7, 211. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00211>.
- Poppe, H., Rybakkin, S.D., Rehmann, H., Hinds, T.R., Tang, X.B., Christensen, A.E., Schwede, F., Genieser, H.G., Bos, J.L., Doskeland, S.O., Beavo, J.A., Butt, E., 2008. Cyclic nucleotide analogs as probes of signaling pathways. *Nat. Methods* 5, 277–278. <https://doi.org/10.1038/nmeth0408-277>.
- Russwurm, M., Koesling, D., 2018. Measurement of cGMP-generating and -degrading activities and cGMP levels in cells and tissues: focus on FRET-based cGMP indicators. *Nitric Oxide* 77, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2018.04.006>.
- Sample, V., DiPilato, L.M., Yang, J.H., Ni, Q., Saucerman, J.J., Zhang, J., 2012. Regulation of nuclear PKA revealed by spatiotemporal manipulation of cyclic AMP. *Nat. Chem. Biol.* 8, 375–382. <https://doi.org/10.1038/nchembio.799>.
- Schülke, J.P., Brandon, N.J., 2017. Current understanding of PDE10A in the modulation of basal ganglia circuitry. *Adv. Neurobiol.* 17, 15–43. https://doi.org/10.1007/978-3-319-58811-7_2.
- Seeger, T.F., Bartlett, B., Coskran, T.M., Culp, J.S., James, L.C., Krull, D.L., Lanfear, J., Ryan, A.M., Schmidt, C.J., Strick, C.A., Varghese, A.H., Williams, R.D., Wylie, P.G., Menniti, F.S., 2003. Immunohistochemical localization of PDE10A in the rat brain. *Brain Res.* 985, 113–126. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)02754-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02754-9).
- Skinbjerg, M., Sibley, D.R., Javitch, J.A., Abi-Dargham, A., 2012. Imaging the high-affinity state of the dopamine D2 receptor in vivo: fact or fiction? *Biochem Pharm.* 83, 193–198. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.09.008>.
- Snyder, G.L., Prickaerts, J., Wadenberg, M.L., Zhang, L., Zheng, H., Yao, W., Akkerman, S., Zhu, H., Hendrick, J.P., Vanover, K.E., Davis, R., Li, P., Mates, S., Wennogle, L.P., 2016. Preclinical profile of ITI-214, an inhibitor of phosphodiesterase 1, for enhancement of memory performance in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 233, 3113–3124. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4346-2>.
- Stoufflet, J., Chaulet, M., Doulazmi, M., Fouquet, C., Dubacq, C., Métin, C., Schneider-Maunoury, C., Trembleau, A., Vincent, P., Caillé, I., 2020. Primary cilium-dependent cAMP/PKA signaling at the centrosome regulates neuronal migration. *Sci. Adv.* 6, eaba3992. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba3992>.
- Svenningsson, P., Nairn, A.C., Greengard, P., 2005. DARPP-32 mediates the actions of multiple drugs of abuse. *AAPS J.* 7, E353–E360. <https://doi.org/10.1208/aapsj070235>.
- Tang, S., Yasuda, R., 2017. Imaging ERK and PKA activation in single dendritic spines during structural plasticity. *Neuron* 93, 1315–1324. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.032>.
- Tepper, J.M., Koós, T., Ibanez-Sandoval, O., Tecuapetla, F., Faust, T.W., Assouf, M., 2018. Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons: update 2018. *Front Neuroanat.* 12, 91. <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00091>.
- Threlfell, S., Sammut, S., Menniti, F.S., Schmidt, C.J., West, A.R., 2009. Inhibition of phosphodiesterase 10A increases the responsiveness of striatal projection neurons to cortical stimulation. *J. Pharm. Exp. Ther.* 328, 785–795. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.146332>.
- Tsien, R.Y., 1999. In: Carafoli, E., Klee, C. (Eds.), *Monitoring Cell Calcium*. Oxford University Press, pp. 28–54.
- Tsien, R.Y., 2010. Nobel lecture: constructing and exploiting the fluorescent protein paintbox. *Integr. Biol. (Camb.)* 2, 77–93. <https://doi.org/10.1039/b926500g>.
- Vallin, B., Legueux-Cajgfinger, Y., Clément, N., Glorian, M., Duca, L., Vincent, P., Limon, I., Blaise, R., 2018. Novel short isoforms of adenylyl cyclase as negative regulators of cAMP production. *Biochim Biophys. Acta* 1865, 1326–1340. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.06.012>.
- van den Pol, A.N., 2012. Neuropeptide transmission in brain circuits. *Neuron* 76, 98–115. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.014>.
- van der Wal, J., Habets, R., Varnai, P., Balla, T., Jalink, K., 2001. Monitoring agonist-induced phospholipase C activation in live cells by fluorescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* 276, 15337–15344. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007194200>.
- van Keulen, S.C., Narzi, D., Rothlisberger, U., 2019. Association of both inhibitory and stimulatory Gα subunits implies adenylyl cyclase 5 deactivation. *Biochemistry* 58, 4317–4324. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00662>.
- Violin, J.D., Dipilato, L.M., Yildirim, N., Elston, T.C., Zhang, J., Lefkowitz, R.J., 2008. β2-adrenergic receptor signaling and desensitization elucidated by quantitative modeling of real time cAMP dynamics. *J. Biol. Chem.* 283, 2949–2961. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707009200>.
- Wang, H., Liu, Y., Hou, J., Zheng, M., Robinson, H., Ke, H., 2007. Structural insight into substrate specificity of phosphodiesterase 10. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 5782–5787. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700279104>.
- Weiss, S., Sebben, M., Garcia-Sainz, J.A., Bockaert, J., 1985. D2-dopamine receptor-mediated inhibition of cyclic AMP formation in striatal neurons in primary culture. *Mol. Pharm.* 27, 595–599.
- Wouters, F.S., Verveer, P.J., Bastiaens, P.I., 2001. Imaging biochemistry inside cells. *Trends Cell Biol.* 11, 203–211.
- Yagishita, S., Hayashi-Takagi, A., Ellis-Davies, G.C., Urakubo, H., Ishii, S., Kasai, H., 2014. A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines. *Science* 345, 1616–1620. <https://doi.org/10.1126/science.1255514>.
- Yang, J.H., Polanowska-Grabowska, R.K., Smith, J.S., Shields, C.W., Saucerman, J.J., 2014. PKA catalytic subunit compartmentation regulates contractile and hypertrophic responses to β-adrenergic signaling. *J. Mol. Cell Cardiol.* 66, 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.11.001>.
- Yapo, C., Nair, A.G., Clement, L., Castro, L.R., Hellgren Kotaleski, J., Vincent, P., 2017. Detection of phasic dopamine by D1 and D2 striatal medium spiny neurons. *J. Physiol.* 595, 7451–7475. <https://doi.org/10.1113/JP274475>.
- Yapo, C., Nair, A.G., Hellgren Kotaleski, J., Vincent, P., Castro, L.R.V., 2018. Switch-like PKA responses in the nucleus of striatal neurons. *J. Cell Sci.* 131, 216556. <https://doi.org/10.1242/jcs.216556>.
- Zhang, J., Campbell, R.E., Ting, A.Y., Tsien, R.Y., 2002. Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 906–918. <https://doi.org/10.1038/nrm976>.

4.2 – Differential regulation of cAMP/PKA signaling pathway by PDE10A, PDE4 and PDE2A in striatal medium-sized spiny neurons

Auteurs : Elia Mota, Ségolène Bompierre, Dahdjim Betolngar, Liliana Castro, Pierre Vincent

British Journal of Pharmacology, Août 2021

DOI: 10.1111/bph.15664

4.2.1 – Contexte de l'étude

La libération phasique de dopamine dans le striatum est impliquée dans le système d'apprentissage de la récompense et de l'erreur et dans la sélection et mise en place de mouvements. La dopamine est intégrée par les MSNs D1 et D2 via la voie de signalisation AMPc/PKA, et conduit, respectivement, à l'activation et l'inhibition de cette voie. La libération phasique de dopamine module de manière dynamique les niveaux d'AMPc et l'activité de la PKA (Yapo et al., 2017). L'augmentation et la diminution des niveaux d'AMPc dans les MSNs D1 et dans les MSNs D2, respectivement, est transitoire. La production et la dégradation de l'AMPc sont donc essentielles au maintien du contraste de la réponse à la dopamine. L'hydrolyse de l'AMPc en AMP est réalisée par les PDE, qui agissent alors comme contrôle négatif de la voie AMPc/PKA. Dans cette étude, nous avons ainsi étudié la contribution des PDE10A, PDE4 et PDE2A dans l'intégration du signal dopaminergique dans les MSNs D1 et D2. Pour cela, l'imagerie de biosenseurs FRET combinée à l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques à chaque PDE permet une mesure dynamique en temps réel des niveaux d'AMPc et de l'activité de la PKA sélectivement dans les MSNs D1 et D2.

4.2.2 – Principaux résultats

Dans cette étude, nous avons montré des rôles fonctionnels différents pour la PDE10A et les PDE4 et PDE2A. L'inhibition de la PDE10A supprime le contraste temporel de la réponse à la dopamine chez les deux populations de MSNs.

Dans les MSNs D1, l'inhibition seule de la PDE10A conduit à une augmentation des niveaux d'AMPc à un niveau suffisant pour supprimer l'effet de la libération de dopamine transitoire. Cet effet se répercute également au niveau de la PKA, où son activation est maximale après inhibition de la PDE10A. Dans les MSNs D2, lorsque la PDE10A est inhibée, la dopamine transitoire n'est plus capable de diminuer les niveaux d'AMPc. Dans cette situation, l'activation de la PKA est également maximale.

A l'inverse, l'inhibition de la PDE2A et/ou PDE4 n'a pas d'effet sur les niveaux de base d'AMPC dans les MSNs D1. Toutefois, leur inhibition augmente l'amplitude de la réponse à la dopamine, tant au niveau de l'AMPC que de l'activité PKA. Dans les MSNs D2, l'inhibition de la PDE2A et/ou PDE4 n'empêche pas la diminution des niveaux d'AMPC.

Tandis que l'inhibition de la PDE10A supprime le contraste temporel de la réponse à la dopamine, aussi bien dans les MSNs D1 que dans les MSNs D2, l'inhibition de la PDE4 et/ou PDE2A augmente l'amplitude de la réponse à la dopamine.

4.2.3 – Conclusions

Le maintien de l'activité de la PDE10A est essentiel pour maintenir le contraste de la réponse à la dopamine dans les MSNs D1 et D2, tandis que l'activité de la PDE2A et PDE4 module seulement l'amplitude de la réponse à la dopamine. Cela signifie que lorsque la PDE10A est inhibé, l'activité d'hydrolyse des PDE2A et PDE4 n'est pas suffisante pour compenser l'absence d'activité de la PDE10A. Dans les MSNs D1, la PDE2A et PDE4 ne sont pas capables de maintenir les niveaux de base d'AMPC. Sur le même principe, dans les MSNs D2, la PDE2A et PDE4 ne sont pas capables de dégrader l'AMPC suffisamment lorsque la dopamine stoppe la production d'AMPC. Tandis que la PDE10A seule (c'est-à-dire lorsque la PDE2A et PDE4 sont inhibées) est responsable du maintien du niveau de base d'AMPC dans les MSNs D1 et de la diminution transitoire d'AMPC suite à l'activation des récepteurs D₂. Ces résultats sont en accord avec l'affinité de chaque PDE pour l'AMPC : le faible K_m de la PDE10A pour l'AMPC permet une activité d'hydrolyse à de faible concentration d'AMPC, tandis que le K_m plus élevé des PDE2A et PDE4 ne permet pas de réduire la concentration en AMPC à un niveau suffisamment faible pour permettre la dé-activation de la PKA.

4.2.4 – Article

RESEARCH ARTICLE

Pivotal role of phosphodiesterase 10A in the integration of dopamine signals in mice striatal D₁ and D₂ medium-sized spiny neurones

Élia Mota^{1,2} | Ségolène Bompierre¹  | Dahdjim Betolngar¹ |
Liliana R. V. Castro¹  | Pierre Vincent¹ 

¹Sorbonne Université, CNRS, Biological Adaptation and Ageing, UMR 8256, Paris, France

²Novel Human Genetics Research Unit, GSK R&D, Stevenage, UK

Correspondence

Pierre Vincent, Sorbonne Université, CNRS, Biological Adaptation and Ageing, UMR 8256, F-75005 Paris, France.

Email: pierre.vincent@sorbonne-universite.fr

Background and Purpose: Dopamine in the striatum plays a crucial role in reward processes and action selection. Dopamine signals are transduced by D₁ and D₂ dopamine receptors which trigger mirror effects through the cAMP/PKA signalling cascade in D₁ and D₂ medium-sized spiny neurons (MSNs). Phosphodiesterases (PDEs), which determine the profile of cAMP signals, are highly expressed in MSNs, but their respective roles in dopamine signal integration remain poorly understood.

Experimental Approach: We used genetically encoded FRET biosensors to monitor at the single cell level the functional contribution of PDE2A, PDE4 and PDE10A in the changes of the cAMP/PKA response to transient and continuous dopamine in mouse striatal brain slices.

Key Results: We found that PDE2A, PDE4 and PDE10A operate on the moderate to high cAMP levels elicited by D₁ or A_{2A} receptor stimulation. In contrast, only PDE10A is able to reduce cAMP down to baseline in both type of neurones, leading to the dephosphorylation of PKA substrates.

Conclusion and Implications: In both MSN types, PDE10A inhibition blunts the responsiveness to dopamine, whereas PDE2A or PDE4 inhibition reinforces dopamine action.

KEYWORDS

biosensing techniques, cAMP, cAMP-dependent protein kinase, dopamine, phosphodiesterases, striatum

1 | INTRODUCTION

Dopamine neurotransmission in the striatum is involved in reward-mediated learning and action selection (Cerovic et al., 2013; Klaus et al., 2019; Kreitzer & Malenka, 2008; Surmeier et al., 2007). Stimuli predicting a reward trigger the phasic release of dopamine and the timely integration of transient dopamine signal is an important determinant of its action (Day et al., 2007; Gonon, 1997; Schultz et al., 1997). Dopamine signals are integrated via the cAMP/PKA

signalling pathway and **cyclic-nucleotide-specific phosphodiesterases (PDEs)**, which degrade **cAMP**, are therefore expected to play an important role. Thus, the transient activation of **D₁ receptors** triggers an increase in cAMP production, which is terminated by PDE activities. Symmetrically, activation of **D₂ receptors** shuts off adenylyl cyclase activity and PDE activities are required to degrade cAMP.

The main target of cAMP in striatal neurones is **PKA**. The proper transduction of a dopamine signal therefore requires that, after adenylyl cyclase is switched off, cAMP level should be lowered in a

concentration range where PKA shows little or no activity. Striatal neurones mainly express **PKA regulatory subunits of type II β** (Cadd & McKnight, 1989), which is activated by cAMP in a 0.1- to 1- μ M concentration range (Dostmann & Taylor, 1991). As highlighted by previous theoretical work (Neves-Zaph, 2017), PDEs with specific K_m , V_{max} , expression level and subcellular localisation are therefore expected to play different functional roles in the integration of dopamine signals. In this context, we wanted to determine whether the different PDEs expressed in the striatum contributed differently to the integration of dopamine signals.

In situ hybridisation and qPCR in the dorsal striatum reported a particularly robust mRNA expression of the **Pde1b**, **Pde2a**, **Pde7b** and **Pde10a** genes and a more marginal expression of **Pde4b** and **Pde8b** (Kelly et al., 2014; Lakics et al., 2010). **Pde7b** mRNA is highly expressed, but the presence of **PDE7B** protein has not been reported in the striatum so far. The PDE1B protein is highly expressed in MSNs (Polli & Kincaid, 1994; Yan et al., 1994). PDE1B has a K_m of 33 μ M for cAMP (Poppe et al., 2008). Our previous work showed that, in D_1 MSNs, PDE1 efficiently degrades high cAMP levels in the context of dopamine and **NMDA** coincidence (Betolngar et al., 2019). This work also demonstrated the lack of PDE1B activity in MSNs under our experimental conditions unless ionotropic glutamate receptors were activated. In the present work, intracellular calcium was not increased with glutamate and action potentials were blocked with **tetrodotoxin** and therefore PDE1B did not contribute to the effects we analysed here.

High levels of PDE2A protein have been reported in the striatum (Stephenson et al., 2009, 2012). Its activity is potentiated up to 40-fold by cGMP binding to its “cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases and FhlA type B domain” (GAF-B domain; Jäger et al., 2010; Martinez et al., 2002; Martins et al., 1982). PDE2A can thus mediate a cross-talk between the cGMP and cAMP pathways, as demonstrated in a previous study (Polito et al., 2013). PDE2A has a K_m estimated in a 46- to 112- μ M range (Poppe et al., 2008; Sudo et al., 2000), suggesting that PDE2A mainly regulates high cAMP levels.

The A, B and D isoforms of PDE4 are also expressed in MSNs (Cherry & Davis, 1999; Nishi et al., 2008; Nishi & Snyder, 2010; Pérez-Torres et al., 2000). PDE4B is the main isoform expressed in the striatum, with higher expression in D_2 MSNs than in D_1 MSNs (Nishi et al., 2008; Nishi & Snyder, 2010). The PDE4 family degrades cAMP with a K_m estimated in a 2.5- to 5.5- μ M range (Bender & Beavo, 2006; Poppe et al., 2008; Sudo et al., 2000), higher than the range of cAMP concentration that is sufficient to activate PKA.

The PDE10A protein is present at very high levels and almost exclusively in MSNs (Seeger et al., 2003; Coskran et al., 2006; Lakics et al., 2010), suggesting an important functional role. In contrast to PDE2A and PDE4, PDE10A has a much lower K_m for cAMP, in a range of 0.05–0.25 μ M (Poppe et al., 2008; Wang et al., 2007). This suggests a major action of PDE10A on low cAMP levels. Previous studies showed differences between D_1 and D_2 MSNs in their responsiveness to partial PDE10A inhibition, both *in vivo* and in brain slices (Polito et al., 2015; Threlfell et al., 2009). This D_2/D_1 imbalance was

What is already known

- Dopamine acts through the cAMP/PKA signalling pathway, which requires the activity of phosphodiesterases.
- Several phosphodiesterases are expressed in striatal medium-sized spiny neurones, with different enzymatic properties.

What does this study add

- Inhibition of PDE10A blunts dopamine action.
- Inhibition of PDE2A or PDE4 reinforces dopamine action.

What is the clinical significance

- Mechanistic understanding of dopamine-phosphodiesterase interplay may help design novel therapeutic strategies for schizophrenia.

consistent with PDE10A inhibitors mimicking the D_2 antagonistic action of antipsychotic agents. PDE10A inhibition has therefore been largely studied as a therapeutic strategy for the treatment of schizophrenia or Huntington's disease (Chappie et al., 2009; Harada et al., 2020; Kehler et al., 2007; Kehler & Nielsen, 2011; Menniti et al., 2007, 2020; Schülke & Brandon, 2017). While clinical results did not confirm these expectations, a better understanding of PDE10A involvement in dopamine action may eventually reveal the cellular underpinnings of schizophrenia (Menniti et al., 2020).

In this work, we wanted to delineate the respective functional roles played by PDE2A, PDE4 and PDE10A in the integration of dopamine signals. We used pharmacological inhibitors to selectively block these PDEs, while monitoring the cAMP or PKA responses to dopamine with real-time measurement with FRET biosensors. Our data reveal that PDE10A inhibition exerts diametrically opposed effects to those produced by the inhibition of the other phosphodiesterases.

2 | METHODS

2.1 | Biosensor imaging in brain slice preparations

The mouse litters (male and female C57BL/6J pups; Janvier labs) were housed in open cages under standardised conditions with a 12-hr light/dark cycle, stable temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), controlled humidity ($55 \pm 10\%$) and food and water *ad libitum*. Animal care was performed in accordance with the Sorbonne University animal care committee regulations that complies with the commonly accepted “3Rs.” Animal studies are also reported in compliance with the ARRIVE guidelines (Percie du Sert et al., 2020) and with the recommendations made by the *British Journal of Pharmacology* (Lilley et al., 2020). Brain slices were prepared from mice aged from 7 to 11 days. Mice were decapitated,

and the brain quickly removed and immersed in ice-cold solution of the following composition: 125-mM NaCl, 0.4-mM CaCl₂, 1-mM MgCl₂, 1.25-mM NaH₂PO₄, 26-mM NaHCO₃, 20-mM glucose, 2.5-mM KCl, 5-mM sodium pyruvate, and 1-mM kynurenic acid, saturated with 5% CO₂ and 95% O₂. Coronal striatal brain slices were cut with a VT1200S microtome (Leica). The slices were incubated in this solution for 30 min and then placed on a Millicell-CM membrane (Millipore) in culture medium (50% Minimum Essential Medium, 50% Hanks' Balanced Salt Solution, 5.5 g·L⁻¹ glucose, penicillin–streptomycin, Invitrogen). The cAMP biosensor Epac-S^{H150} (Polito et al., 2013) or AKAR4 reporter of PKA/phosphatase equilibrium (Depry et al., 2011) were expressed using the Sindbis virus as vector (Ehrensgruber et al., 1999): The viral vector was added on the brain slices (~5 × 10⁵ particles per slice) and the infected slices were incubated overnight at 35°C under an atmosphere containing 5% CO₂. Before the experiment, slices were incubated for 30 min in the recording solution (125-mM NaCl, 2-mM CaCl₂, 1-mM MgCl₂, 1.25-mM NaH₂PO₄, 26-mM NaHCO₃, 20-mM glucose, 2.5-mM KCl, and 5-mM sodium pyruvate saturated with 5% CO₂ and 95% O₂). Recordings were performed with a continuous perfusion of the same solution at 32°C.

Imaging was performed in the dorso-medial part of the striatum. Wide-field images were obtained with an Olympus BX50WI or BX51WI upright microscope with a 40× 0.8 numerical aperture water-immersion objective and an ORCA-AG camera (Hamamatsu). Images were acquired with iVision (Biovision, Exton, PA, USA). The excitation and dichroic filters were D436/20 and 455dxt. Signals were acquired by alternating the emission filters, HQ480/40 for donor emission, and D535/40 for acceptor emission, with a filter wheel (Sutter Instruments, Novato, CA, USA). Filters were obtained from Chroma Technology and Semrock.

Photo-release of dopamine from the “caged” precursor NPEC-DA was performed using high power 360-nm light-emitting diodes mounted on the epifluorescence port of the microscope, providing 14 mW at the exit of the microscope objective (0.5-s flash duration) or 7.5 mW (1-s flash duration). The combination of light-emitting diodes at 360 nm (for uncaging) and 420 nm (off-peak light source for 436-nm excitation filter for biosensor imaging) was purchased from Mightex (Toronto, Canada). The frequency of data acquisition, usually 1 image pair every 30 or 60 s, was increased to 0.2 Hz in order to resolve peak dynamics, starting 10 data points before dopamine uncaging.

2.2 | Image analysis

Images were analysed with custom routines written in the IGOR Pro environment (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA). No correction for bleed-through or direct excitation of the acceptor was applied to keep the benefit of ratiometric calculation, which cancels various imaging artefacts. Biosensor activation level was quantified by ratiometric imaging: donor fluorescence divided by acceptor fluorescence for Epac-S^{H150} and acceptor divided by donor for AKAR4. The emission ratio was calculated for each pixel and displayed in pseudo-colour images, with the ratio value coded in hue and the fluorescence of the

preparation coded in intensity. Wide-field imaging allowed for the separation of D₁ and D₂ MSNs, provided that the infection level was kept low and no fluorescence overlap between neighbouring neurones was observed. Cells were also excluded from the analysis when basal ratio was elevated, when the response to forskolin was lacking or when the neuronal morphology was altered (uneven cell contours). Rare cholinergic interneurons, recognised by their morphology and cell body size larger than 13 μm, were excluded from our analysis.

2.3 | Materials

Solutions were prepared from powders purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, Isère, France). Tetrodotoxin was from Latoxan (Valence, France). BAY607550 and TP-10 were obtained from CliniSciences (Nanterre, France). Other drugs were from Tocris Bio-Techne (Lille, France).

NPEC-DA, (N)-1-(2-nitrophenyl)ethylcarboxy-3,4-dihydroxyphenethylamine, a chemical precursor of dopamine which can be released by a flash of UV light, was stored at 100-mM concentration in DMSO at -20°C. A new aliquot was used for every day of experiment, kept at 4°C in the dark. NPEC-DA (3 μM) had no effect by itself on the cAMP level in D₁ and D₂ MSNs. After a few minutes to allow for the diffusion of the compound into the brain slice, a flash of UV light was applied through the objective to convert all NPEC-DA in the imaging field of view into free dopamine. Dopamine concentration in the brain slice then decays exponentially with a time constant of ~90 s (Yapo et al., 2017).

2.4 | Data and statistical analysis

The data and statistical analysis comply with the recommendations on experimental design and analysis in pharmacology (Curtis et al., 2018). Statistical tests were performed using Igor Pro. Brain slices were considered independent. One experiment is defined as one brain slice being used in a protocol such as that illustrated in Figure 1. Only a single experiment was performed on each brain slice. Responses obtained from all neurones of the same type in one experiment were averaged together; statistics were calculated per experiment (*n*); (*N*) indicates the total number of neurones per condition; (*A*) indicates the number of animals used for preparing all the brain slices used per condition (Tables 1–3). Responses were highly reproducible, such that low repeat numbers were sufficient. Experiments were repeated five to seven times to allow for statistical analysis (Curtis et al., 2018). In Figure 7, TP-10 and BAY607550 rolipram condition was repeated only four times since it qualitatively confirmed the results with TC-E 5005 and PF-05180999/piclamilast. No outlier was excluded in this study. The alpha level for statistical significance was fixed at 0.05, indicated by * in figures and tables. n.s. indicates that the test was not significant. For some conditions, the Shapiro–Wilk test rejected the hypothesis of normal data distribution, and therefore, non-parametric statistics were used throughout this study. The Wilcoxon signed rank

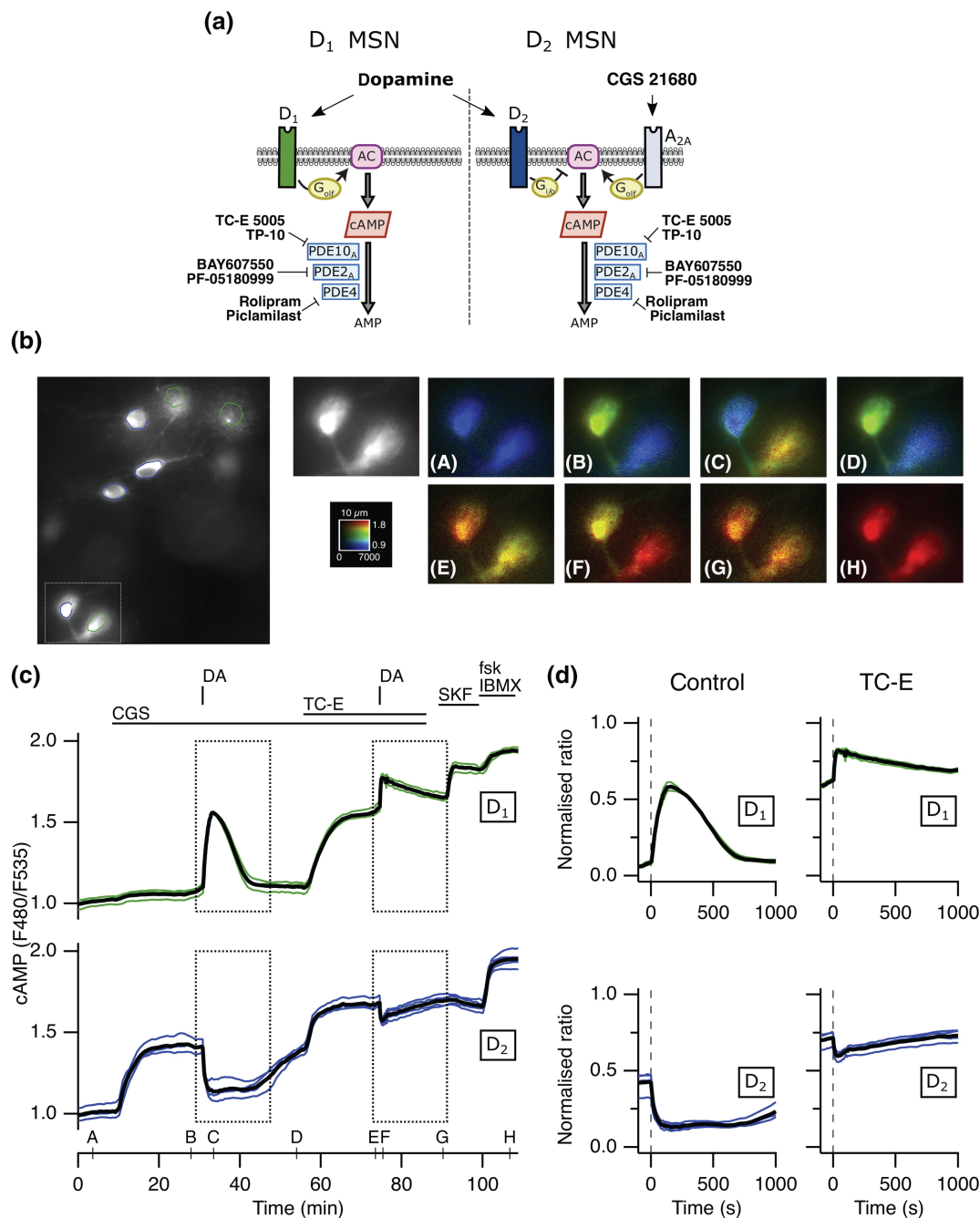


FIGURE 1 PDE10A activity determines the profile of cAMP responses to dopamine in striatal medium-sized spiny neurons (MSNs). The Epac-S^{H150} biosensor was expressed in mice striatal brain slices and imaged with wide-field microscopy. (a) Schematic representation of cAMP signalling in D₁-type and D₂-type MSNs. (b) Left: part of the field of view showing the fluorescence at 535 nm (F535). The regions of interest on individual cells define the area used for measuring the ratio (F480/F535). Right: pseudo-colour images (A–H) of the region indicated by the rectangle and corresponding to the time points indicated on the graph in (c). (c) Each trace on the graph indicates the emission ratio indicative of intracellular cAMP concentration measured on the cell body of an individual neurone. Drug application is indicated by horizontal bars. The A_{2A} receptor agonist CGS 21680 (CGS, 1 μM) increases cAMP level in D₂ MSNs. Dopamine released from caged NPEC-DA (3 μM) by a flash of UV light (DA) triggered transient responses of opposite directions in D₁ MSNs (green traces) and D₂ MSNs (blue traces). A second dopamine release was performed in the presence of the PDE10A inhibitor, TC-E 5005 (TC-E, 1 μM). SKF-81297 (SKF, 0.1 μM) increased the ratio in D₁ MSNs, confirming their identity, while the ratio in D₂ MSNs decreased with the removal of CGS. Forskolin (fsk, 13 μM) and IBMX (200 μM) maximally increased cAMP levels for each neurone. (d) Traces normalised between baseline and the maximal response to fsk and IBMX; first (ctl, left) and second (TC-E, right) responses to dopamine stimulation. Averages for each type of MSNs are represented as black lines

TABLE 1 Measurements corresponding to Figures 2–4

		Numbers			Condition	Steady state			Peak (D ₁) or trough (D ₂)		
		n	N	A		Ratio		[cAMP] (μM)	Ratio		[cAMP] (μM)
Figure 2	D ₁	6	35	4	Control	0.052	*	0.45	0.452	*	8.49
					TC-E 5005	0.443		8.29	0.665		26.46
	D ₂	6	29	4	Control	0.379	*	5.95	0.090	*	0.77
					TC-E 5005	0.669		26.95	0.539		13.32
	D ₁	5	15	2	Control	0.034	*	0.33	0.501	*	11.01
					TP-10	0.343		4.92	0.741		41.63
	D ₂	5	20	2	Control	0.338	*	4.79	0.012	*	0.20
					TP-10	0.636		22.24	0.360		5.38
Figure 3	D ₁	6	35	5	Control	0.022	n.s.	0.25	0.528	*	12.86
					BAY607550	−0.003		0.16	0.752		46.99
	D ₂	5	13	5	Control	0.313	*	4.42	−0.011	n.s.	0.09
					BAY607550	0.664		30.03	0.026		0.32
	D ₁	6	42	4	Control	0.025	n.s.	0.28	0.539	*	13.34
					rolipram	0.025		0.28	0.631		21.63
	D ₂	5	17	4	Control	0.263	*	3.11	−0.011	n.s.	0.08
					rolipram	0.454		8.71	−0.009		0.10
Figure 4	D ₁	5	20	3	Control	0.016	n.s.	0.23	0.482	*	10.03
					BAY607550/rolipram	0.016		0.22	0.806		67.19
	D ₂	5	17	3	Control	0.258	*	3.02	−0.031	*	0.01
					BAY607550/rolipram	0.833		85.40	0.040		0.37
	D ₁	5	34	3	Control	0.038	*	0.36	0.414	*	7.10
					PF-05180999/piclamilast	0.082		0.70	0.582		16.62
	D ₂	5	15	3	Control	0.250	*	2.85	0.051	*	0.44
					PF-05180999/piclamilast	0.786		59.55	0.218		2.33 ^a

Note: Wilcoxon signed rank test was used to test whether the PDE inhibitor increased the ratio level at steady-state, peak for D₁ medium-sized spiny neurons (MSNs) or trough for D₂ MSNs.

Abbreviations: A, the number of different animals; n, the number of experiments; N, the total number of cells; n.s., that the difference was not significant; TP-10, 2-((4-[4-pyridin-4-yl-1-(2,2,2-trifluoroethyl)-1H-pyrazol-3-yl] phenoxy)methyl)quinolone].

^aThe Wilcoxon-Mann-Whitney two-sample rank test was used to test whether the PDE inhibitor treatment decreased the ratio level to a lower level with PF-05180999 and piclamilast than with TC-E 5005.

*A statistically significant difference.

TABLE 2 Measurements corresponding to Figure 6

		Numbers			Peak or trough				
		n	N	A	Ratio	Q	Q		
D ₁	Control	7	49	4	0.711	3.902*		2.232	n.s.
	TP-10	5	36	3	1.072		1.864	n.s.	
	BAY607550 /rolipram	7	33	3	0.827				
D ₂	Control	6	30	4	0.466	3.403*		1.251	n.s.
	TP-10	5	22	3	0.901		2.331	n.s.	
	BAY607550 /rolipram	7	29	3	0.620				

Note: Kruskal–Wallis followed by Dunn–Holland–Wolfe tests were used to compare the ratio level at peak for D₁ medium-sized spiny neurons (MSNs) or trough for D₂ MSNs. The critical Q value was 2.394 for both tests.

Abbreviations: A, the number of different animals; n, the number of experiments; N, the total number of cells; n.s., that the difference was not significant; TP-10, 2-((4-[4-pyridin-4-yl-1-(2,2,2-trifluoroethyl)-1H-pyrazol-3-yl] phenoxy)methyl)quinolone]

*A statistically significant difference.

TABLE 3 Measurements corresponding to Figure 7

			Numbers		St. state			
			<i>n</i>	<i>N</i>	<i>A</i>	Ratio	[cAMP] (μ M)	
cAMP	D ₂	TC-E 5005	5	19	3	0.381	*	6.00
		PF-05180999/piclamilast	5	16	3	0.049		0.44
PKA	D ₂	TC-E 5005	5	19	4	0.887	*	
		PF-05180999/piclamilast	5	18	3	0.163		
		TP-10	4	9	6	0.845		
		BAY607550/rolipram	4	8	2	0.133		

Abbreviations: A, the number of different animals; n, the number of experiments; N, the total number of cells.

*A statistically significant difference.

test was used for paired data. The Wilcoxon–Mann–Whitney test was used to test whether the treatment increased the ratio value for unpaired data. Kruskal–Wallis followed by Dunn tests was used for more than two conditions (Figure 6).

2.5 | Estimates of cAMP concentration

Ratiometric imaging can be used to determine absolute analyte concentrations, with ratio values following a Hill equation from R_{min}, the ratio in the absence of ligand, to R_{max}, the ratio in the presence of saturating ligand (Gryniewicz et al., 1985). For Epac-S^{H150}, ratio values were translated into corresponding cAMP concentration estimates using a Hill equation with a K_d of 10 μ M and a Hill coefficient of 0.77 (Klarenbeek et al., 2015; Polito et al., 2013). R_{max} was determined for each neuron by the final application of forskolin and IBMX. The basal ratio was estimated by inhibiting adenylyl cyclases with 200- μ M SQ22536, which decreased the ratio by 0.037 ratio units to reach the minimal ratio, R_{min}. This value was not statistically different between D₁ and D₂ MSNs (*n* = 8, *N* = 58, *A* = 7). This basal ratio value of 0.037, corresponding to \sim 0.15- μ M cAMP, was subtracted from baseline ratio when estimating cAMP concentration.

2.6 | Nomenclature of targets and ligands

Key protein targets and ligands in this article are hyperlinked to corresponding entries in the IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY <http://www.guidetopharmacology.org> and are permanently archived in the Concise Guide to PHARMACOLOGY 2019/20 (Alexander et al., 2019).

3 | RESULTS

3.1 | Imaging the cAMP/PKA signalling pathway in striatal brain slices

The striatum comprises \sim 90% of medium-sized spiny neurons (MSNs) distributed in two subgroups, which express dopamine receptors of

either D₁ or D₂ type (Bertran-Gonzalez et al., 2010; Valjent et al., 2009). These two sets of neurons will be hereafter called D₁ MSNs and D₂ MSNs, respectively. D₂ MSNs also express **adenosine A_{2A} receptors**, positively coupled to cAMP production (Fink et al., 1992). A strict segregation of receptors in two separate MSN populations can be readily imaged with wide-field microscopy in mouse striatal brain slices expressing genetically encoded biosensors for the cAMP/PKA signalling pathway (Betolngar et al., 2019; Yapo et al., 2017). Ratiometric quantification provides real-time monitoring of changes in cAMP/PKA signalling in several MSNs at the same time during the application of drugs in the microscope chamber. The identity of D₁ and D₂ MSNs in the field of view can be unambiguously revealed by its positive biosensor response to receptor activation: **SKF-81297** (SKF, 100 nM), a D₁-receptor selective agonist, and **CGS 21680** (CGS, 1 μ M), an **A_{2A}** agonist, respectively (Figure 1a). At the end of every experiment, the adenylyl cyclases activator **forskolin** (fsk, 13 μ M) together with the non-selective PDE inhibitor IBMX (200 μ M) is applied to reach the saturating ratio value, (R_{max}) for the biosensor. For each neuron, the ratio trace is normalised between the basal ratio, measured before the application of CGS 21680, and R_{max} (Figure 1d), and expressed as dimensionless “normalised ratio.” Male and female mice pups were used in this study, and no difference related to sex was observed.

3.2 | PDE10A degrades low and high cAMP levels

First, we used the Epac-S^{H150} biosensor (Polito et al., 2013) to image the cAMP response to transient dopamine stimulation and analyse PDE10A action on dopamine response (Figure 1b–d). Since dopamine D₂ receptors are negatively coupled to cAMP production and since the basal level of cAMP is low (see estimate of baseline cAMP level in Section 2.5), intracellular cAMP production was first increased selectively in D₂ MSNs by applying the **adenosine A_{2A} receptor** agonist CGS 21680 (Figure 1b A,B and Figure 1c, blue traces on the graph). This mimics the adenosine tone in the striatum. All stimulations with CGS 21680 in this study were performed in the presence of the **adenosine A₁ receptor** antagonist **PSB36** (PSB, 100 nM). The sodium channel blocker tetrodotoxin (200 nM) was applied throughout the experiment to prevent the generation

of spontaneous action potentials, thus preventing the activation of PDE1B. Once a steady-state cAMP level was reached in D_2 MSNs, a flash of UV light was applied to the field of view to release dopamine ($3 \mu\text{M}$) from the “caged” precursor NPEC-DA (see details in Section 2). This brief dopamine stimulation transiently decreased cAMP level in D_2 MSNs (Figure 1b B,C and Figure 1c, blue traces), while it simultaneously increased cAMP in D_1 MSNs (Figure 1b B,C and Figure 1c, green traces). These opposite changes in cAMP concentration in D_1 and D_2 MSNs with this uncaging protocol have already been described and were shown to be repeatable in the same neurones with the same amplitude and kinetics (Betolngar et al., 2019; Yapo et al., 2017).

To test the functional role of PDE10A on dopamine-induced changes in cAMP levels, a second trial with caged dopamine was performed in the presence of a PDE10A inhibitor. We used **TC-E 5005** (TC-E, $1 \mu\text{M}$) applied in the bath a few minutes before and maintained

during and after the release of dopamine (Figure 1b E–G and Figure 1c). Application of TC-E 5005 alone significantly increased the ratio level in D_1 MSNs. In D_2 MSNs, TC-E 5005 potentiated the cAMP response to CGS 21680. On this steady-state cAMP level, the second episode of dopamine uncaging induced a transient cAMP increase in D_1 MSNs and a small transient decrease in cAMP in D_2 MSNs (Figure 1b E–G). Traces from MSNs of the same type were averaged and that average normalised between baseline and R_{max} (Figure 1d). Time 0 was set at the time of dopamine uncaging.

The same experiment was performed six times ($n = 6$), and the average traces from each experiment were averaged and displayed in Figure 2a (green for D_1 , blue for D_2 MSNs). The steady-state level measured before dopamine uncaging at time 0 and the peak response to dopamine, were plotted with connecting lines to show for each experiment the ratio change resulting from TC-E 5005 treatment. Normalised ratio values can be converted to an estimated cAMP

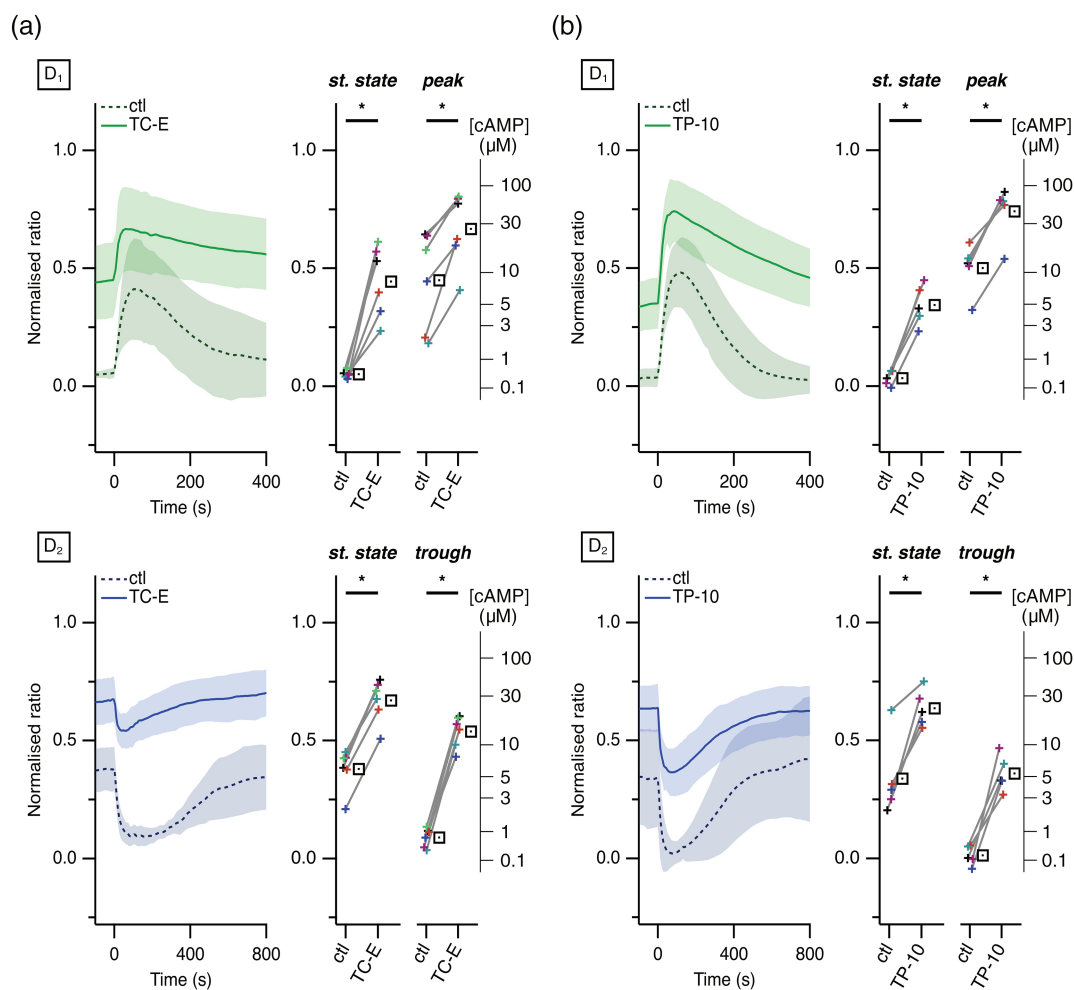


FIGURE 2 PDE10A activity is required to lower cAMP levels to baseline in D_1 and D_2 medium-sized spiny neurons (MSNs). Same protocol as in Figure 1. PDE10A was inhibited either with (a) TC-E 5005 (TC-E; $1 \mu\text{M}$, $N = 6$) or with (b) TP-10 ($1 \mu\text{M}$, $N = 5$). Traces show the average ratio response to dopamine in D_1 and D_2 MSNs, without (ctl, dashed line) or with PDE10A inhibitor (plain line). Shading indicates 95% confidence interval. Plots show the average of the steady-state ratio level before dopamine uncaging (st. state) and the peak (D_1) or trough (D_2) amplitude of dopamine responses alone (ctl, control) or in the presence of TC-E or TP-10. The average of the different repeats is represented with a square symbol. The axis on the right of the plot indicates the cAMP concentration estimated from the ratio level. * indicates a statistically significant difference

concentration (see Section 2.5), indicated by a scale on the right of the graph. Numerical values are indicated in Table 1.

In D_1 MSNs, the steady-state level before dopamine uncaging (Figure 2a, “st. state”) was increased by TC-E 5005 treatment, with corresponding cAMP concentration rising from ~ 0.5 to ~ 10 μM . TC-E 5005 also increased the peak response to dopamine uncaging, from ~ 10 to ~ 30 μM .

In D_2 MSNs, the application of TC-E 5005 increased the steady-state ratio level elicited by A_{2A} receptor activation from ~ 6 to ~ 30 μM . The trough in cAMP level induced by dopamine uncaging was reaching ~ 0.7 μM in control conditions, while in the presence of TC-E 5005 that level was reduced only to more than 10 μM , far from reaching the baseline. We also tested the effect of TP-10 (1 μM), another potent and highly selective PDE10A inhibitor closely related to **mardepodect** (Schmidt et al., 2008) and obtained similar results (Figure 2b and Table 1).

These experiments show that PDE10A is an important regulator of basal cAMP level in D_1 MSNs, as well as in the regulation of peak cAMP level during a positive cAMP response to dopamine. In D_2 MSNs, PDE10A participates in the regulation of the steady-state level reached upon A_{2A} receptor activation. PDE10A activity also appears required to decrease cAMP concentration toward baseline level upon D_2 receptor activation, with cAMP levels remaining above 5 μM if PDE10A is inhibited.

3.3 | PDE2A and PDE4 contribution

We then evaluated the contribution of PDE2A using the same protocol as in Figure 1, except that, instead of inhibiting PDE10A, we selectively inhibited PDE2A with **BAY607550** (BAY, 200 nM, Figure 3a). In contrast to PDE10A inhibition, application of BAY607550 had no effect on basal ratio in D_1 MSNs. However, it increased the amplitude of the cAMP response to transient dopamine (Figure 3c and Table 1).

In D_2 MSNs, the application of BAY607550 on top of the steady-state A_{2A} response increased the ratio. In contrast to PDE10A inhibition, dopamine uncaging in the presence of BAY607550 decreased cAMP level down to baseline (Figure 3a,c): The minimal ratio level after dopamine release in the presence of BAY607550 was not different from control condition.

To evaluate the contribution of PDE4, the same experiment was repeated using a selective PDE4 inhibitor, **rolipram** (1 μM). The effect of rolipram was similar to that of BAY607550 (Figure 3b,d).

These experiments show that PDE2A and PDE4 are both active in the regulation of the peak cAMP response to dopamine in D_1 MSNs. These PDEs also contribute to the moderation of the steady-state cAMP response to A_{2A} receptor stimulation in D_2 MSNs. However, when either PDE is blocked, D_2 receptor activation still leads to a decrease of cAMP concentration down to baseline level.

Previous work in cardiomyocytes showed that different phosphodiesterases can act in synergy to regulate cAMP signals (Mika

et al., 2019) and PDE2A-PDE4 synergy has been observed in memory processes (Paes et al., 2021). To test for the coincident activity of PDE2A and PDE4, both activities were blocked with PDE2A and PDE4 inhibitors (Figure 4). To rule out any unspecific drug effects, the same protocol was tested with either BAY607550 and rolipram, or with the PDE2A inhibitor **PF-05180999** (PF, 1 μM) and PDE4 inhibitor **piclamilast** (picla, 1 μM).

Inhibition of both PDE2A and PDE4 with BAY607550 and rolipram had no effect on baseline cAMP level in D_1 MSNs (Figure 4a,b, green traces), while PF-05180999 and piclamilast induced a significant, but small, cAMP increase (~ 0.7 μM , Figure 4c). As expected from the potentiation of the D_1 response obtained when either PDE was inhibited, the dopamine peak in D_1 MSNs was significantly larger when both PDE2A and PDE4 activities were blocked.

Simultaneous inhibition of PDE2A and PDE4 also potentiated the cAMP response to A_{2A} receptor stimulation in D_2 MSNs (Figure 4a,b, blue traces). When PDE2A and PDE4 were simultaneously inhibited, D_2 receptor activation still led to a marked decrease in cAMP concentration. With BAY607550 and rolipram, or PF-05180999 and piclamilast, D_2 receptor activation decreased cAMP level markedly, to a level that although higher than baseline, remained below ~ 3 μM .

These experiments show that PDE2A and PDE4 act synergistically: their individual activities have moderate consequences on the profile of dopamine responses in D_1 and D_2 MSNs, but they jointly regulate high cAMP levels in D_1 and D_2 MSNs.

3.4 | Integration at the PKA-dependent phosphorylation level

PDE2A and PDE4 thus appear to regulate high cAMP levels reached in D_1 MSNs after transient stimulation with dopamine, as well as high cAMP steady-state levels induced by A_{2A} adenosine receptor in D_2 MSNs. However, if PDE10A is inhibited, PDE2A and PDE4 activities are not sufficient to lower cAMP concentration below a ~ 5 - μM range. cAMP degradation by PDE10A activity therefore appears critical to allow for PKA de-activation and this hypothesis was tested using a PKA-specific biosensor. We monitored the phosphorylation level of PKA substrates using the AKAR4 biosensor, an improved biosensor for monitoring the equilibrium between PKA and phosphatases activities (Depry et al., 2011). PKA activity was first increased in D_2 MSNs using CGS 21680 in the presence of PSB36 (Figure 5a A,B), increasing the ratio to the maximal level. Dopamine uncaging (NPEC-DA, 3 μM) produced a transient ratio increase in the D_1 MSNs while D_2 MSNs displayed a transient ratio decrease (Figure 5). These measurements are consistent with our previous results obtained with the AKAR3 biosensor (Yapo et al., 2017).

To test for the functional role of PDE10A, PDE2A and PDE4 at the level of PKA-dependent phosphorylation level, the same experiment was performed in the presence of TP-10 (Figure 6a) or

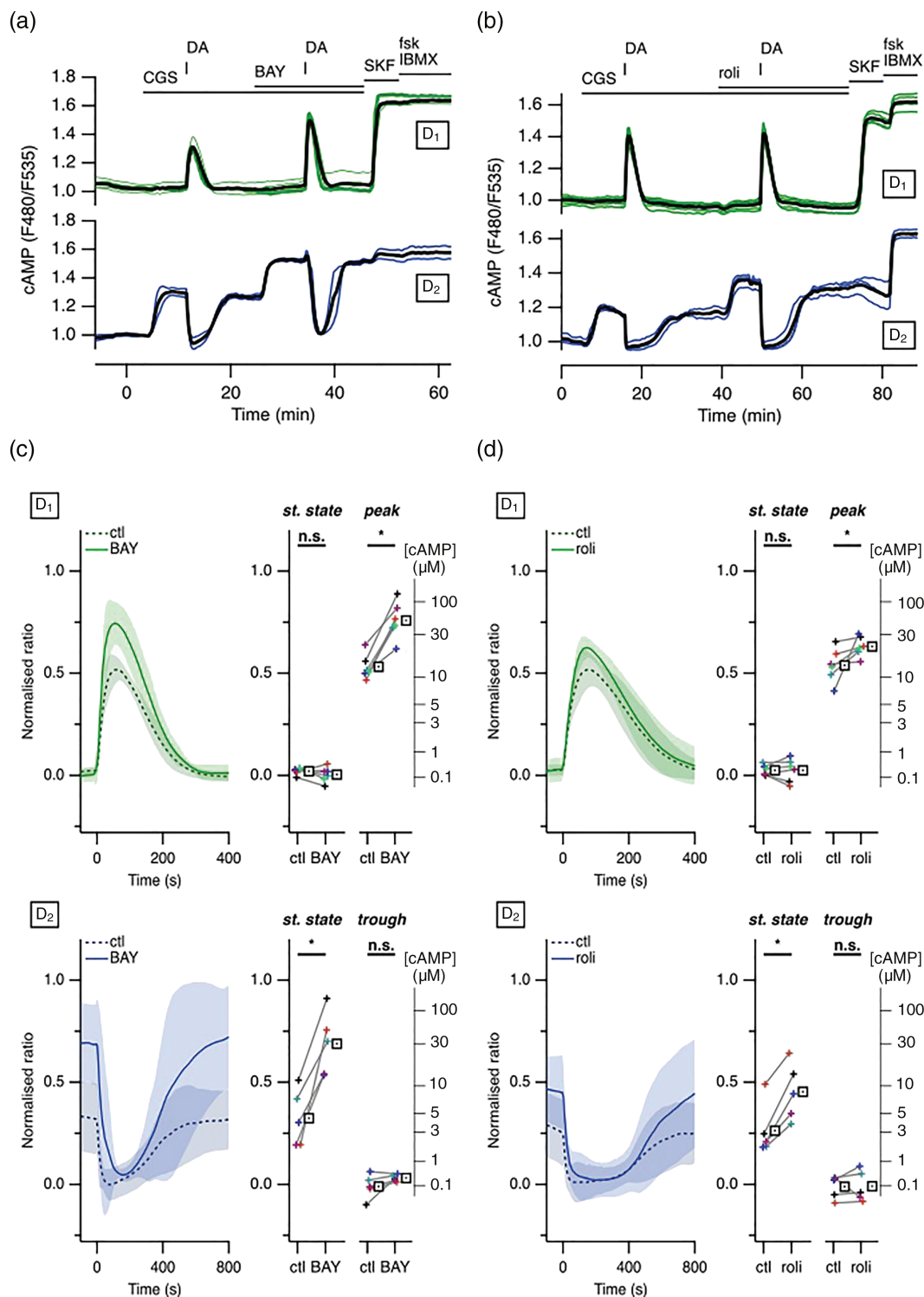


FIGURE 3 Although PDE2A or PDE4 activities regulate high cAMP levels, they are not required to lower cAMP levels to baseline. Same experiment as in Figure 1, except that PDE2A or PDE4 were inhibited either with (a) BAY607550 (BAY, 200 nM) or with (b) rolipram (roli, 100 nM), respectively. (c) and (d) represent the average of repeats of the same experiments. Statistical tests that showed no difference are indicated with n.s.

BAY607550 and rolipram (Figure 6b). This protocol consistently showed that PDE10A inhibition with TP-10 profoundly altered the responsiveness to transient dopamine (Figure 6c,d, red traces and

Table 2). Upon TP-10 treatment, D₁ MSNs started off from a high ratio level that was not increased by dopamine nor forskolin and IBMX. In this condition, transient dopamine signal was not transduced

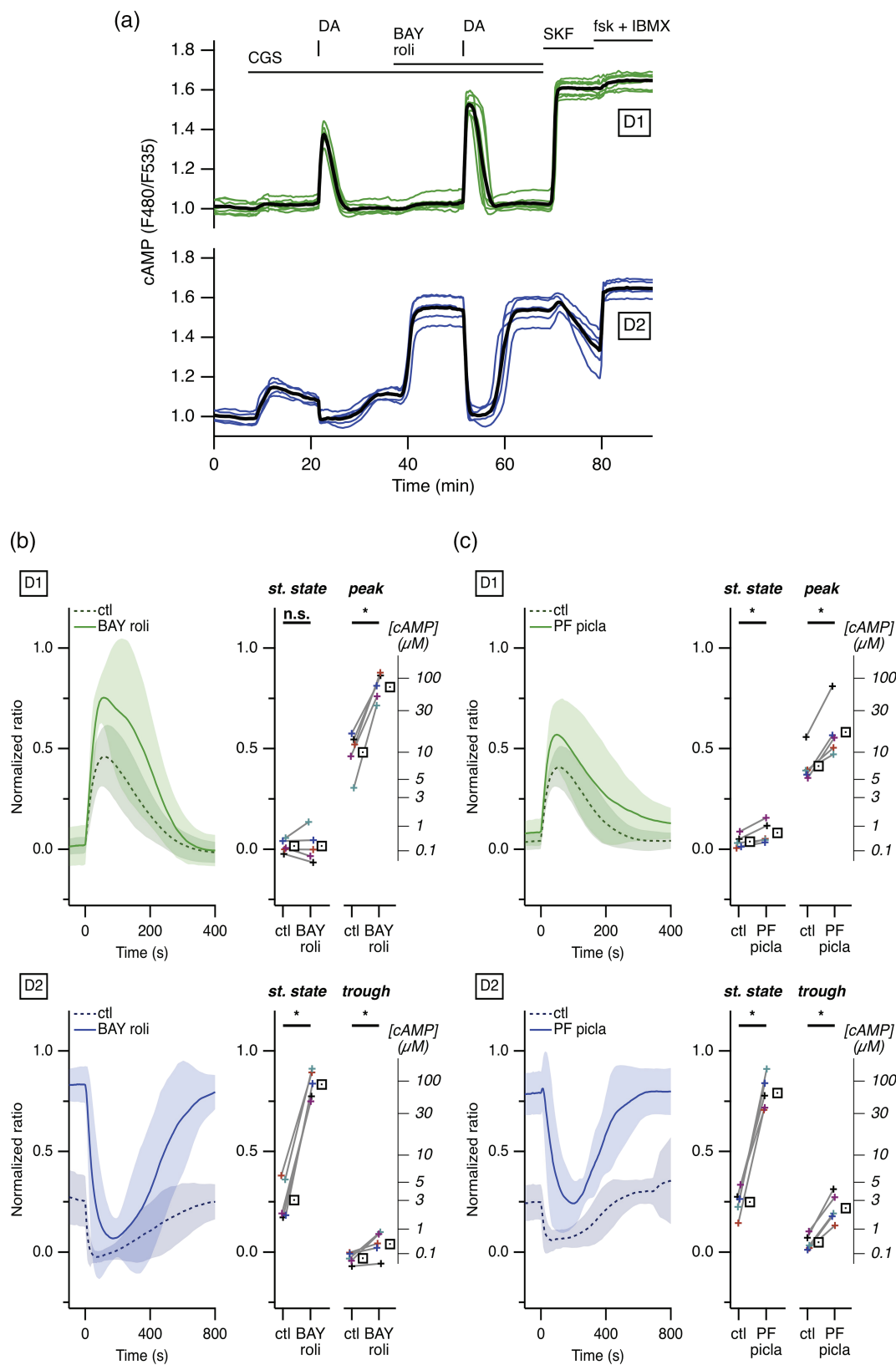


FIGURE 4 When both PDE2A and PDE4 are inhibited, cAMP can still be degraded to low levels. (a) Same experiment as in Figure 1, except that PDE2A and PDE4 were concomitantly inhibited with BAY607550 (BAY, 200 nM) and rolipram (roli, 100 nM), respectively. (b) and (c) represent the average of repeats of the same experiments, with either (b) BAY and roli, or (c) another combination of selective inhibitors of PDE2A PF-05180999 (PF, 1 μM) and PDE4 piclamilast (picla, 1 μM)

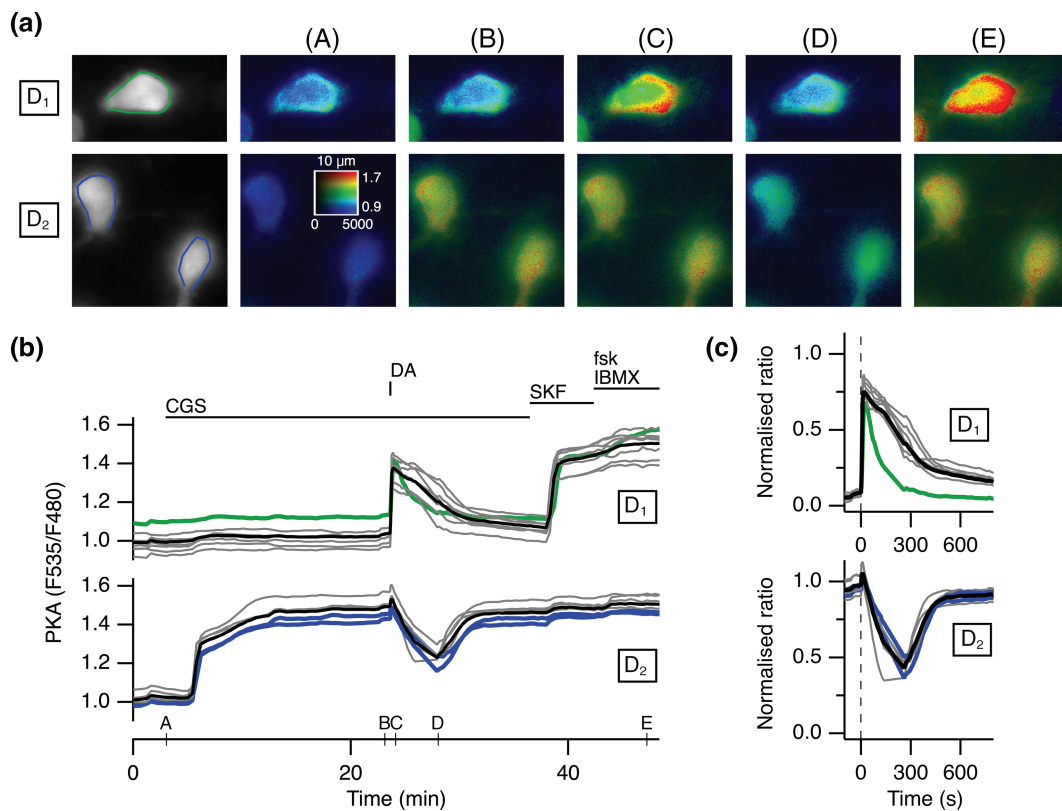


FIGURE 5 Transient dopamine induces opposite responses at the level of PKA-dependent phosphorylation in D_1 and D_2 medium-sized spiny neurons (MSNs). The AKAR4 biosensor was expressed in mice striatal brain slices and imaged with wide-field microscopy. (a, left) Selected D_1 and D_2 MSNs on the field showing the fluorescence at the acceptor wavelength (F535), displayed in grey. The regions of interest around each MSN define the area used for measuring the ratio (F535/F480), indicative of PKA-dependent phosphorylation level. Pseudo-colour images (A–E) of the selected region correspond to the time points indicated on the graph in (b). (b) Each trace on the graph indicates the variations in the emission ratio measured on the cell body of an individual neuron. Drug application is indicated by horizontal bars. The A_{2A} receptor agonist CGS 21680 (CGS, 1 μ M) was applied to selectively activate PKA signalling in D_2 cells. Dopamine (DA) release from caged NPEC-DA (3 μ M) by a flash of UV light triggered a transient response in D_1 MSNs and a trough in the D_2 MSNs. The final application of forskolin (fsk, 13 μ M) and IBMX (200 μ M) revealed the saturating ratio level of the biosensor for each neurone. Green and blue traces indicate, respectively, the ratio variations in the D_1 or D_2 MSNs represented in (a). (c) The traces of the individual cells in the field were normalised with respect to their maximal response to fsk and IBMX. The averages of D_1 and D_2 ratio traces are represented as a black line

at the level of PKA-dependent phosphorylation. In D_2 MSNs, transient dopamine induced little reduction in PKA signal. In contrast to TP-10, the inhibition of PDE2A and PDE4 did not significantly affect the PKA response to transient dopamine.

Switching-off cAMP production with transient dopamine is too brief to allow for a large dephosphorylation of PKA targets in D_2 MSNs, as shown previously (Yapo et al., 2017) and in Figure 5. Therefore, we tested with continuous bath application of dopamine which PDE activity was required to lower cAMP concentration at a level that would be sufficiently low to deactivate PKA. As with the previous protocol, the adenosine tone was mimicked with the A_{2A} agonist, CGS 21680.

Using the cAMP biosensor Epac-S^{H150} and in the presence of TC-E 5005, continuous dopamine application lowered cAMP to ~ 6 μ M in D_2 MSNs (Figure 7a,e, and Table 3). In contrast, when PDE2A and PDE4 were inhibited with PF-05180999 and picamilast,

dopamine decreased cAMP concentration to a significantly lower level, close to baseline (Figure 7c,e, and Table 3).

The same protocol was performed using AKAR4 to monitor PKA-dependent phosphorylation level. CGS 21680 application led to a high steady-state PKA-dependent phosphorylation level in D_2 MSNs. Application of the PDE10A inhibitor TC-E 5005 increased PKA-dependent phosphorylation to the maximal ratio level in both D_1 and D_2 MSNs. In D_2 MSNs, continuous dopamine produced a moderate decrease that progressively returned to the maximal level (Figure 7b,f, blue traces). The profile of PKA-dependent phosphorylation was radically different with the inhibition of both PDE2A and PDE4 (PF-05180999 and picamilast, respectively). Sustained application of dopamine (3 μ M) efficiently suppressed PKA-dependent phosphorylation level in D_2 MSNs (Figure 7d,f, blue traces). The same protocol was repeated with the other inhibitors, TP-10 and BAY607550 rolipram, showing similar preliminary results (Figure 7f).

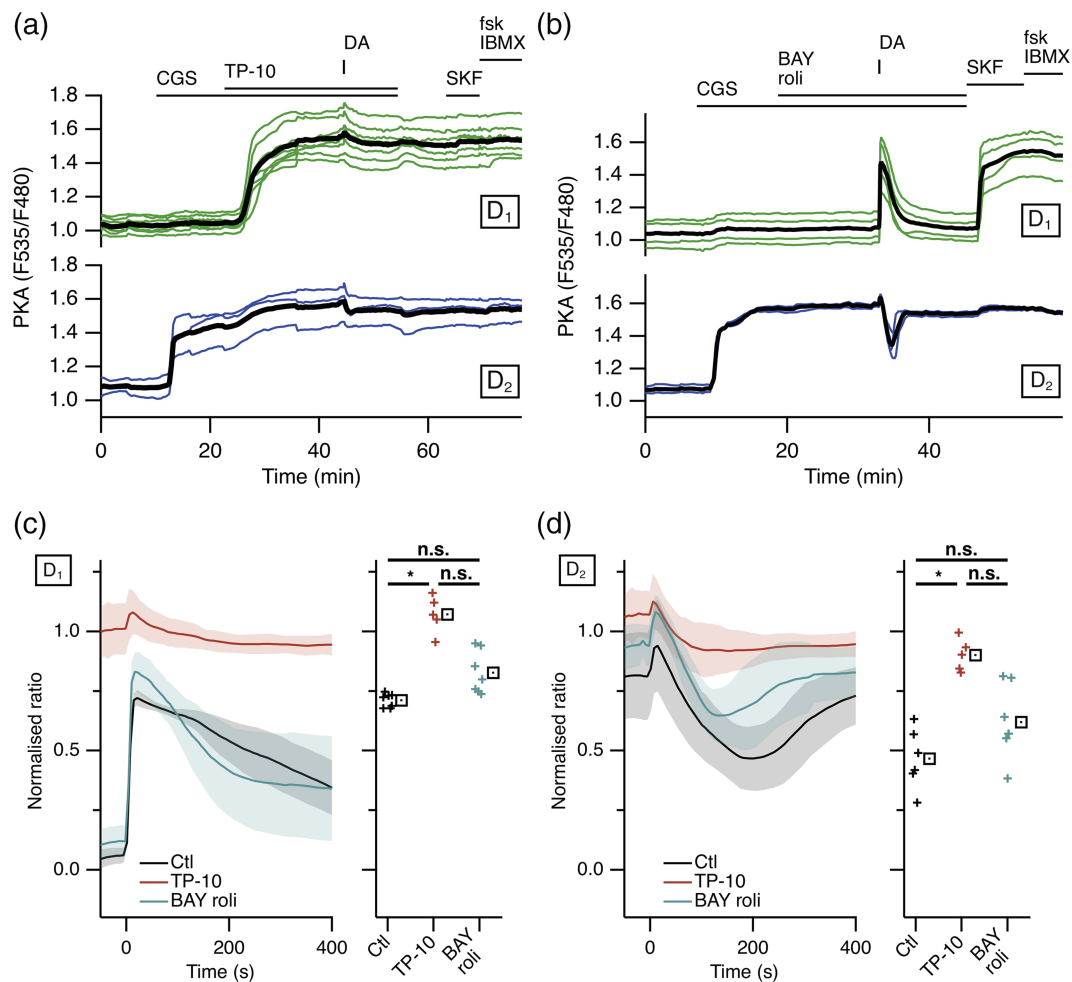


FIGURE 6 PDE10A activity is required to transduce transient dopamine at the level of PKA-dependent phosphorylation in D₁ and D₂ medium-sized spiny neurons (MSNs). Same experiment as in Figure 5, except that dopamine (DA) was released either in the presence of the PDE10A inhibitor TP-10 (1 μ M, a) or in the simultaneous presence of PDE2A inhibitor BAY607550 (BAY, 200 nM) and PDE4 inhibitor rolipram (roli, 1 μ M) (b). Plots show the average of the amplitude of peak in D₁ (c) and trough in D₂ (d) MSNs, in control condition (Ctl), in the presence of TP-10, or BAY and roli. * indicates a statistically significant difference; n.s. stands for not significantly different

This experiment demonstrates that dopamine, via D₂ receptors, leads to the deactivation of PKA and the dephosphorylation of the kinase substrates. This effect of dopamine requires PDE10A activity, whereas PDE2A and PDE4 action appears incidental.

4 | DISCUSSION

4.1 | PDE specificity on different cAMP levels

Our study reveals the specific action of PDE2A, PDE4 and PDE10A in the regulation of the cAMP/PKA signalling cascade in both D₁ and D₂ MSNs. Our results are quite consistent with the idea that different PDEs exhibit distinctive enzymatic properties endowing them with a specific functional role in striatal neurones (Neves-Zaph, 2017). In this review, the author highlighted that PDE2A, which exhibits a Km of several tens of micromolar, should mainly degrade the highest cAMP

levels. Indeed, our experiments show that PDE2A inhibition increases the peak amplitude of cAMP responses to dopamine in D₁ MSNs, as well as the A_{2A}-induced steady-state cAMP level in D₂ MSNs. Both levels are higher than 10- μ M cAMP concentration. PDE2A however is not involved in the regulation of basal (i.e. unstimulated) cAMP since its inhibition did not affect basal cAMP level in MSNs of both types (Polito et al., 2013), whereas PDE10A inhibition did, as shown here and in our previous work (Polito et al., 2015). Our work also shows that PDE4 is functional in both D₁ and D₂ MSNs since its inhibition increases the cAMP responses to D₁ or A_{2A} receptor stimulation. However, like PDE2A, PDE4 do not play a significant role in the regulation of basal cAMP. With a Km of a few micromolar, PDE4 thus regulates moderate to high cAMP levels, as suggested by computer simulations (Neves-Zaph, 2017). Concomitant inhibition of both PDE2A and PDE4 essentially exacerbated the effect of the inhibition of either one. It had no or minimal effect on basal cAMP level in D₁ MSNs, but it increased the amplitude and duration of the transient

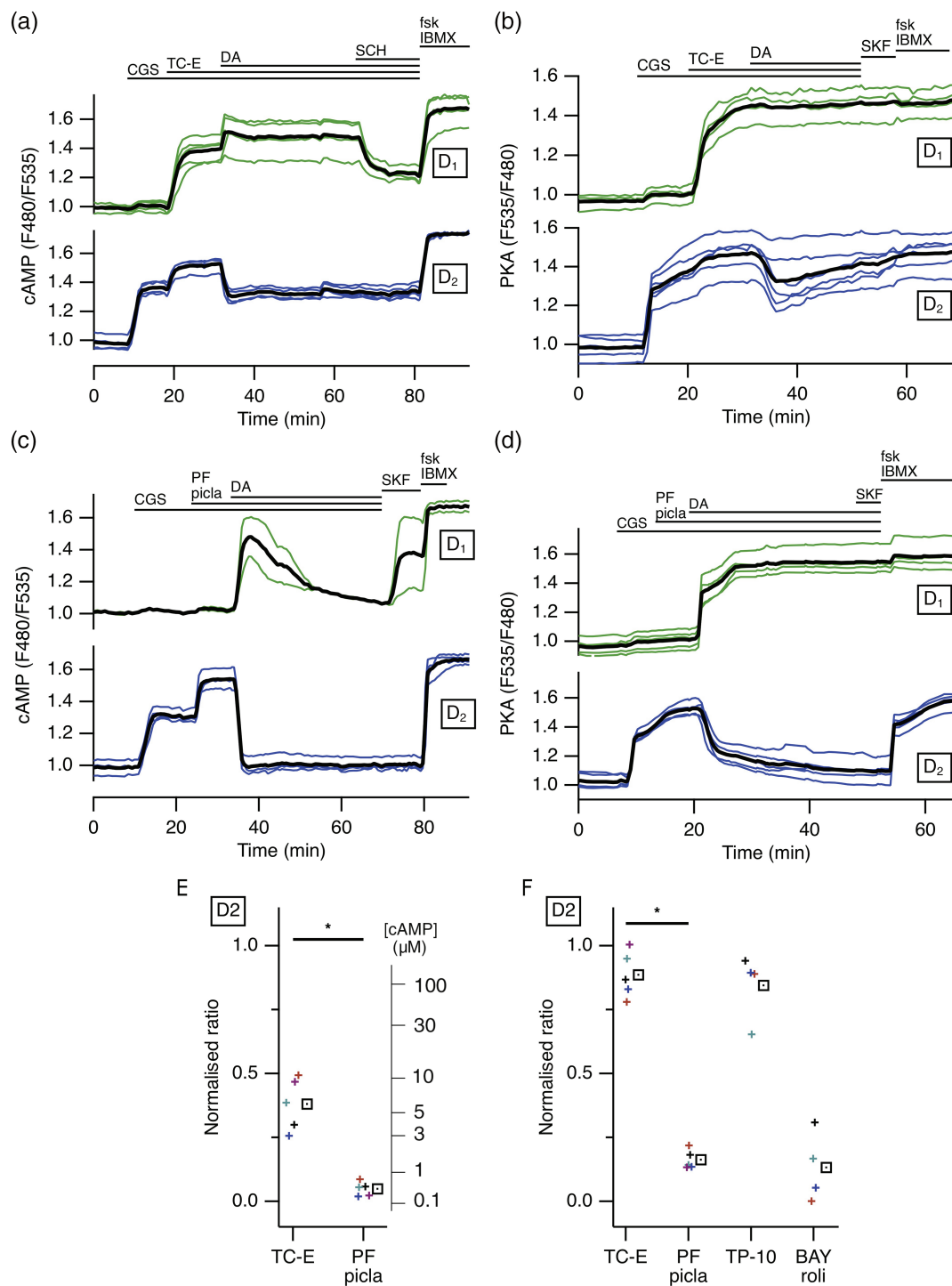


FIGURE 7 PDE10A activity is required to allow for cAMP decrease and PKA deactivation in D_2 medium-sized spiny neurons (MSNs) during sustained dopamine stimulus. Epac- S^{H150} (a, c) or AKAR4 (b, d) biosensors were used to monitor respectively cAMP or PKA-dependent phosphorylation changes, measured on the cell body of individual neurones. Dopamine (DA, 3 μ M) was applied in the bath in the presence of the PDE10A inhibitors TC-E 5005 (TC-E; a, b) or in the presence of PDE2A and PDE4 inhibitors PF-05180999 (PF, 1 μ M) and piclamilast (picla, 1 μ M). (e) shows the average reduction in cAMP level upon PDE10A inhibition (TC-E) or PDE2A and PDE4 inhibition (PF picla). (f) shows the reduction in PKA-dependent phosphorylation level in the same condition, as well as with the other inhibitors TP-10 or BAY607550 (BAY) and rolipram (roli)

cAMP response to D_1 stimulation and potentiated the cAMP response to A_{2A} receptor activation in D_2 MSNs. In contrast to PDE2A and PDE4, PDE10A has a submicromolar K_m for cAMP and is thus

expected to mainly regulate the lowest cAMP levels. Indeed, we already reported that partial PDE10A inhibition in the absence of any stimulation increased cAMP from submicromolar to micromolar

concentration, consistent with PDE10A regulating tonic cAMP production by adenylyl cyclases at submicromolar concentration level (Polito et al., 2015).

Surprisingly, our data show that PDE10A is also involved in the degradation of high cAMP levels since its inhibition largely prolongs dopamine D₁ responses and increases A_{2A}-induced cAMP plateau in D₂ MSNs. Enzymes with low K_m values would be generally expected to fine-tune low concentration and be saturated—and of little functional role—when the substrate concentration is high. This is true unless V_{max} is high and/or the enzyme is present at high concentration. Indeed, PDE10A is expressed at very high levels and at all ages in MSNs (Seeger et al., 2003; Grauer et al., 2009; Lakics et al., 2010; Kelly et al., 2014). This also comes in good agreement with previous biochemical studies which showed that PDE10A accounted for the vast majority of cAMP hydrolysing activity in striatal extracts (Russwurm et al., 2015). By working on both low and high cAMP levels, PDE10A thus appears to play a predominant functional role in MSNs.

However, one should keep in mind that our measurements were performed in new born mice, and PDE expression levels change through mouse and human lifespan (Farmer et al., 2020; Hegde et al., 2016; Kelly et al., 2014). Since PDE10A remains the dominant form of PDE in the adult striatum, it is quite plausible that its key signalling function is maintained in adulthood.

4.2 | Signal integration at the level of PKA-dependent phosphorylation

PKA, the primary target of cAMP in MSNs, is activated by submicromolar cAMP levels (Dostmann & Taylor, 1991). PDE10A is the only PDE expressed in MSNs working on submicromolar cAMP levels and our data confirm that its activity is required for proper integration of cAMP signals at the PKA level. In D₁ MSNs, transient dopamine triggers a transient increase in PKA-dependent phosphorylation level and such transient signals are essentially abolished when PDE10A is inhibited: Baseline cAMP level increases above PKA activation threshold, and any further stimulation of cAMP production, for example, through D₁ receptors, has no significant effect on a continuously elevated PKA signal. This effect is expected to be strongly potentiated by “dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein” (DARPP-32). Phosphorylation of the T34 residue in DARPP-32 by PKA leads to the inhibition of phosphatase 1, thus forming a positive feed-forward control loop (Girault & Greengard, 2004). Such mechanism promotes an all-or-none responsiveness in D₁ MSNs, as has been described in the nucleus of MSNs (Yapo et al., 2018). This locks D₁ MSNs in a highly phosphorylated state, likely associated with elevated activity in the direct pathway.

D₂ MSNs are intrinsically not geared to respond to transient dopamine signals, since it takes time to transduce the D₂-induced decrease in cAMP into a dephosphorylation of PKA substrates. This has been reported previously (Yapo et al., 2017) and illustrated here in Figure 5. Modelling analysis suggested that D₂ MSNs might detect a transient absence of dopamine, in a context of tonic A_{2A} receptor

stimulation (Yapo et al., 2017). This mechanism requires that tonic dopamine maintains a low PKA-dependent phosphorylation level even in the presence of adenosine tone. Figure 7 shows that this cannot be obtained if PDE10A is inhibited. cAMP cannot be maintained below micromolar level and PKA-dependent phosphorylation level remains high.

Besides PDE10A activity, which appears as the centrepiece of PKA signalling in MSNs, PDE2A and PDE4 display ancillary effects that may nonetheless bear important functional significance. First, PDE2A and PDE4 affect the amplitude of cAMP peaks in D₁ MSNs. It was previously shown that PDE1B also regulates the peak cAMP response to dopamine, an effect that translated into changes in synaptic plasticity (Betolngar et al., 2019). Similarly, PDE2A activation through the NO/cGMP signalling axis has also been reported to modulate transient PKA responses (Polito et al., 2013). Fine-tuning of peak PKA responses through PDE2A and PDE4 may therefore be of importance in the outcome of phasic dopamine signals in the striatum.

This work also demonstrates that PDE2A and PDE4 regulate steady-state micromolar cAMP levels. PDE2A or PDE4 inhibition potentiates the steady-state cAMP/PKA tone induced by adenosine, while the D₂-mediated reduction of cAMP down to baseline is preserved. This suggests that PDE2A or PDE4 inhibition would rather reinforce the response to a dopamine signal in D₂ MSNs. Finally, although this has not been characterised precisely in this work, PDE2A and PDE4 contribute to cAMP degradation after activation of D₂ receptors and their inhibition slows down the return towards baseline. PDE2A and PDE4 modulation is therefore expected to induce changes in the relative timing of signalling events, which is a critical aspect of striatal function.

4.3 | PDEs as therapeutic targets

As indicated in the introduction, inhibiting PDE10A seemed an interesting approach by its selectivity for striatal neurones. Our data show that this strategy exposes to a delicate situation in which the therapeutic window can be very narrow, between an expected beneficial effect, such as boosting the activity of D₂ MSNs and unwanted side effects which may arise from switching a variable fraction of D₁ MSNs into a highly phosphorylated state. Indeed, we have reported previously that PKA-dependent phosphorylation in D₁ MSNs is under a powerful negative control by phosphatase 1 (Polito et al., 2015). However, this negative control is suppressed when DARPP-32, phosphorylated by PKA, inhibits protein phosphatase 1. Such highly non-linear control mechanism favours all-or-none transitions, an effect observed in the nucleus of D₁ MSNs (Yapo et al., 2018). In these conditions, it can be expected that, above a certain threshold of PDE10A inhibition, some neurones may abruptly switch to a high PKA-dependent phosphorylation state for a prolonged duration. This may underlie the unwanted side effects observed in patients treated with high

doses of PDE10A inhibitors, which led to abandoning this approach in several drug development programs (Baillie et al., 2019; Menniti et al., 2020). On the other hand, regulating the other PDEs such as PDE2A and PDE4 may provide a more subtle way to adjust the cAMP response and therefore tune PKA responses. For example, behavioural studies indicate that PDE2A inhibitors may be of interest for treating cognitive impairments including those associated with schizophrenia (Boess et al., 2004; Redrobe et al., 2014, 2015), while changes in striatal PDE2A expression level were correlated with psychiatric diseases (Farmer et al., 2020).

In conclusion, we observed that PDE2A, PDE4 and PDE10A play distinct roles in the regulation of cAMP/PKA responses to dopamine in D₁ and D₂ MSNs. We report that PDE10A is required for degrading low cAMP levels, which is necessary to return PKA substrates to the de-phosphorylated state: Its inhibition tends to suppress dopamine action. In contrast, PDE2A and PDE4 only control high cAMP levels and their inhibition reinforces the effect of dopamine in both D₁ and D₂ MSNs.

ACKNOWLEDGEMENTS

The team is a member of the Bio-Psy Labex. We thank Cédric Yapo, Manon Dobrigna, and Ilyes Nedjar for helpful contributions to the experimental work. We thank Mohamed Doulazmi for helpful discussion on the statistical analysis. We thank Mrs. Violette for helpful discussions and R.A.A. for providing excellent temporary work conditions. This research was funded by “Investissements d’Avenir” program managed by the ANR under reference ANR-11-IDEX-0004-02 and called “Bio-Psy Labex.” E.M. benefited from a PhD fellowship from this institution.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualisation, L.C. and P.V.

Data curation, E.M., L.C. and P.V.

Formal analysis, P.V.

Funding acquisition, L.C. and P.V.

Investigation, E.M. and S.B.

Methodology, E.M. and P.V.

Project administration, P.V.

Resources, E.M., D.B., L.C. and P.V.

Software, P.V.

Supervision, P.V.

Validation, E.M. and P.V.

Visualisation, E.M. and P.V.

Writing - original draft preparation, E.M., L.C. and P.V.

Writing - review and editing, E.M., L.C. and P.V.

All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data, in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

DECLARATION OF TRANSPARENCY AND SCIENTIFIC RIGOUR

This declaration acknowledges that this paper adheres to the principles for transparent reporting and scientific rigour of preclinical research as stated in the *BJP* guidelines for [Design and Analysis](#) and Animal Experimentation, and as recommended by funding agencies, publishers and other organisations engaged with supporting research.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study as well as the softwares for data analysis are available at <https://ebrains.eu> repository under DOI <https://doi.org/10.25493/5G5V-HBC>.

ORCID

Ségolène Bompierre  <https://orcid.org/0000-0003-1140-4409>

Liliana R. V. Castro  <https://orcid.org/0000-0001-8902-089X>

Pierre Vincent  <https://orcid.org/0000-0002-8479-1908>

REFERENCES

- Alexander, S. P. H., Fabbro, D., Kelly, E., Mathie, A., Peters, J. A., Veale, E. L., Armstrong, J. F., Faccenda, E., Harding, S. D., Pawson, A. J., Sharman, J. L., Southan, C., Davies, J. A., & CGTP, C. (2019). The concise guide to pharmacology 2019/20: Enzymes. *British Journal of Pharmacology*, 176(Suppl 1), S297–S396. <https://doi.org/10.1111/bph.14752>
- Baillie, G. S., Tejada, G. S., & Kelly, M. P. (2019). Therapeutic targeting of 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases: Inhibition and beyond. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(10), 770–796. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0033-4>
- Bender, A. T., & Beavo, J. A. (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Molecular regulation to clinical use. *Pharmacological Reviews*, 58(3), 488–520. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.5>
- Bertran-Gonzalez, J., Hervé, D., Girault, J. A., & Valjent, E. (2010). What is the degree of segregation between striatonigral and striatopallidal projections. *Frontiers in Neuroanatomy*, 4, 136. <https://doi.org/10.3389/fnana.2010.00136>
- Betolngar, D. B., Mota, É., Fabritius, A., Nielsen, J., Hougaard, C., Christoffersen, C. T., Yang, J., Kehler, J., Griesbeck, O., Castro, L. R. V., & Vincent, P. (2019). Phosphodiesterase 1 bridges glutamate inputs with NO- and dopamine-induced cyclic nucleotide signals in the striatum. *Cerebral Cortex*, 29(12), 5022–5036. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhz041>
- Boess, F. G., Hendrix, M., van der Staay, F. J., Erb, C., Schreiber, R., van Staveren, W., de Vente, J., Prickaerts, J., Blokland, A., & Koenig, G. (2004). Inhibition of phosphodiesterase 2 increases neuronal cGMP, synaptic plasticity and memory performance. *Neuropharmacology*, 47(7), 1081–1092. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.07.040>
- Cadd, G., & McKnight, G. S. (1989). Distinct patterns of cAMP-dependent protein kinase gene expression in mouse brain. *Neuron*, 3(1), 71–79. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90116-5](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90116-5)
- Cerovic, M., d'Isa, R., Tonini, R., & Brambilla, R. (2013). Molecular and cellular mechanisms of dopamine-mediated behavioral plasticity in the striatum. *Neurobiology of Learning and Memory*, 105, 63–80. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.06.013>
- Chappie, T., Humphrey, J., Menniti, F., & Schmidt, C. (2009). PDE10A inhibitors: An assessment of the current CNS drug discovery landscape. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 12(4), 458–467.

- Cherry, J. A., & Davis, R. L. (1999). Cyclic AMP phosphodiesterases are localized in regions of the mouse brain associated with reinforcement, movement, and affect. *Journal of Comparative Neurology*, 407(2), 287–301.
- Coskran, T. M., Morton, D., Menniti, F. S., Adamowicz, W. O., Kleiman, R. J., Ryan, A. M., Strick, C. A., Schmidt, C. J., & Stephenson, D. T. (2006). Immunohistochemical localization of phosphodiesterase 10A in multiple mammalian species. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 54(11), 1205–1213. <https://doi.org/10.1369/jhc.6A6930.2006>
- Curtis, M. J., Alexander, S., Cirino, G., Docherty, J. R., George, C. H., Giembycz, M. A., Hoyer, D., Insel, P. A., Izzo, A. A., Ji, Y., MacEwan, D. J., Sobey, C. G., Stanford, S. C., Teixeira, M. M., Wonnacott, S., & Ahluwalia, A. (2018). Experimental design and analysis and their reporting II: Updated and simplified guidance for authors and peer reviewers. *British Journal of Pharmacology*, 175(7), 987–993. <https://doi.org/10.1111/bph.14153>
- Day, J. J., Roitman, M. F., Wightman, R. M., & Carelli, R. M. (2007). Associative learning mediates dynamic shifts in dopamine signaling in the nucleus accumbens. *Nature Neuroscience*, 10(8), 1020–1028. <https://doi.org/10.1038/nn1923>
- Depry, C., Allen, M. D., & Zhang, J. (2011). Visualization of PKA activity in plasma membrane microdomains. *Molecular BioSystems*, 7(1), 52–58. <https://doi.org/10.1039/c0mb00079e>
- Dostmann, W. R., & Taylor, S. S. (1991). Identifying the molecular switches that determine whether (Rp)-cAMPS functions as an antagonist or an agonist in the activation of cAMP-dependent protein kinase I. *Biochemistry*, 30(35), 8710–8716. <https://doi.org/10.1021/bi00099a032>
- Ehrengruber, M. U., Lundstrom, K., Schweitzer, C., Heuss, C., Schlesinger, S., & Gähwiler, B. H. (1999). Recombinant Semliki Forest virus and Sindbis virus efficiently infect neurons in hippocampal slice cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(12), 7041–7046. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.12.7041>
- Farmer, R., Burbano, S. D., Patel, N. S., Sarmiento, A., Smith, A. J., & Kelly, M. P. (2020). Phosphodiesterases PDE2A and PDE10A both change mRNA expression in the human brain with age, but only PDE2A changes in a region-specific manner with psychiatric disease. *Cellular Signalling*, 70, 109592. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109592>
- Fink, J. S., Weaver, D. R., Rivkees, S. A., Peterfreund, R. A., Pollack, A. E., Adler, E. M., & Reppert, S. M. (1992). Molecular cloning of the rat A2 adenosine receptor: Selective co-expression with D2 dopamine receptors in rat striatum. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 14(3), 186–195. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(92\)90173-9](https://doi.org/10.1016/0169-328x(92)90173-9)
- Girault, J. A., & Greengard, P. (2004). The neurobiology of dopamine signaling. *Archives of Neurology*, 61(5), 641–644. <https://doi.org/10.1001/archneur.61.5.641>
- Gonon, F. (1997). Prolonged and extrasynaptic excitatory action of dopamine mediated by D1 receptors in the rat striatum in vivo. *The Journal of Neuroscience*, 17(15), 5972–5978.
- Grauer, S. M., Pulito, V. L., Navarra, R. L., Kelly, M., Kelley, C., Graf, R., Langen, B., Logue, S., Brennan, J., Jiang, L., Charych, E., Egerland, U., Liu, F., Marquis, K. L., Malamas, M., Hage, T., Comery, T. A., & Brandon, N. J. (2009). PDE10A inhibitor activity in preclinical models of the positive, cognitive and negative symptoms of schizophrenia. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 331, 574–590. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.155994>
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(6), 3440–3450.
- Harada, A., Kaushal, N., Suzuki, K., Nakatani, A., Bobkov, K., Vekich, J. A., Doyle, J. P., & Kimura, H. (2020). Balanced activation of striatal output pathways by faster off-rate PDE10A inhibitors elicits not only antipsychotic-like effects but also procognitive effects in rodents. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 23(2), 96–107. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyz056>
- Hegde, S., Capell, W. R., Ibrahim, B. A., Klett, J., Patel, N. S., Sougiannis, A. T., & Kelly, M. P. (2016). Phosphodiesterase 11A (PDE11A), enriched in ventral hippocampus neurons, is required for consolidation of social but not nonsocial memories in mice. *Neuropsychopharmacology*, 41, 2920–2931. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.106>
- Jäger, R., Schwede, F., Genieser, H. G., Koesling, D., & Russwurm, M. (2010). Activation of PDE2 and PDE5 by specific GAF ligands: Delayed activation of PDE5. *British Journal of Pharmacology*, 161(7), 1645–1660. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00977.x>
- Kehler, J., & Nielsen, J. (2011). PDE10A inhibitors: Novel therapeutic drugs for schizophrenia. *Current Pharmaceutical Design*, 17(2), 137–150. <https://doi.org/10.2174/138161211795049624>
- Kehler, J., Ritzén, A., & Greve, D. R. P. Q. (2007). The potential therapeutic use of phosphodiesterase 10 inhibitors. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 17(2), 147–158. <https://doi.org/10.1517/13543776.17.2.147>
- Kelly, M. P., Adamowicz, W., Bove, S., Hartman, A. J., Mariga, A., Pathak, G., Reinhart, V., Romegialli, A., & Kleiman, R. J. (2014). Select 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases exhibit altered expression in the aged rodent brain. *Cellular Signalling*, 26(2), 383–397. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.10.007>
- Klarenbeek, J., Goedhart, J., van Batenburg, A., Groenewald, D., & Jalink, K. (2015). Fourth-generation Epac-based FRET sensors for cAMP feature exceptional brightness, photostability and dynamic range: Characterization of dedicated sensors for FLIM, for ratiometry and with high affinity. *PLoS ONE*, 10(4), e0122513. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122513>
- Klaus, A., Alves da Silva, J., & Costa, R. M. (2019). What, if, and when to move: Basal ganglia circuits and self-paced action initiation. *Annual Review of Neuroscience*, 42, 459–483. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-072116-031033>
- Kreitzer, A. C., & Malenka, R. C. (2008). Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron*, 60(4), 543–554. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.11.005>
- Lakics, V., Karran, E. H., & Boess, F. G. (2010). Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. *Neuropharmacology*, 59(6), 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.05.004>
- Lilley, E., Stanford, S. C., Kendall, D. E., Alexander, S. P., Cirino, G., Docherty, J. R., George, C. H., Insel, P. A., Izzo, A. A., Ji, Y., Panettieri, R. A., Sobey, C. G., Stefanska, B., Stephens, G., Teixeira, M., & Ahluwalia, A. (2020). ARRIVE 2.0 and the *British Journal of Pharmacology*: Updated guidance for 2020. *British Journal of Pharmacology*, 177(16), 3611–3616. <https://doi.org/10.1111/bph.15178>
- Martinez, S. E., Wu, A. Y., Glavas, N. A., Tang, X. B., Turley, S., Hol, W. G., & Beavo, J. A. (2002). The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(20), 13260–13265. <https://doi.org/10.1073/pnas.192374899>
- Martins, T. J., Mumby, M. C., & Beavo, J. A. (1982). Purification and characterization of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(4), 1973–1979.
- Menniti, F. S., Chappie, T. A., Humphrey, J. M., & Schmidt, C. J. (2007). Phosphodiesterase 10A inhibitors: A novel approach to the treatment of the symptoms of schizophrenia. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 8(1), 54–59.
- Menniti, F. S., Chappie, T. A., & Schmidt, C. J. (2020). PDE10A inhibitors—clinical failure or window into antipsychotic drug action. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 600178. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.600178>

- Mika, D., Bobin, P., Lindner, M., Boet, A., Hodzic, A., Lefebvre, F., Lechène, P., Sadoune, M., Samuel, J. L., Algalarrondo, V., Rucker-Martin, C., Lambert, V., Fischmeister, R., Vandecasteele, G., & Leroy, J. (2019). Synergic PDE3 and PDE4 control intracellular cAMP and cardiac excitation-contraction coupling in a porcine model. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 133, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.05.025>
- Neves-Zaph, S. R. (2017). Phosphodiesterase diversity and signal processing within cAMP signaling networks. *Adv Neurobiol*, 17, 3–14. https://doi.org/10.1007/978-3-319-58811-7_1
- Nishi, A., Kuroiwa, M., Miller, D. B., O'Callaghan, J. P., Bateup, H. S., Shuto, T., Sotogaku, N., Fukuda, T., Heintz, N., Greengard, P., & Snyder, G. L. (2008). Distinct roles of PDE4 and PDE10A in the regulation of cAMP/PKA signaling in the striatum. *The Journal of Neuroscience*, 28(42), 10460–10471. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2518-08.2008>
- Nishi, A., & Snyder, G. L. (2010). Advanced research on dopamine signaling to develop drugs for the treatment of mental disorders: Biochemical and behavioral profiles of phosphodiesterase inhibition in dopaminergic neurotransmission. *Journal of Pharmacological Sciences*, 114(1), 6–16. <https://doi.org/10.1254/jphs.10R01FM>
- Paes, D., Xie, K., Wheeler, D. G., Zook, D., Prickaerts, J., & Peters, M. (2021). Inhibition of PDE2 and PDE4 synergistically improves memory consolidation processes. *Neuropharmacology*, 184, 108414. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108414>
- Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne, W. J., Clark, A., Cuthill, I. C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S. T., Howells, D. W., Karp, N. A., Lazic, S. E., Lidster, K., MacCallum, C. J., Macleod, M., ... Würbel, H. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology*, 18(7), e3000410. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>
- Pérez-Torres, S., Miró, X., Palacios, J. M., Cortés, R., Puigdoménech, P., & Mengod, G. (2000). Phosphodiesterase type 4 isozymes expression in human brain examined by in situ hybridization histochemistry and [³H]rolipram binding autoradiography. Comparison with monkey and rat brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 20(3–4), 349–374. [https://doi.org/10.1016/S0891-0618\(00\)00097-1](https://doi.org/10.1016/S0891-0618(00)00097-1)
- Polito, M., Guiot, E., Gangarossa, G., Longueville, S., Doulazmi, M., Valjent, E., Hervé, D., Girault, J. A., Paupardin-Tritsch, D., Castro, L. R., & Vincent, P. (2015). Selective effects of PDE10A inhibitors on striatopallidal neurons require phosphatase inhibition by DARPP-32. *eNeuro*, 2(4), 1–15. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0060-15.2015>
- Polito, M., Klarenbeek, J., Jalink, K., Paupardin-Tritsch, D., Vincent, P., & Castro, L. R. (2013). The NO/cGMP pathway inhibits transient cAMP signals through the activation of PDE2 in striatal neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 211. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00211>
- Polli, J. W., & Kincaid, R. L. (1994). Expression of a calmodulin-dependent phosphodiesterase isoform (PDE1B1) correlates with brain regions having extensive dopaminergic innervation. *The Journal of Neuroscience*, 14(3 Pt 1), 1251–1261.
- Poppe, H., Rybalkin, S. D., Rehmann, H., Hinds, T. R., Tang, X. B., Christensen, A. E., Schwede, F., Genieser, H. G., Bos, J. L., Doskeland, S. O., Beavo, J. A., & Butt, E. (2008). Cyclic nucleotide analogs as probes of signaling pathways. *Nature Methods*, 5(4), 277–278. <https://doi.org/10.1038/nmeth0408-277>
- Redrobe, J. P., Jørgensen, M., Christoffersen, C. T., Montezinho, L. P., Bastlund, J. F., Carnerup, M., Bundgaard, C., Lerdrup, L., & Plath, N. (2014). In vitro and in vivo characterisation of Lu AF64280, a novel, brain penetrant phosphodiesterase (PDE) 2A inhibitor: Potential relevance to cognitive deficits in schizophrenia. *Psychopharmacology*, 231(16), 3151–3167. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3492-7>
- Redrobe, J. P., Rasmussen, L. K., Christoffersen, C. T., Bundgaard, C., & Jørgensen, M. (2015). Characterisation of Lu AF33241: A novel, brain-penetrant, dual inhibitor of phosphodiesterase (PDE) 2A and PDE10A. *European Journal of Pharmacology*, 761, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.04.040>
- Russwurm, C., Koesling, D., & Russwurm, M. (2015). Phosphodiesterase 10A is tethered to a synaptic signaling complex in striatum. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(19), 11936–11947. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.595769>
- Schmidt, C. J., Chapin, D. S., Cianfrogna, J., Corman, M. L., Hajos, M., Harms, J. F., Hoffman, W. E., Lebel, L. A., McCarthy, S. A., Nelson, F. R., Proulx-LaFrance, C., Majchrzak, M. J., Ramirez, A. D., Schmidt, K., Seymour, P. A., Siuciak, J. A., Tingley, F. D., Williams, R. D., Verhoest, P. R., ... Menniti, F. S. (2008). Preclinical characterization of selective phosphodiesterase 10A inhibitors: A new therapeutic approach to the treatment of schizophrenia. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 325(2), 681–690. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.132910>
- Schülke, J. P., & Brandon, N. J. (2017). Current understanding of PDE10A in the modulation of basal ganglia circuitry. *Advances in Neurobiology*, 17, 15–43. https://doi.org/10.1007/978-3-319-58811-7_2
- Schultz, W., Dayan, P., & Montague, P. R. (1997). A neural substrate of prediction and reward. *Science*, 275(5306), 1593–1599. <https://doi.org/10.1126/science.275.5306.1593>
- Seeger, T. F., Bartlett, B., Coskran, T. M., Culp, J. S., James, L. C., Krull, D. L., Lanfear, J., Ryan, A. M., Schmidt, C. J., Strick, C. A., Varghese, A. H., Williams, R. D., Wylie, P. G., & Menniti, F. S. (2003). Immunohistochemical localization of PDE10A in the rat brain. *Brain Research*, 985(2), 113–126. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)02754-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02754-9)
- Stephenson, D. T., Coskran, T. M., Kelly, M. P., Kleiman, R. J., Morton, D., O'Neill, S. M., Schmidt, C. J., Weinberg, R. J., & Menniti, F. S. (2012). The distribution of phosphodiesterase 2A in the rat brain. *Neuroscience*, 226, 145–155. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.09.011>
- Stephenson, D. T., Coskran, T. M., Wilhelms, M. B., Adamowicz, W. O., O'Donnell, M. M., Muravnick, K. B., Menniti, F. S., Kleiman, R. J., & Morton, D. (2009). Immunohistochemical localization of phosphodiesterase 2A in multiple mammalian species. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 57(10), 933–949. <https://doi.org/10.1369/jhc.2009.953471>
- Sudo, T., Tachibana, K., Toga, K., Tochizawa, S., Inoue, Y., Kimura, Y., & Hidaka, H. (2000). Potent effects of novel anti-platelet aggregatory cAMP analogues on recombinant cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme activity. *Biochemical Pharmacology*, 59(4), 347–356. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00346-9](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00346-9)
- Surmeier, D. J., Ding, J., Day, M., Wang, Z., & Shen, W. (2007). D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends in Neurosciences*, 30(5), 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.008>
- Threlfell, S., Sammut, S., Menniti, F. S., Schmidt, C. J., & West, A. R. (2009). Inhibition of phosphodiesterase 10A increases the responsiveness of striatal projection neurons to cortical stimulation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 328(3), 785–795. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.146332>
- Valjent, E., Bertran-Gonzalez, J., Herve, D., Fisone, G., & Girault, J. A. (2009). Looking BAC at striatal signaling: Cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends in Neurosciences*, 32(10), 538–547. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.06.005>
- Wang, H., Liu, Y., Hou, J., Zheng, M., Robinson, H., & Ke, H. (2007). Structural insight into substrate specificity of phosphodiesterase 10. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(14), 5782–5787. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700279104>

- Yan, C., Bentley, J. K., Sonnenburg, W. K., & Beavo, J. A. (1994). Differential expression of the 61 kDa and 63 kDa calmodulin-dependent phosphodiesterases in the mouse brain. *The Journal of Neuroscience*, 14(3 Pt 1), 973–984.
- Yapo, C., Nair, A. G., Clement, L., Castro, L. R., Hellgren Kotaleski, J., & Vincent, P. (2017). Detection of phasic dopamine by D1 and D2 striatal medium spiny neurons. *The Journal of Physiology*, 595(24), 7451–7475. <https://doi.org/10.1113/JP274475>
- Yapo, C., Nair, A. G., Hellgren Kotaleski, J., Vincent, P., & Castro, L. R. V. (2018). Switch-like PKA responses in the nucleus of striatal neurons. *Journal of Cell Science*, 131(14), jcs216556. <https://doi.org/10.1242/jcs.216556>

How to cite this article: Mota, É., Bompierre, S., Betolngar, D., Castro, L. R. V., & Vincent, P. (2021). Pivotal role of phosphodiesterase 10A in the integration of dopamine signals in mice striatal D₁ and D₂ medium-sized spiny neurones. *British Journal of Pharmacology*, 178(24), 4873–4890. <https://doi.org/10.1111/bph.15664>

4.3 – Calcium-activated phosphodiesterase 1 and cGMP-inhibited phosphodiesterase 3 modulate cyclic nucleotide levels in striatal cholinergic interneurons

4.3.1 – Contexte de l'étude

Les ChIN représentent une faible proportion des neurones du striatum, ils n'en sont toutefois pas moins importants dans la régulation des fonctions du striatum. Leur activité électrique détermine la libération d'ACh. Ils présentent une activité tonique responsable d'une faible libération d'ACh dans le striatum. Cette activité est marquée par des pauses coïncident avec la libération phasique de dopamine. L'activité électrique des ChIN est régulée par plusieurs canaux membranaires, dont les canaux I_h activés par l'AMPc, en faveur d'une dépolarisation des ChIN. Dans le striatum, la libération de NO favorise également une dépolarisation des ChIN.

A l'instar des MSNs, les niveaux d'AMPc et de GMPc sont également régulés par les PDE. Dans le striatum, l'expression de la PDE1B, PDE2A, PDE3A, PDE4B, PDE7B, PDE8B et PDE10A ont été mise en évidence par analyse des messagers. Ces études ont été réalisées sur l'ensemble des neurones du striatum. Toutefois, peu d'étude fonctionnelle se sont intéressées aux rôles des PDE dans la modulation de la voie AMPc/PKA dans les ChIN du striatum.

Afin de mieux comprendre la dynamique de la voie AMPc/PKA dans les ChIN, nous proposons d'utiliser les biosenseurs FRET exprimés génétiquement afin d'étudier le rôle fonctionnel des PDE dans la régulation de l'AMPc et du GMPc. Nous avons réalisés ces expériences sur tranches de cerveau de souris âgés entre 7 et 12 jours.

4.3.2 – Principaux résultats

Nos résultats montrent un rôle fonctionnel des PDE3A, PDE4 dans la régulation des niveaux d'AMPc et un rôle de la PDE1A dans la régulation des niveaux d'AMPc et de GMPc dans les ChIN.

Nous avons mis en évidence une régulation de la PDE3A par le GMPc. Effectivement, un donneur de NO favorise la production de GMPc, qui, par compétition, inhibe l'activité de la PDE3A. Ainsi, le NO augmente les niveaux d'AMPc, par l'inhibition de la PDE3A.

Concernant la PDE1A, son activité est dépendante d'une augmentation de calcium dans les ChIN. L'activation des récepteurs NMDA ou $mGlu_{1/5}$ entraîne une diminution des niveaux d'AMPc et de GMPc, médiée par une augmentation de calcium et l'activation de la PDE1A.

Au cours de ma thèse, j'ai contribué aux résultats concernant le rôle des PDE3A et PDE4 dans la régulation des niveaux d'AMPC et l'inhibition de la PDE3A par la voie NO/GMPc. La conception et la réalisation des expériences concernant le rôle fonctionnel de la PDE1A dans la régulation du GMPc et de l'AMPC des ChIN (Figure 5 à 7) ont été réalisées par d'autres personnes de l'équipe.

4.3.3 – Conclusions

Nos résultats montrent, qu'à l'instar des MSNs, les PDE sont essentielles dans la dynamique des seconds messagers dans les ChIN. La PDE1A et PDE3A se trouvent au croisement de deux ou trois voies de signalisation. L'activation de la voie calcique favorise l'hydrolyse de l'AMPC et du GMPc via l'activation de la PDE1A. Quant à la PDE3, son activité est inhibée par le GMPc. Ainsi, l'activation de la voie NO/GMPc favorise une augmentation de l'AMPC dans les ChIN. Ce mécanisme est probablement mis en jeu dans la dépolarisation des ChIN induite par le NO.

4.3.4 – Articles

Calcium-activated Phosphodiesterase 1 and cGMP-inhibited Phosphodiesterase 3 modulate cyclic nucleotide levels in Striatal Cholinergic Interneurons

Authors

Ségolène Bompierre (1) (0000-0003-1140-4409)

Yelizaveta Byelyayeva (1)

Elia Mota (1) (0000-0003-4393-5781)

Marion Chevallier (1)

Anna Pumo (1)

Jan Kehler (2)

Liliana R.V. Castro (1) (0000-0001-8902-089X)

Pierre Vincent (1, 3) (0000-0002-8479-1908)

Affiliations

1: Sorbonne Université, CNRS, Biological Adaptation and Ageing, F-75005 Paris, France

2: H. Lundbeck A/S, Ottiliavej 9, DK-2500 Valby, Denmark

3: IGF, Univ. Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France

Keywords

Cholinergic interneurons

Striatum

cAMP

cGMP

calcium

Phosphodiesterases

Biosensor imaging

Abstract

To be done.

Introduction

The striatum primarily comprises Gabaergic spiny neurons (MSN) with a small fraction of striatal neurons, represented by cholinergic interneurons (ChIN). ChIN play a critical role in striatal functions (Gonzales & Smith, 2015; Mallet *et al.*, 2019) and are known to fire tonically, thus maintaining a cholinergic tone throughout the striatum. This tonic firing is interspersed with burst - pause - rebound sequences coincident with phasic dopamine release (Aosaki *et al.*, 2010). This pause in acetylcholine release is required to allow for a positive cAMP response to dopamine in MSN of D1 type (Nair *et al.*, 2015; Nair *et al.*, 2019) and is thought to provide a window to encode cortico-striatal plasticity (Reynolds *et al.*, 2022). ChIN electrical activity involves a number of specific membrane conductances, some of which like I_h are under the direct control of intracellular cAMP (Kawaguchi, 1992; Bennett *et al.*, 2000; Santoro *et al.*, 2000). In spite of the functional importance of acetylcholine release pattern in the striatum, how neuromodulatory inputs control ChIN excitability through the cAMP signaling pathways remains little understood.

cAMP is a highly dynamic intracellular second messenger, whose concentration is determined by its production by adenylyl cyclases and degradation by phosphodiesterases (PDEs). While the PDE family is quite wide and diverse (Keravis & Lugnier, 2012), each cell type typically expresses a subset of PDEs thus determining the integrative properties of the neuronal type. For example, MSNs express a high level of PDE10A, which regulates basal cAMP level and is required to maintain a contrasted cAMP signal, while PDE1B, PDE2A and PDE4 appear as modulators of peak cAMP levels (Betolngar *et al.*, 2019; Mota *et al.*, 2021a). In contrast, ChINs express no PDE10A (Xie *et al.*, 2006; Sano *et al.*, 2008) but could express PDE3A, as indicated by punctate labeling in in-situ hybridization (Reinhardt & Bondy, 1996). ChIN also express PDE1A (Polli & Kincaid, 1994), a pattern of expression consistent with single-cell transcriptomics data (Saunders *et al.*, 2018).

The PDE3 family is characterized by a sub-micromolar K_m for cAMP and a low V_{max} for cGMP such that cGMP actually behaves as an inhibitor of the enzyme (Shakur *et al.*, 2001). Soluble guanylyl cyclase is largely expressed throughout the striatum (Ariano *et al.*, 1982; Ding *et al.*, 2004; Matsuoka *et al.*, 1992) suggesting that cGMP might be produced in response to the NO released by PLTS interneurons (Tepper *et al.*, 2010). Indeed, the NO/cGMP pathway has long been known to play an important role in striatal function, by regulating both excitability and synaptic transmission (West & Tseng, 2011). The PDE1 family can degrade both cAMP and cGMP, but is active only in the presence of calcium-calmodulin (Bender & Beavo, 2006). This calcium-dependent activity can be triggered in MSNs by protocols increasing intracellular calcium like the activation of NMDA receptors (Mota *et al.*, 2021a). In addition to AMPA and NMDA receptors, ChIN also express group I metabotropic glutamate receptors mGlu1 and mGlu5 (Tallaksen-Greene *et al.*, 1998; Mitrano & Smith, 2007; Kerner *et al.*, 1997; Bell *et al.*, 2002), which are coupled through G_q/G_{11} to the release of intracellular calcium stores. PDE1 could thus mediate an inhibitory effect of both ionotropic and metabotropic glutamatergic inputs on the amplitude of cAMP responses.

Building on our previous functional study of PDEs with biosensors in the striatum (Mota *et al.*, 2021a), we used acute pharmacology to determine which PDEs are functionally present in ChIN, and how their activity might be regulated by NO and glutamate.

Methods

Brain slice preparations

Mice (male and female C57BL/6J; Janvier labs) were handled in accordance with the Sorbonne University animal care committee regulations. Brain slices were prepared from mice aged from 7 to 11 days. Mice were decapitated and the brain quickly removed and immersed in ice-cold solution of the following composition: 125 mM NaCl, 0.4 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1.25 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 20 mM glucose, 2.5 mM KCl, 5 mM sodium pyruvate and 1 mM kynurenic acid, saturated with 5% CO₂ and 95% O₂. Coronal striatal brain slices were cut with a VT1200S microtome (Leica). The slices were incubated in this solution for 30 minutes and then placed on a Millicell-CM membrane (Millipore) in culture medium (50% Minimum Essential Medium, 50% Hanks' Balanced Salt Solution, 5.5 g/L glucose, penicillin-streptomycin, Invitrogen). The cAMP biosensor Epac-SH150 (Polito *et al.*, 2013), cGMP biosensor cyGNAL (Betolngar *et al.*, 2019) and calcium biosensor Twitch-2B (Thestrup *et al.*, 2014) were expressed using the Sindbis virus as vector (Ehrenguber *et al.*, 1999): the viral vector was added on the brain slices (~5 x 10⁵ particles per slice), and the infected slices were incubated overnight at 35°C under an atmosphere containing 5% CO₂. Before the experiment, slices were incubated for 30 min in the recording solution (125 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1.25 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 20 mM glucose, 2.5 mM KCl and 5 mM sodium pyruvate saturated with 5% CO₂ and 95% O₂). Recordings were performed with a continuous perfusion of the same solution at 32°C.

Chemicals and drugs

Solutions were prepared from powders purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, Isère, France). Tetrodotoxin was from Latoxan (Valence, France). Other compounds and drugs were from Tocris Bio-Techne (Lille, France).

Biosensor imaging

Imaging was performed in the dorso-medial part of the striatum. Wide-field images were obtained with an Olympus BX50WI or BX51WI upright microscope with a 40x 0.8 numerical aperture water-immersion objective and an ORCA-AG camera (Hamamatsu). Images were acquired with iVision (Biovision, Exton, PA, USA). The excitation and dichroic filters were D436/20 and 455dcxt. Signals were acquired by alternating the emission filters, HQ480/40 for donor emission, and D535/40 for acceptor emission, with a filter wheel (Sutter Instruments, Novato, CA, USA). Excitation power at the exit of the microscope objective was 400 to 1400 μ W. Photo-release of NMDA from “caged” precursor MNI-NMDA was performed using a high power 360 nm light-emitting diodes mounted on the epifluorescence port of the microscope, for 0.5 s duration with 14 mW power at the exit of the microscope objective. Filters were obtained from Chroma Technology and Semrock. LED light sources (420 nm with a 436 nm excitation filter and 360 nm) were purchased from Mightex (Toronto, Canada). The frequency of data acquisition was usually 1 image pair every 30 or 60 seconds, but was increased to resolve transient responses.

Wide-field imaging allowed for the separation of ChINs from MSNs, provided that the infection level was kept low and no fluorescence overlap between neighboring neurones was observed. In a few cases, cells were excluded when basal ratio was elevated, when the response to maximal stimulation was lacking or when the neuronal morphology was altered (uneven cell contours).

An application of TTX (200 nM) for 5 min preceded drug applications to stop any ongoing spontaneous activity; in some cases, this induced a decrease in Twitch-2B ratio, consistent with the ChIN exhibiting a tonic firing activity before TTX.

Image analysis

Images were analyzed with a custom software, Ratioscope (Mota *et al.*, 2021b), written in the IGOR Pro environment (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA) as described previously (Polito *et al.*, 2014). No correction for bleed-through or direct excitation of the acceptor was applied. Biosensor activation level was quantified by ratiometric imaging: donor fluorescence divided by acceptor fluorescence for Epac-SH150 and CyGNAL, and acceptor divided by donor for AKAR4 and Twitch-2B. The emission ratio was calculated for each pixel and displayed in pseudo-colour images, with the ratio value coded in hue and the fluorescence of the preparation coded in intensity.

Statistical analysis

Statistical tests were performed with the same Ratioscope package, using built-in Igro Pro functions. Brain slices were considered independent. One experiment is defined as one brain slice being used in a protocol such as that illustrated in Figure 2. Only a single experiment was performed on a brain slice. While most experiments were done with a single ChIN, if more than one was present (up to 4), their responses were averaged. Statistics were calculated per experiment (N); (n) indicates the total number of neurones per condition; (A) indicates the number of animals used for preparing all the brain slices used per condition. No outlier was excluded in this study. The alpha level for statistical significance was 0.05, indicated by * in figures and tables; n.s. indicates that the test showed no significant difference. For some conditions, the Shapiro-Wilk test rejected the hypothesis of normal data distribution and therefore non-parametric statistics were used throughout this study. The Wilcoxon signed rank test was used for paired data. The Wilcoxon-Mann-Whitney test was used to test whether the treatment increased the ratio value for unpaired data.

Estimates of biosensor activation level

Ratiometric imaging can be used to determine absolute analyte concentrations, with ratio values following a Hill equation from R_{min} , the ratio in the absence of ligand, to R_{max} , the ratio in the presence of saturating ligand (Grynkiewicz *et al.*, 1985). For Epac-SH150, considering the low cAMP tone in ChIN (see below), the basal ratio was assumed to be R_{min} . R_{max} was determined for each neuron by the final application of 13 μ M forskolin and 200 μ M IBMX, which is commonly accepted as a condition in which the biosensor is saturated with cAMP. An axis on the right presents cAMP concentration estimates based on these R_{min} and R_{max} value, a Hill equation with a K_d of 10 μ M and a Hill coefficient of 0.77 (Polito *et al.*, 2013; Klarenbeek *et al.*, 2015). With the cyGNAL biosensor, baseline ratio was considered equal to R_{min} (see below); R_{max} was determined for each neuron by the final application of 10 μ M DEANO and 200 μ M IBMX. For calcium imaging, the R_{max} value was difficult to determine since common manipulations aiming at maximizing intracellular calcium, such as NMDA, ionomycin or KCl applications, triggered ratio increases of inconsistent and unstable value. Calcium measurements are therefore presented as raw ratio value.

Immunohistochemistry

After biosensor imaging, brain slices were fixed by overnight immersion in a 4% paraformaldehyde phosphate buffer (PB, 0.1 M, 4°C, pH 7.4). They were then stored at -20°C in a phosphate buffer (PB, 0.1 M) containing 30% (v/v) glycerol and 30% (v/v) ethylene glycol, until they were processed for immunofluorescence. Choline acetyltransferase (ChAT) expression was detected with a goat polyclonal antibody (1:500; 4°C overnight, AB144p, Merck) and revealed with the secondary antibody Alexa Fluor 647 donkey anti-goat IgG (1:500, Jackson ImmunoResearch). Following the incubation of the primary antibodies (4°C, overnight incubation), brain sections were rinsed and incubated with the secondary antibody for 2 h at room temperature. Floating slices were rinsed and images were acquired with a wide-field microscope.

Results

Identification of Cholinergic Interneurons in a brain slice

Sparse biosensor expression in brain slices was obtained after overnight incubation with the sindbis viral vector as described previously (Polito *et al.*, 2014). ChINs were identified from their typical morphology, with a cell body waist diameter of more than 13 μM , an elongated cell body, a nucleus of ovoid shape and wide proximal dendrites. At the end of every experiment, a vertical image stack was acquired to examine the morphology of the recorded cells in 3 dimensions. Our identification criteria were confirmed by immunohistochemical labeling of Choline Acetyltransferase (ChAT) after the experiment (Figure 1, N=5). In addition, biosensor imaging revealed a distinctively slow and moderate cAMP increase in response to forskolin that strikingly departed from MSNs' high responsiveness (see below).

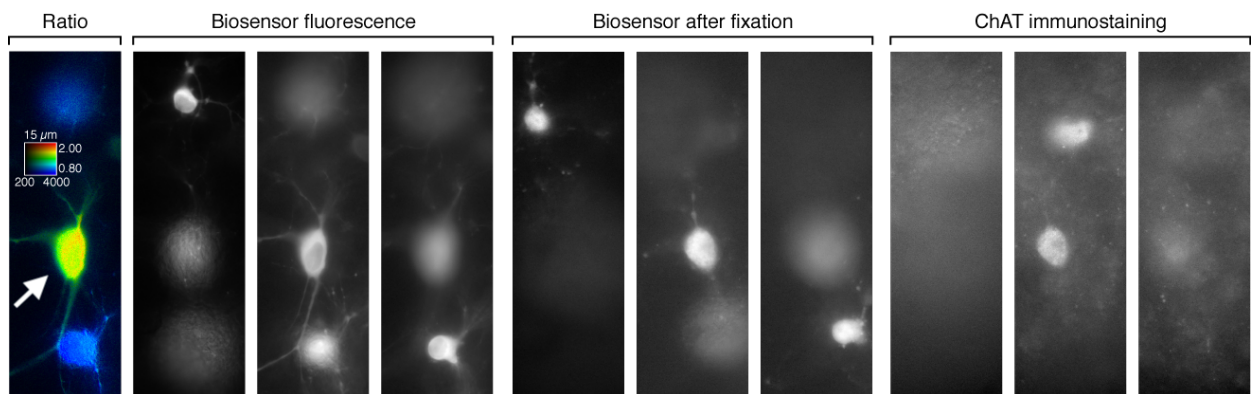
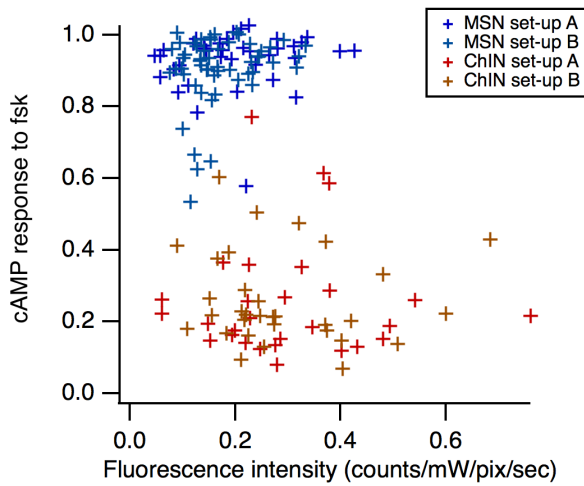


Figure 1: ChIN identification in brain slices. Striatal mouse brain slice transduced for the expression of the calcium biosensor Twitch-2B. The pseudocolor image displays the biosensor emission ratio. The elevated ratio in the ChIN results from its spontaneous activity at the beginning of the recording, and is suppressed with TTX. At the end of the recording, the slice was fixed and immunostained for Choline Acetyltransferase (ChAT). 3 different focal planes are represented in the images in gray levels. From left to right: biosensor fluorescence at 535 nm at the end of the biosensor imaging (Biosensor fluorescence) and after slice fixation using PFA (Biosensor after fixation) and at ??? nm for ChAT immunoreactivity. The arrow indicates a ChIN; the other neurons are putative MSNs.

PDE3 and PDE4 control cAMP levels in ChIN

Our previous work has identified which phosphodiesterases are critical in the regulation of cAMP in MSNs (Mota *et al.*, 2021a) and here we used a similar approach combining selective pharmacological inhibition with biosensor imaging in ChINs.



Supplementary figure 1: no relationship between biosensor concentration and the amplitude of the response to forskolin. Striatal neurons of pup mouse brain slices expressing *Epac-S^{H150}* biosensor. For each neuron, its fluorescence intensity, used as a proxy for biosensor concentration, was measured as follows. A vertical image stack was acquired at the end of each experiment. For each region of interest, the plane in the stack where the neuron showed the best contrast was selected. Since the whole region of interest encompasses some background or dimmer regions of the cell, the intensity was evaluated over the 20% brightest pixels within the region of interest in this plane of the stack. This value is corrected for camera offset, exposure duration, excitation power and shading correction, and expressed as counts per pixel per second (c/pixel/s). All these experiments started with a bath application of forskolin (13 μ M), and for each neuron, this steady-state ratio level in fsk is plotted against fluorescence intensity. No trend is observed that could reveal a relationship between biosensor concentration and responsiveness to fsk.

Stimulation of adenylyl cyclases with forskolin (fsk, 13 μ M) induced a slow and moderate ratio increase, which reached a steady-state level of 0.19 of maximal response after a few minutes (fsk in Figure 2B-D). Addition of the selective PDE3 inhibitor cilostamide (cilo, 10 μ M) increased the ratio to a higher steady-state level (0.49 of Rmax), indicating that PDE3 contributes to cAMP degradation. Addition of the selective PDE4 inhibitor piclamilast (picla, 1 μ M) increased the ratio to a higher level that was not further increased by the addition of the non-specific phosphodiesterase inhibitor IBMX (200 μ M, Figure 2B). This final ratio level is assumed to be the saturation level of the biosensor (Rmax). Of note, a MSN that was imaged simultaneously reached biosensor saturation with forskolin alone (Figure 2B, green ROI), consistent with the particularly high cAMP turn-over in these neurons (Castro *et al.*, 2013). The same experiment was repeated with similar results (Figure 2C; fsk: 0.19; fsk+cilo: 0.49; fsk+cilo+picla: 1.00; N=11; n=18; A=7). In all experiments, potential ongoing spontaneous activity was blocked by 0.2 μ M TTX for a few minutes at the beginning of the recording.

A similar experiment was performed inhibiting first PDE4 with piclamilast, then inhibiting PDE3 with cilostamide (Figure 2D). Again, two MSNs showed a near-maximal response with fsk alone (lower group of traces). This experiment was repeated with similar results (Figure 2E; fsk: 0.19; fsk+picla: 0.46; fsk+picla+cilo: 1.00; N=6; n=7; A=4).

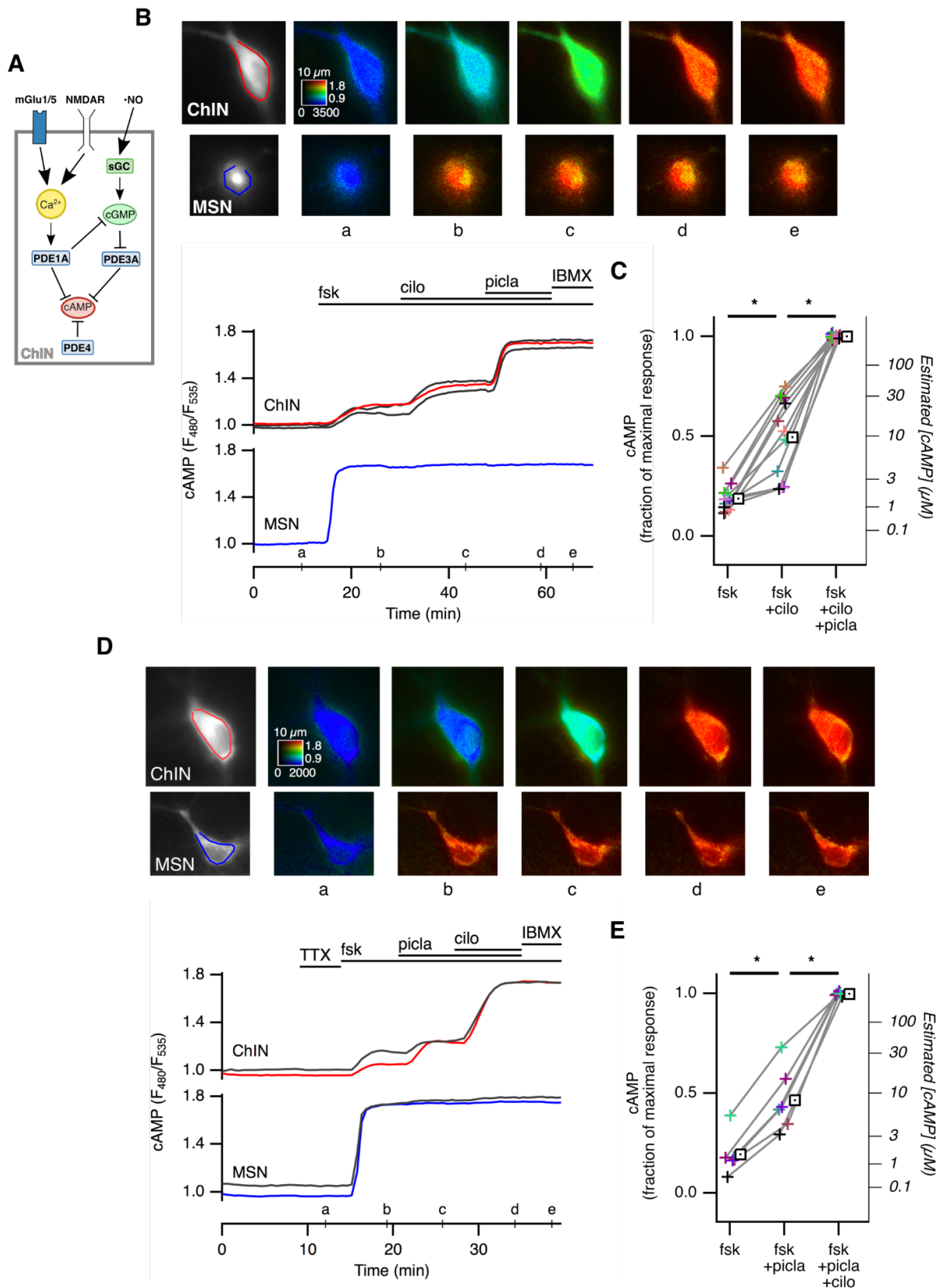


Figure 2: PDE3 and PDE4 are the main phosphodiesterases controlling cAMP in resting ChINs. (A) Schematic representation of cross-pathways regulations of phosphodiesterases in ChINs. (B and D) The *Epac-S^{H150}* biosensor for cAMP was expressed in pup mice striatal brain slices and imaged with wide-field microscopy. Regions of interest shown on the grayscale image

define the area used to measure the ratio (F480/F535) for an individual ChIN (top image, red ROI; red trace in top group) and MSN (bottom image, blue ROI; blue trace in bottom group). Color images (a-e) represent the ratio coded in pseudocolor at the time-points indicated on the graph. Other traces correspond to ROIs measured during the same experiment (not shown). Horizontal bars on the graph indicate the bath application of drugs: tetrodotoxin (TTX, 0.2 μ M), forskolin (fsk, 13 μ M), cilostamide (cilo, 10 μ M), piclamilast (picla, 1 μ M) and IBMX (200 μ M). (C, E) Average normalized ratio measured over the steady-state ratio for each drug combination. Measurements for each experiment are represented as cross markers with the same color and connected by a line. The average of the repeated experiments is indicated with a square marker. * indicates a statistically significant difference.

In the absence of forskolin, application of cilostamide (1 μ M, N=3; n=3; A=3) or PDE4 inhibitors (rolipram, 1 μ M, N=2; n=2; A=2) or their combination (N=6; n=8; A=3) induced no significant ratio change in ChINs (as well as in MSNs). Since PDE3 and PDE4 are involved in the regulation of forskolin-induced cAMP, this suggests that, in the absence of forskolin, basal cAMP production is negligible in ChINs. This contrasts with MSNs in which PDE10 inhibition in the absence of forskolin leads to large increases in cAMP, indicative of a strong basal cAMP production in MSNs (Mota *et al.*, 2021a; Polito *et al.*, 2015).

PDE2A, also highly expressed in the striatum, has a high K_m and is therefore expected to degrade cAMP only at elevated levels (Neves-Zaph, 2017). We thus tested PDE2A activity when adenylyl cyclases were activated and PDE3 was inhibited. In the presence of forskolin and cilostamide, the selective PDE2A inhibitor PF-05180999 (PF-05, 1 μ M) did not increase the steady-state level (N=7; n=13; A=6), indicating that constitutive PDE2A activity does not contribute to cAMP regulation in these neurons.

PDE10A has a low K_m and we tested whether it might contribute to cAMP regulation. The PDE10 inhibitor TP-10 (100 nM) had no effect on the forskolin-induced steady-state cAMP level (N=5; n=7; A=4), showing that PDE10A has no functional activity in ChIN. PDE1, which is not active in the absence of intracellular calcium (Goraya & Cooper, 2005; Betolngar *et al.*, 2019), was unlikely to be active in these experiments in which all spontaneous activity was suppressed with TTX; PDE1 activity will be tested separately below.

Collectively, these experiments indicate that the combined action of PDE3 and PDE4 is responsible for the degradation of cAMP in resting ChINs.

Nitric Oxide increases cGMP levels in ChIN

Our results show that PDE3 is an important regulator of cAMP levels in ChIN. PDE3 degrades both cAMP and cGMP, but the V_{max} of PDE3 for cGMP is very low and cGMP thus behaves as an inhibitor of PDE3 activity towards cAMP hydrolysis. We therefore wondered whether a cGMP signal might, by inhibiting PDE3, indirectly lead to an increase in cAMP level. First, we used the cGMP-selective biosensor cyGNAL (Betolngar *et al.*, 2019) to characterize cGMP responsiveness in these neurons.

Bath application of the inhibitor of soluble guanylyl cyclase ODQ (20 μ M) had no effect (N=4; n=5; A=2), suggesting that there is no detectable basal level of cGMP in our experimental conditions. Bath application of 10 μ M DEANO induced a large ratio increase in both ChIN and MSN. In ChIN the ratio reached \sim 0.80 of the maximal response which was obtained upon application of the non-selective PDE inhibitor IBMX (Figure 3). With a lower dose of 1 μ M DEANO, the ratio increase was slower but still eventually reached a similar steady-state concentration of several micro-molar cGMP.

Of note, Figure 3A also illustrates the lack of effect of forskolin on the ratio signal measured with cyGNAL, while a small response can be seen in MSNs: this is consistent with forskolin increasing cAMP level to several tens of micromolar in MSN (Figure 2), sufficient to partially activate cyGNAL, while at the same time, ChINs only reach $\sim 1 \mu\text{M}$ cAMP.

These experiments show that the NO-cGMP pathway is inactive in basal conditions and can be readily activated in ChINs with $10 \mu\text{M}$ DEANO.

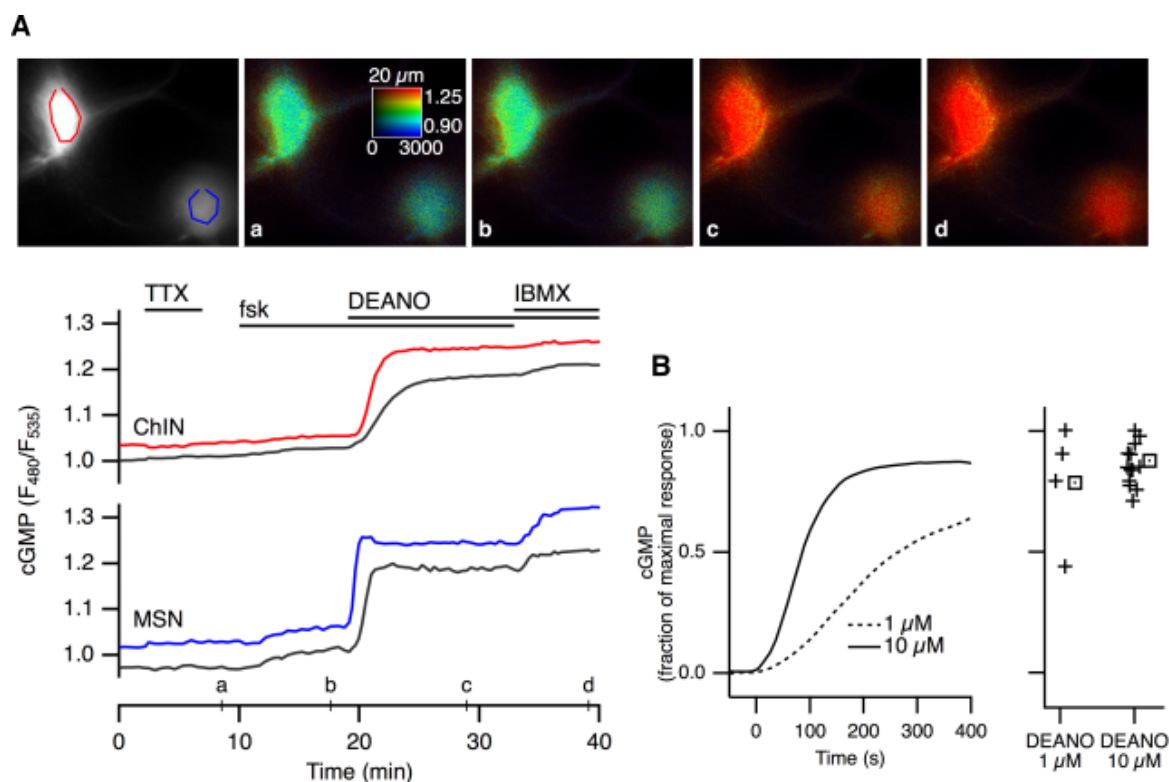


Figure 3: the NO donor (DEANO) increases cGMP in ChINs. (A) The cyGNAL biosensor for cGMP reports a ratio increase upon application of $10 \mu\text{M}$ DEANO, indicative of an increased intracellular level of cGMP. This effect was measured in a ChIN (red ROI) as well as in a neighboring MSN (purple ROI). Ratio measured during the experiment are represented on the graph below, with 2 additional ROIs (not displayed). (B) The same experiment was repeated with DEANO at 1 or $10 \mu\text{M}$ concentration. The graph shows the average time-course of the ratio increase for 1 or $10 \mu\text{M}$ DEANO. The plot shows the steady-state ratio for each experiment as a cross marker. The average is indicated with a square marker.

The cGMP pathway increases cAMP levels through PDE3 inhibition

We then tested whether such activation of the NO-cGMP pathway might increase cAMP through PDE3 inhibition. We used the Epac-S^{H150} biosensor to monitor cAMP. After forskolin increased the ratio to a steady-state level, application of DEANO produced a marked ratio increase which was not increased when cilostamide was added (Figure 4A). This experiment was repeated (Figure 4B, left panel; fsk: 0.32 of maximal response; fsk+DEANO: 0.71; fsk+DEANO+cilo: 0.73; N=6, n=10, A=5). DEANO thus reproduces and occludes the effect of cilostamide. Conversely, when added on top of forskolin and cilostamide, DEANO induced no

further increase, indicating that cilostamide occludes DEANO effect (Figure 4B, right panel; fsk: 0.33; fsk+cilo: 0.62; fsk+cilo+DEANO: 0.63, N = 5, n=8, A=4). This condition further confirms that there is no PDE2A activity in ChINs since, when PDE3 is inhibited, DEANO-induced increase in cGMP should activate PDE2A if any, and should thus decrease cAMP level. In contrast, this effect was observed in MSNs (Figure 4A). Of note, in ChIN, the ratio level reached in the presence of forskolin, DEANO and cilostamide in ChIN was well below biosensor saturation level, and a change of phosphodiesterase action in this situation should have been detectable. In MSN, the ratio level reached with forskolin was maximal or near maximal; in this condition and as expected from the high activity of PDE2A in MSNs (Mota *et al.*, 2021a; Polito *et al.*, 2013), the increase in cGMP induced a decrease in cAMP level (Figure 4A).

Overall, these experiments demonstrate that the activation of the cGMP pathway in ChINs can increase cAMP via PDE3 inhibition, while there is no PDE2A activity.

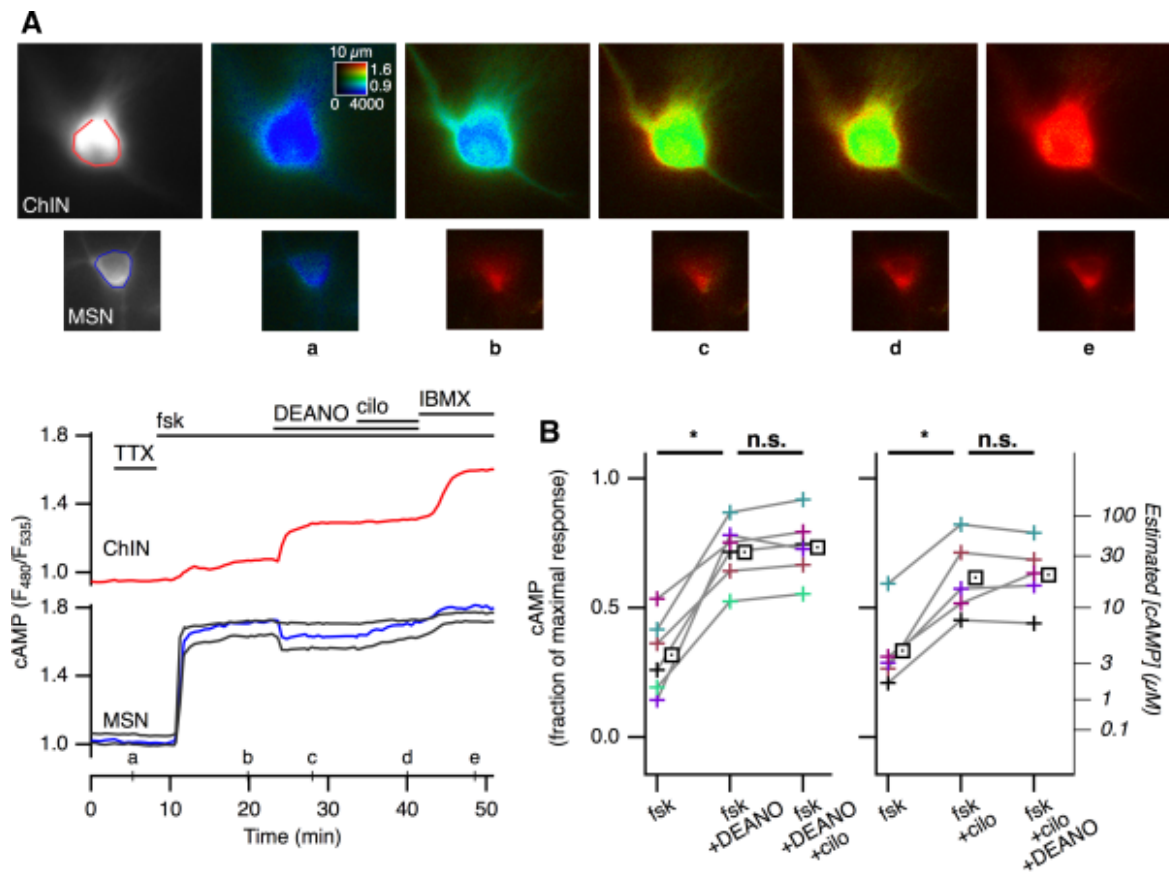


Figure 4: NO donor increases intracellular cAMP through PDE3A inhibition. (A) The Epac- S^{H150} biosensor for cAMP was expressed in striatal brain slices and imaged with wide-field microscopy. Images show a ChIN (top line) and a MSN (bottom line). Traces below show the ratio on these ROIs as well as other MSNs (not shown). (B, left) The same experiment was repeated 6 times. Plots display the average of the response to forskolin (fsk) alone, with DEANO (fsk+DEANO) and cilostamide (fsk+DEANO+cilo). (B, right) Average ratio responses when cilo was applied before DEANO. The average of the different repeats is represented with a square symbol. * indicates a statistically significant difference. n.s. = non significant.

NMDA and mGlu1/5 receptor activation increase calcium levels in ChINs

PDE1B is highly expressed in the striatum (Lakics *et al.*, 2010) and PDE1 activity was described in MSNs (Betolngar *et al.*, 2019). PDE1A is expressed in ChINs (Polli & Kincaid, 1994) and we wanted to determine whether PDE1 might down-regulate cAMP and/or cGMP signals when activated by a calcium signal. First, we wanted to establish reliable protocols to increase intracellular calcium and we used the Twitch-2B ratiometric biosensor to measure this calcium signal (Figure 5A). NMDA receptors can be activated transiently by the NMDA released from the "caged" precursor MNI-NMDA by a flash of UV light. This protocol was used in our previous study to assess PDE1 activity in MSNs (Betolngar *et al.*, 2019). After at least 3 min of bath perfusion with MNI-NMDA (100 μ M), a flash of UV light triggered a large and transient ratio increase in all ChINs tested, as well as in MSNs if present in the same field of view. Type I metabotropic glutamate receptors are coupled via Gq/11 to the IP3/calcium signaling pathway, and we also checked whether mGlu1/5 receptor activation might increase intracellular calcium in ChINs. Bath application of the selective agonist DHPG (50 μ M) produced a ratio increase of

large amplitude and duration. Interestingly, while mGlu1/5 receptors are also expressed in MSNs, no or little calcium response to DHPG was observed in these neurons. Since we did not find a way to determine R_{max} for each cell with this biosensor, statistics were performed on raw ratio values (Figure 5B): NMDA and DHPG induced a ~ 2 fold ratio increase.

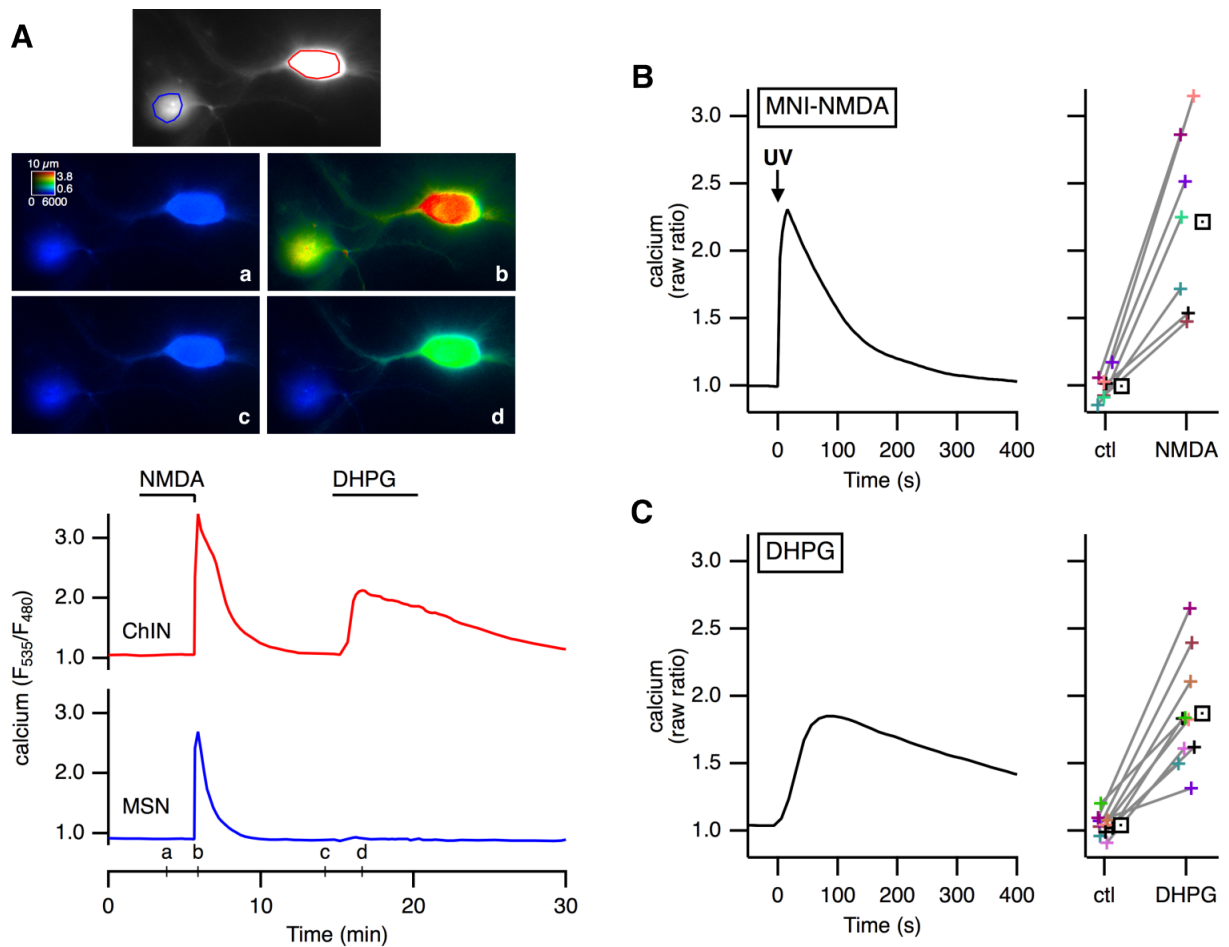


Figure 5: NMDA photorelease or activation of group I mGlu receptors induce large calcium signals in ChIN. The Twitch-2B biosensor was expressed in striatal brain slices and imaged with wide-field microscopy. (A) Intracellular calcium is monitored over regions of interest drawn on a ChIN and on a MSN (purple and green, respectively). Release of NMDA from MNI-NMDA with flash of UV light raised calcium in both neurons, whereas sustained bath application of $50 \mu\text{M}$ DHPG, an agonist of group I metabotropic glutamate receptors, increased intracellular calcium levels selectively in ChIN. (B) Average time-course of the ratio change triggered by NMDA and DHPG is shown on the left; plots display the baseline and peak ratio value measured in ChINs for independent experiments (B: $N=4$; C: $N=5$). The average of the different repeats is represented with a square symbol.

The calcium pathway decreases cAMP and cGMP via PDE1 activation

We then wanted to determine whether such increases in intracellular calcium could reduce cAMP or cGMP, via the activation of PDE1. A steady-state elevated cAMP level was first obtained using $0.5 \mu\text{M}$ fsk and blocking PDE3 and PDE4 with either $1 \mu\text{M}$ cilo and $1 \mu\text{M}$

roflumilast or 10 μ M cilo and 1 μ M piclamilast. PDE2A were shown later to have no activity in ChINs, and in these earlier experiments, the PDE2A inhibitor PF-05180999 (1 μ M) was included.

NMDA uncaging or DHPG bath application both produced large decreases in cAMP levels in ChIN (Figure 6, left: before NMDA application : 0.88 of Rmax, NMDA application : 0.29, N=6, n=9, A=5; before DHPG: 0.77, DHPG application: 0.40, N=5, n=7, A=4). These effects were blocked with Lu AF64196 (1-10 μ M), a potent and selective PDE1 inhibitor (Khammy *et al.*, 2017) (figure 6, right: before NMDA application : 0.91 of Rmax, NMDA application : 0.83, N=6, n=9, A=4; before DHPG: 0.86, DHPG application: 0.89, N=5, n=8, A=3). Of note, the addition of the PDE1 inhibitor did not increase the steady-state cAMP level, demonstrating that PDE1 did not exhibit a tonic activity before its activation by the calcium signal.

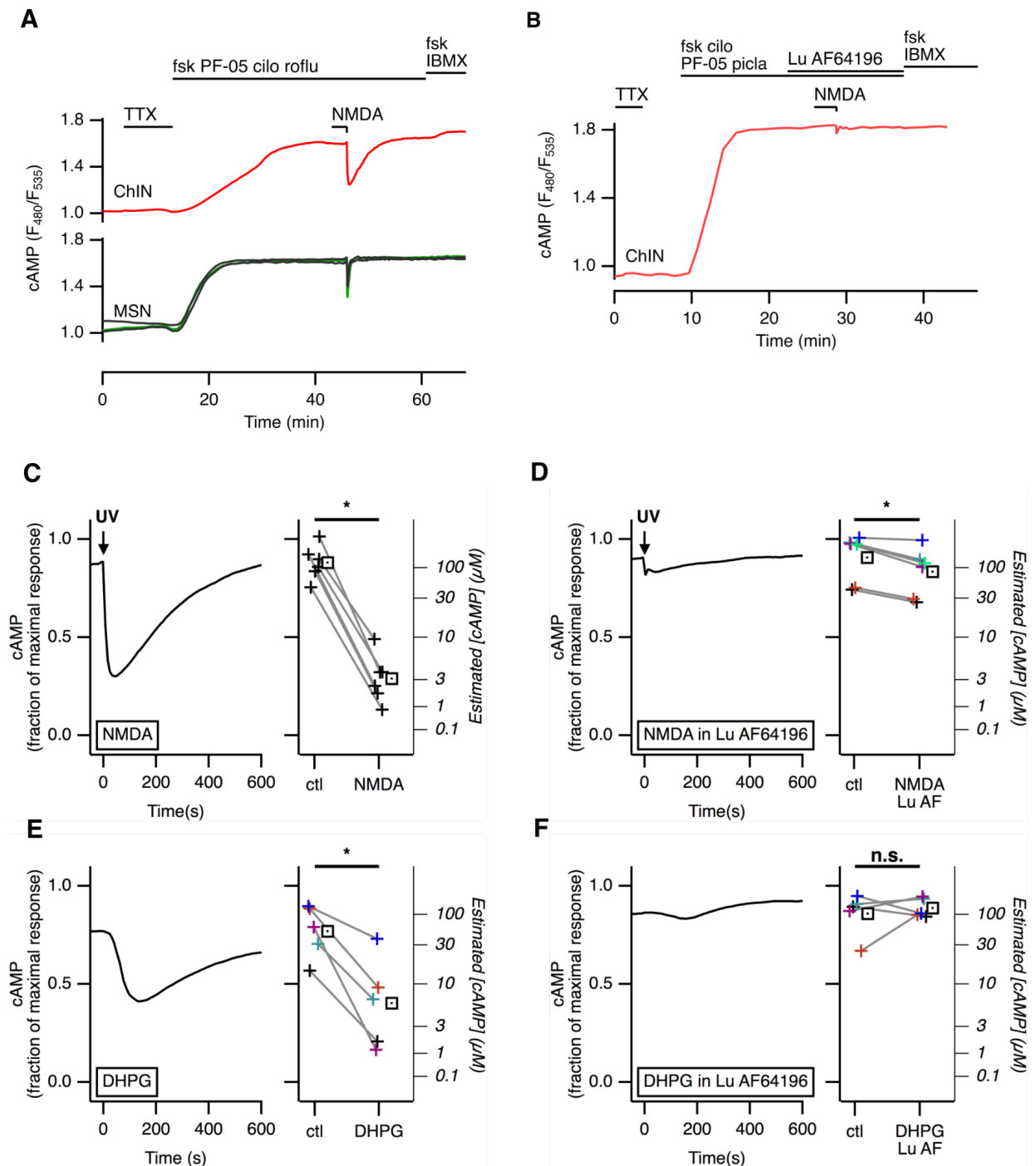


Figure 6: activation of NMDA or mGlu1/5 receptors in ChIN decreases cAMP via PDE1 activation. The *Epac-S^{H150}* biosensor for cAMP was expressed in striatal brain slices and ChINs were imaged with wide-field microscopy. cAMP production was stimulated with 0.5 μ M fsk in the presence of inhibitors of PDE2A (PF-05180999, 1 μ M), PDE3 (cilo, 1 μ M or 10 μ M) and PDE4 (roflumilast or piclamilast, 1 μ M). On the steady-state cAMP level, a flash of UV light at the time indicated by the arrow was used to photorelease NMDA from MNI-NMDA (100 μ M), or DHPG (50 μ M) was applied in the bath. Both stimuli induced a transient decrease in cAMP concentration: the graph shows the average normalized cAMP signal, and the plot shows the amplitude of the steady-state cAMP level (ctl) and minimal cAMP level reached in response to the calcium signal (NMDA or DHPG, left). The same protocol was performed in the presence of

the selective PDE1 inhibitor Lu AF64196 (1 μ M), which largely reduced the effect on cAMP level (right).

We then tested whether the same protocols could also reveal an effect of PDE1 on cGMP level in ChINs. In these experiments, mGlu1/5 receptors were activated with 1 μ M quisqualate in the presence of the AMPA receptor antagonist NBQX (1 μ M) and NMDA antagonist D-AP5 (20 μ M). A steady-state cGMP was obtained with a bath application of 10 μ M DEANO. NMDA uncaging or quisqualate bath application both produced large decreases in cGMP levels in ChIN (Figure 7, left: before NMDA application : 0.80 of Rmax, NMDA application : 0.18, N=9, n=13, A=9; before quisqualate: 0.83, quisqualate application: 0.22, N=5, n=9, A=4). Again, these effects were blocked with Lu AF64196 (1-10 μ M) (figure 6, right: before NMDA application : 0.76 of Rmax, NMDA application : 0.80, N=6, n=7, A=6; before DHPG: 0.88, DHPG application: 0.84, N=5, n=7, A=3). The addition of the PDE1 inhibitor did not increase the steady-state cAMP level, demonstrating that, like for cAMP, PDE1 did not exhibit a tonic activity before its activation by the calcium signal.

Collectively, these experiments show that ChINs display functional PDE1 activity that can efficiently degrade both cAMP and cGMP in response to an increase in intracellular calcium.

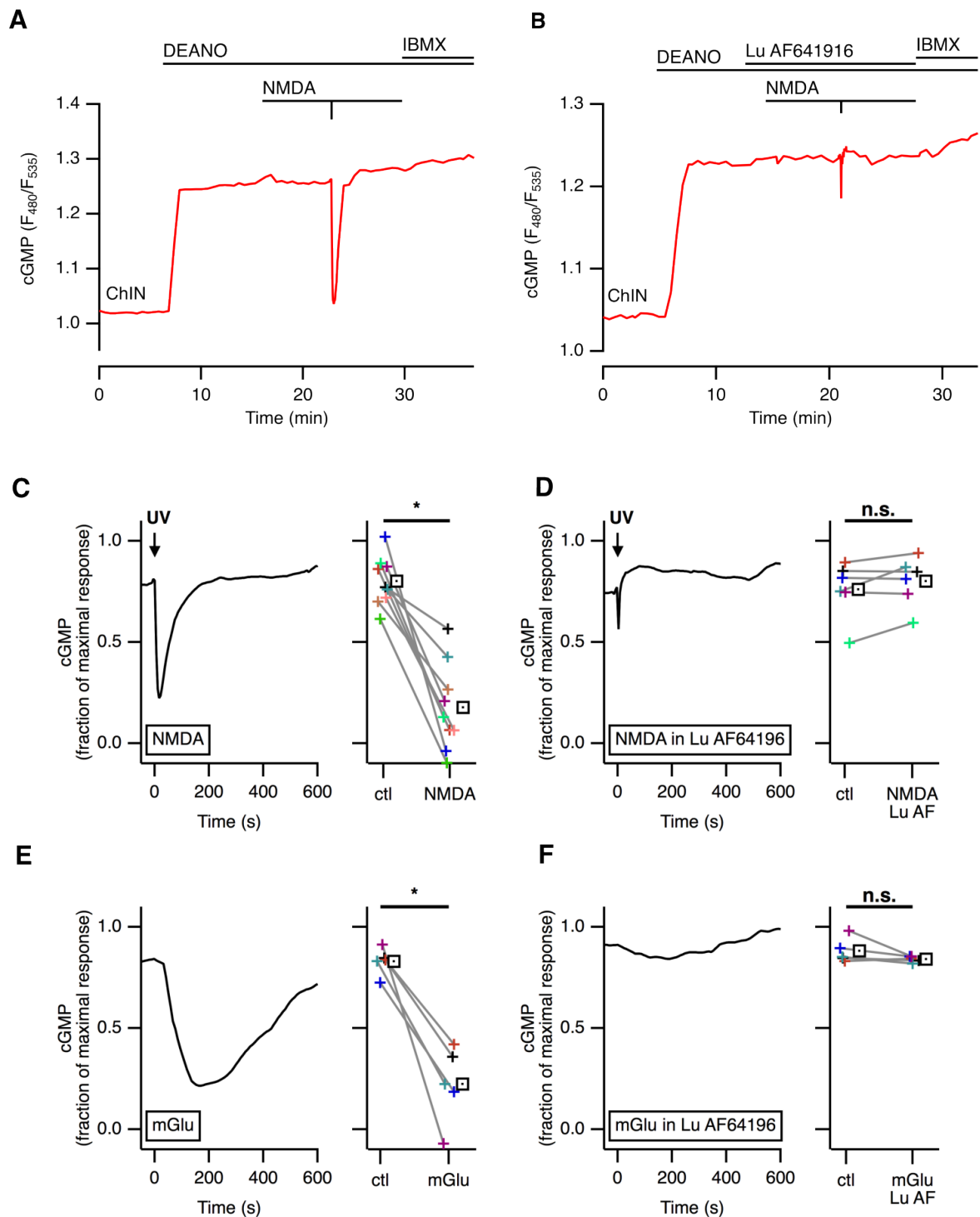


Figure 7: activation of NMDA or mGlu1/5 receptors in ChIN decreases cGMP via PDE1 activation. The cyGNAL biosensor for cGMP was expressed in striatal brain slices and ChINs were imaged with wide-field microscopy. (A) cGMP production was stimulated with 10 μM DEANO. On the steady-state cAMP level, the calcium signal was triggered with a flash of UV light at the time indicated by the arrow to photorelease NMDA from MNI-NMDA (100 μM), or by bath application of quisqualate (50 μM) together with NBQX (1 μM) and D-AP5 (20 μM). Both stimuli induced a transient decrease in cGMP concentration: the graph shows the average normalized cGMP signal, and the plot shows the amplitude of the steady-state cGMP level (ctl) and minimal cGMP level reached in response to the calcium signal (NMDA or mGlu, left). The

same protocol was performed in the presence of the selective PDE1 inhibitor Lu AF64196 (1 μ M), which largely reduced the effect on cGMP level (right).

Discussion

Our experiments highlight three phosphodiesterases as responsible for degrading cAMP and cGMP in ChIN, namely PDE1, PDE3 and PDE4. Selective PDE3 inhibition with cilostamide triggers an increase in cAMP in ChIN, demonstrating that this enzyme is active and contributes to the regulation of cAMP in these neurons. This is consistent with in situ hybridization data showing PDE3A gene expression in "large striatal neurons" (Reinhardt & Bondy, 1996). Single-cell RNA sequencing also revealed PDE3A expression in the "STR Interneuron_Chat [#12]" cluster (Saunders *et al.*, 2018) which corresponds to ChIN. In contrast, these same reports indicate a lack of PDE3 expression in MSNs, which is consistent with our experiments showing no PDE3 activity in MSNs. While PDE3 thus seems to be a characteristic feature of ChINs, we also report that PDE4 contributes to the regulation of cAMP in ChIN. PDE4s show a much less cell-specific pattern of expression since PDE4B is also expressed and functionally present in MSNs (Cherry & Davis, 1999; Heiman *et al.*, 2008; Nishi *et al.*, 2008; Mota *et al.*, 2021a). When intracellular calcium was elevated through glutamate receptors, we found that PDE1 also contributes to the regulation of cAMP and cGMP. PDE1A is selectively expressed in ChIN (Polli & Kincaid, 1994; Saunders *et al.*, 2018), while the additional presence of PDE1B in ChIN remains unclear. PDE1B is highly expressed in MSNs, where it regulates peak cAMP responses to dopamine and contributes to long-term plasticity (Betolngar *et al.*, 2019).

Although highly expressed in the striatum, we found no indication of PDE2A or PDE10A activity in ChINs, consistent with their lack of expression in ChIN (Saunders *et al.*, 2018; Xie *et al.*, 2006; Sano *et al.*, 2008). PDE2A and PDE10A thus appear to play a specific role in striatal MSNs, as previously reported (Polito *et al.*, 2013; Polito *et al.*, 2015; Mota *et al.*, 2021a).

Cross-pathway integration: cGMP

Importantly, our experiments demonstrate that PDE3 can be the mediator of a positive control of the NO/cGMP pathway on cAMP, through which an increase in cGMP leads to an increase in cAMP. To our knowledge, this is the first time this positive control of cGMP on cAMP is reported in neurons, but this has already been reported in various preparations.

This part has to be explained in more details with references to other preparations (heart, vasculature) in which this cGMP-PDE3-cAMP regulation has also been demonstrated.

Cross-pathway integration: calcium

Another cross-pathway integration level is provided by PDE1A, which powerfully degrades both cAMP and cGMP. This PDE is active only in the presence of calcium since the application of PDE1 inhibitor did not increase the steady-state cAMP or cGMP level, consistent with the lack of PDE1 activity unless intracellular calcium is increased. A similar calcium-induced decrease in cAMP and cGMP has been reported in MSNs, as well as in several other brain regions (Betolngar *et al.*, 2019). Whether PDE1A in ChIN vs PDE1B in MSNs leads to functional differences in this cross-pathway modulation remains to be investigated.

ChINs vs MSNs integrative properties

Interestingly, we observed that the activation of group I mGlu receptors triggered large and long lasting increases in intracellular calcium. While group I mGlu are also expressed in MSNs,

we observed no or very modest calcium responses in MSNs. ChINs also exhibit dynamics of cAMP signals that strikingly depart from MSNs. While MSNs reached biosensor saturation as soon as forskolin was applied (i.e. over 100 μ M concentration), ChIN showed in contrast very slow increases in cAMP concentration, barely reaching a micromolar level after several minutes. This reinforces the view that these two neuronal types bear intrinsic differences in signal integration properties that endow them with fundamentally different functions in the striatal network.

These striking differences can result from a number of factors. First, the type of receptors and signaling enzymes expressed in these two neuronal types differ notably. For example, ChINs express type 2 adenylyl cyclase, whereas MSNs mainly express type 5 (Matsuoka *et al.*, 1997; Saunders *et al.*, 2018). Another important factor is the amount of active signaling enzyme, i.e. the density of cyclase per membrane surface or amount of calcium-store per cytosolic volume, in relation with cell geometry. Indeed, ChINs have a large soma, their proximal dendrites have a large diameter compared to the much thinner MSNs (Tepper *et al.*, 2010; Tepper *et al.*, 2018). Surface to volume ratio critically determines whether a signal gets amplified or dampened (Neves *et al.*, 2008) and in the case of cAMP, small neurons like MSNs can accumulate cAMP more easily. In contrast, ChINs with a larger cytosol in which cAMP gets degraded by PDEs are in a less favorable position to accumulate enough cAMP to be detected by our cytosolic biosensors.

Physiological implications

Physiologically, cAMP promotes the activation of I_h current (Kaupp & Seifert, 2001) which may underlie changes in ChIN electrical activity. ChIN express a robust I_h current (Kawaguchi, 1992; Bennett *et al.*, 2000), mainly mediated by HCN2 (Notomi & Shigemoto, 2004; Zhao *et al.*, 2016). The direct binding of cAMP on HCN channels shifts their activation curve, facilitating the depolarization and increasing firing frequency. Our results thus suggest that the activation of the NO/cGMP axis, by inhibiting PDE3A and increasing intracellular cAMP, could lead to ChIN depolarization. Interestingly, this is what was observed electrophysiologically, with NO donors promoting ChIN depolarization (Centonze *et al.*, 2001). Symmetrically in MSNs, the NO/cGMP axis activates PDE2A, which decreases cAMP (Polito *et al.*, 2013). In MSNs, increased cAMP is associated with increased excitability, and NO thus has opposite effects on cAMP in these two neuronal types.

Besides the regulation of intrinsic excitability, the NO/cGMP pathway also plays an important role in synaptic plasticity (West & Tseng, 2011; Blomeley *et al.*, 2015; Padovan-Neto & West, 2017). Acetylcholine is also implicated in many aspects of synaptic plasticity, and most protocols of synaptic plasticity are performed in an intact striatal network, comprising active ChIN. Whether NO-induced PDE3A inhibition in ChIN mediates part of this effect should now be evaluated experimentally.

Integration at the network level

Phasic release of dopamine leads to a biphasic response of ChIN : first a pause dependent of D2 receptor expressed by ChIN, then a burst of AP (Straub *et al.*, 2014)

Phasic release of dopamine leads also to an activation of NOergic interneurons, reinforced by glutamate and leading to activation of nNOS, release of NO and increase of ChIN activity.

Maybe : the burst of AP observed in ChIN after phasic dopamine release is caused by the action of NO on ChIN .

NOergic interneurons could act as a 'lock' to close the launch windows of dopamine for the selection of movement. Coherent with studies showing the role of ChIN in the termination of movement (Gritton 2019)

These observations may be of significance in pathological situations such as Parkinson's disease. Indeed, the first medication for Parkinson's disease was based on anticholinergic drugs, and photoinhibition of ChIN shows prominent anti-parkinsonian effects (Ztaou *et al.*, 2016; Maurice *et al.*, 2015). It is interesting to note that, while NO donors increase ChIN firing, this effect is more pronounced in a mouse model of Parkinson's disease (Galati *et al.*, 2008), suggesting that moderating the excessive ChIN activity might help reduce some symptoms of Parkinson's disease. This novel understanding of the NO/cGMP/cAMP interaction could eventually lead to the development of novel therapeutic strategies targeting PDE3A.

References

- Aosaki T, Miura M, Suzuki T, Nishimura K & Masuda M (2010). Acetylcholine-dopamine balance hypothesis in the striatum: an update. *Geriatr Gerontol Int* **10 Suppl 1**, S148–57.
- Ariano MA, Lewicki JA, Brandwein HJ & Murad F (1982). Immunohistochemical localization of guanylate cyclase within neurons of rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 1316–1320.
- Bell MI, Richardson PJ & Lee K (2002). Functional and molecular characterization of metabotropic glutamate receptors expressed in rat striatal cholinergic interneurons. *J Neurochem* **81**, 142–149.
- Bender AT & Beavo JA (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* **58**, 488–520.
- Bennett BD, Callaway JC & Wilson CJ (2000). Intrinsic membrane properties underlying spontaneous tonic firing in neostriatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* **20**, 8493–8503.
- Betolngar DB, Mota É, Fabritius A, Nielsen J, Hougaard C, Christoffersen CT, Yang J, Kehler J, Griesbeck O, Castro LRV & Vincent P (2019). Phosphodiesterase 1 Bridges Glutamate Inputs with NO- and Dopamine-Induced Cyclic Nucleotide Signals in the Striatum. *Cereb Cortex* **29**, 5022–5036.
- Blomeley CP, Cains S & Bracci E (2015). Dual Nitroergic/Cholinergic Control of Short-Term Plasticity of Corticostriatal Inputs to Striatal Projection Neurons. *Front Cell Neurosci* **9**, 453.
- Castro LR, Brito M, Guiot E, Polito M, Korn CW, Herve D, Girault JA, Paupardin-Tritsch D & Vincent P (2013). Striatal neurones have a specific ability to respond to phasic dopamine release. *J Physiol* **591**, 3197–3214.
- Centonze D, Pisani A, Bonsi P, Giacomini P, Bernardi G & Calabresi P (2001). Stimulation of nitric oxide-cGMP pathway excites striatal cholinergic interneurons via protein kinase G activation. *J Neurosci* **21**, 1393–1400.
- Cherry JA & Davis RL (1999). Cyclic AMP phosphodiesterases are localized in regions of the mouse brain associated with reinforcement, movement, and affect. *J Comp Neurol* **407**, 287–301.
- Ding JD, Burette A, Nedvetsky PI, Schmidt HH & Weinberg RJ (2004). Distribution of soluble guanylyl cyclase in the rat brain. *J Comp Neurol* **472**, 437–448.
- Ehrengruber MU, Lundstrom K, Schweitzer C, Heuss C, Schlesinger S & Gähwiler BH (1999). Recombinant Semliki Forest virus and Sindbis virus efficiently infect neurons in hippocampal slice cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7041–7046.
- Galati S, D'angelo V, Scarnati E, Stanzione P, Martorana A, Procopio T, Sancesario G & Stefani A (2008). In vivo electrophysiology of dopamine-denervated striatum: focus on the nitric oxide/cGMP signaling pathway. *Synapse* **62**, 409–420.
- Gonzales KK & Smith Y (2015). Cholinergic interneurons in the dorsal and ventral striatum: anatomical and functional considerations in normal and diseased conditions. *Ann N Y Acad Sci* **1349**, 1–45.
- Goraya TA & Cooper DM (2005). Ca²⁺-calmodulin-dependent phosphodiesterase (PDE1): current perspectives. *Cell Signal* **17**, 789–797.
- Grynkiewicz G, Poenie M & Tsien RY (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**, 3440–3450.

- Heiman M, Schaefer A, Gong S, Peterson JD, Day M, Ramsey KE, Suarez-Farinas M, Schwarz C, Stephan DA, Surmeier DJ, Greengard P & Heintz N (2008). A translational profiling approach for the molecular characterization of CNS cell types. *Cell* **135**, 738–748.
- Kaupp UB & Seifert R (2001). Molecular Diversity of Pacemaker Ion Channels. *Annu Rev Physiol* **63**, 235–257.
- Kawaguchi Y (1992). Large aspiny cells in the matrix of the rat neostriatum in vitro: physiological identification, relation to the compartments and excitatory postsynaptic currents. *J Neurophysiol* **67**, 1669–1682.
- Keravis T & Lugnier C (2012). Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. *Br J Pharmacol* **165**, 1288–1305.
- Kerner JA, Standaert DG, Penney JB, Young AB & Landwehrmeyer GB (1997). Expression of group one metabotropic glutamate receptor subunit mRNAs in neurochemically identified neurons in the rat neostriatum, neocortex, and hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* **48**, 259–269.
- Khammy MM, Dalsgaard T, Larsen PH, Christoffersen CT, Clausen D, Rasmussen LK, Folkersen L, Grunnet M, Kehler J, Aalkjaer C & Nielsen J (2017). PDE1A inhibition elicits cGMP-dependent relaxation of rat mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* **174**, 4186–4198.
- Klarenbeek J, Goedhart J, van Batenburg A, Groenewald D & Jalink K (2015). Fourth-Generation Epac-Based FRET Sensors for cAMP Feature Exceptional Brightness, Photostability and Dynamic Range: Characterization of Dedicated Sensors for FLIM, for Ratiometry and with High Affinity. *PLoS One* **10**, e0122513.
- Lakics V, Karran EH & Boess FG (2010). Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. *Neuropharmacology* **59**, 367–374.
- Mallet N, Leblois A, Maurice N & Beurrier C (2019). Striatal Cholinergic Interneurons: How to Elucidate Their Function in Health and Disease. *Front Pharmacol* **10**, 1488.
- Matsuoka I, Giuli G, Poyard M, Stengel D, Parma J, Guellaen G & Hanoune J (1992). Localization of adenylyl and guanylyl cyclase in rat brain by in situ hybridization: comparison with calmodulin mRNA distribution. *J Neurosci* **12**, 3350–3360.
- Matsuoka I, Suzuki Y, Defer N, Nakanishi H & Hanoune J (1997). Differential expression of type I, II, and V adenylyl cyclase gene in the postnatal developing rat brain. *J Neurochem* **68**, 498–506.
- Maurice N, Liberge M, Jaouen F, Ztaou S, Hanini M, Camon J, Deisseroth K, Amalric M, Kerkerian-Le Goff L & Beurrier C (2015). Striatal Cholinergic Interneurons Control Motor Behavior and Basal Ganglia Function in Experimental Parkinsonism. *Cell Rep* **13**, 657–666.
- Mitrano DA & Smith Y (2007). Comparative analysis of the subcellular and subsynaptic localization of mGluR1a and mGluR5 metabotropic glutamate receptors in the shell and core of the nucleus accumbens in rat and monkey. *J Comp Neurol* **500**, 788–806.
- Mota É, Bompierre S, Betolngar D, Castro LRV & Vincent P (2021a). Pivotal role of phosphodiesterase 10A in the integration of dopamine signals in mice striatal D₁ and D₂ medium-sized spiny neurones. *Br J Pharmacol* **178**, 4873–4890.
- Mota E, Bompierre S, Castro LRV & Vincent P (2021b). Phosphodiesterase 2A, 4 and 10A contribution in the integration of dopamine signals in mice striatal D1 and D2 medium-sized spiny neurones. *EBRAINS*
- Nair AG, Castro LRV, El Khoury M, Gorgievski V, Giros B, Tzavara ET, Hellgren-Kotaleski J & Vincent P (2019). The high efficacy of muscarinic M4 receptor in D1 medium spiny neurons reverses striatal hyperdopaminergia. *Neuropharmacology* **146**, 74–83.
- Nair AG, Gutierrez-Arenas O, Eriksson O, Vincent P & Hellgren Kotaleski J (2015). Sensing Positive versus Negative Reward Signals through Adenylyl Cyclase-Coupled GPCRs in Direct and Indirect Pathway Striatal Medium Spiny Neurons. *J Neurosci* **35**, 14017–14030.
- Neves-Zaph SR (2017). Phosphodiesterase Diversity and Signal Processing Within cAMP Signaling Networks. *Adv Neurobiol* **17**, 3–14.
- Neves SR, Tsokas P, Sarkar A, Grace EA, Rangamani P, Taubenfeld SM, Alberini CM, Schaff JC, Blitzer RD, Moraru II & Iyengar R (2008). Cell shape and negative links in regulatory motifs together control spatial information flow in signaling networks. *Cell* **133**, 666–680.

- Nishi A, Kuroiwa M, Miller DB, O'Callaghan JP, Bateup HS, Shuto T, Sotogaku N, Fukuda T, Heintz N, Greengard P & Snyder GL (2008). Distinct roles of PDE4 and PDE10A in the regulation of cAMP/PKA signaling in the striatum. *J Neurosci* **28**, 10460–10471.
- Notomi T & Shigemoto R (2004). Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1–4, in the rat brain. *J Comp Neurol* **471**, 241–276.
- Padovan-Neto FE & West AR (2017). Regulation of Striatal Neuron Activity by Cyclic Nucleotide Signaling and Phosphodiesterase Inhibition: Implications for the Treatment of Parkinson's Disease. *Adv Neurobiol* **17**, 257–283.
- Polito M, Guiot E, Gangarossa G, Longueville S, Doulazmi M, Valjent E, Hervé D, Girault JA, Paupardin-Tritsch D, Castro LR & Vincent P (2015). Selective Effects of PDE10A Inhibitors on Striatopallidal Neurons Require Phosphatase Inhibition by DARPP-32. *eNeuro* **2**, ENEURO.0060–15.2015.
- Polito M, Klarenbeek J, Jalink K, Paupardin-Tritsch D, Vincent P & Castro LR (2013). The NO/cGMP pathway inhibits transient cAMP signals through the activation of PDE2 in striatal neurons. *Front Cell Neurosci* **7**, 211.
- Polito M, Vincent P & Guiot E (2014). Biosensor imaging in brain slice preparations. In *1071* ed. Zhang J, pp. 175–194. Humana Press,
- Polli JW & Kincaid RL (1994). Expression of a calmodulin-dependent phosphodiesterase isoform (PDE1B1) correlates with brain regions having extensive dopaminergic innervation. *J Neurosci* **14**, 1251–1261.
- Reinhardt RR & Bondy CA (1996). Differential cellular pattern of gene expression for two distinct cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases in developing and mature rat brain. *Neuroscience* **72**, 567–578.
- Reynolds JNJ, Avvisati R, Dodson PD, Fisher SD, Oswald MJ, Wickens JR & Zhang YF (2022). Coincidence of cholinergic pauses, dopaminergic activation and depolarisation of spiny projection neurons drives synaptic plasticity in the striatum. *Nat Commun* **13**, 1296.
- Sano H, Nagai Y, Miyakawa T, Shigemoto R & Yokoi M (2008). Increased social interaction in mice deficient of the striatal medium spiny neuron-specific phosphodiesterase 10A2. *J Neurochem* **105**, 546–556.
- Santoro B, Chen S, Luthi A, Pavlidis P, Shumyatsky GP, Tibbs GR & Siegelbaum SA (2000). Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J Neurosci* **20**, 5264–5275.
- Saunders A, Macosko EZ, Wysoker A, Goldman M, Krienen FM, de Rivera H, Bien E, Baum M, Bortolin L, Wang S, Goeva A, Nemes J, Kamitaki N, Brumbaugh S, Kulp D & McCarroll SA (2018). Molecular Diversity and Specializations among the Cells of the Adult Mouse Brain. *Cell* **174**, 1015–1030.e16.
- Shakur Y, Holst LS, Landstrom TR, Movsesian M, Degerman E & Manganiello V (2001). Regulation and function of the cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3) gene family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **66**, 241–277.
- Straub C, Tritsch NX, Hagan NA, Gu C & Sabatini BL (2014). Multiphasic modulation of cholinergic interneurons by nigrostriatal afferents. *J Neurosci* **34**, 8557–8569.
- Tallaksen-Greene SJ, Kaatz KW, Romano C & Albin RL (1998). Localization of mGluR1a-like immunoreactivity and mGluR5-like immunoreactivity in identified populations of striatal neurons. *Brain Res* **780**, 210–217.
- Tepper JM, Koós T, Ibanez-Sandoval O, Tecuapetla F, Faust TW & Assous M (2018). Heterogeneity and Diversity of Striatal GABAergic Interneurons: Update 2018. *Front Neuroanat* **12**, 91.
- Tepper JM, Tecuapetla F, Koos T & Ibanez-Sandoval O (2010). Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. *Front Neuroanat* **4**, 150.
- Thestrup T, Litzlbauer J, Bartholomaeus I, Mues M, Russo L, Dana H, Kovalchuk Y, Liang Y, Kalamakis G, Laukat Y, Becker S, Witte G, Geiger A, Allen T, Rome LC, Chen TW, Kim DS, Garaschuk O, Griesinger C & Griesbeck O (2014). Optimized ratiometric calcium sensors for functional in vivo imaging of neurons and T lymphocytes. *Nat Methods* **11**, 175–182.
- West AR & Tseng KY (2011). Nitric Oxide-Soluble Guanylyl Cyclase-Cyclic GMP Signaling in the Striatum: New Targets for the Treatment of Parkinson's Disease? *Front Syst Neurosci* **5**, 55.

- Xie Z, Adamowicz WO, Eldred WD, Jakowski AB, Kleiman RJ, Morton DG, Stephenson DT, Strick CA, Williams RD & Menniti FS (2006). Cellular and subcellular localization of PDE10A, a striatum-enriched phosphodiesterase. *Neuroscience* **139**, 597–607.
- Zhao Z, Zhang K, Liu X, Yan H, Ma X, Zhang S, Zheng J, Wang L & Wei X (2016). Involvement of HCN Channel in Muscarinic Inhibitory Action on Tonic Firing of Dorsolateral Striatal Cholinergic Interneurons. *Front Cell Neurosci* **10**, 71.
- Ztaou S, Maurice N, Camon J, Guiraudie-Capraz G, Kerkerian-Le Goff L, Beurrier C, Liberge M & Amalric M (2016). Involvement of Striatal Cholinergic Interneurons and M1 and M4 Muscarinic Receptors in Motor Symptoms of Parkinson's Disease. *J Neurosci* **36**, 9161–9172.

4.3.5 – Résultats complémentaires

4.3.5.1 – Le donneur de NO active la PKA, indépendamment de la PDE3A

Nous avons souhaité étudier si l'effet du NO sur l'AMPC, dépendant de la PDE3A, se répercute également sur l'activité de la PKA. Pour cela, nous avons utilisé le biosenseur AKAR4 qui rend compte de l'équilibre entre la phosphorylation de la PKA et la déphosphorylation par les phosphatases (PP) (figure 16). De manière inattendue, l'inhibiteur de la PDE3A (cilo, 10 μ M) ne modifie pas le niveau de base de l'activité PKA des ChIN (figure 16C). Toutefois, l'ajout du donneur de NO (DEANO, 10 μ M) augmente l'activité de la PKA (figure 16C). Sur un protocole similaire, l'application en premier du DEANO, qui tout seul n'augmente pas l'AMPC, augmente également l'activité de la PKA (figure 16B). L'ajout du cilostamide ne modifie pas le signal PKA. Ces résultats suggèrent un effet du DEANO sur l'activité de la PKA, indépendamment de la PDE3A.

Ces résultats montrent que l'inhibition de la PDE3A par la NO, responsable d'une augmentation d'AMPC, ne modifie pas l'activité de la PKA et que le NO agit sur l'activité de la PKA indépendamment de la PDE3A. Bien que le cilostamide ait une haute sélectivité pour les PDE3A, ces résultats méritent d'être confirmés avec l'utilisation d'un second inhibiteur spécifique de la PDE3A. Autrement, ce résultat suggère un effet positif de la voie NO/GMPc sur l'activité de la PKA, sans impacter l'AMPC. Le mécanisme est cependant inconnu et d'autres expériences sont nécessaires pour mieux le comprendre. Il est important de noter que dans les expériences réalisées, l'action du NO comme activateur de la PKA a seulement été observée chez les ChIN. Dans les MSNs, le NO n'a pas d'effet significatif sur l'activité basale de la PKA.

Certaines hypothèses peuvent expliquer l'action de la voie NO/GMPc sur la PKA, indépendamment de la PDE3A. D'une part, la forte élévation de GMPc peut, par liaison aux sous-unités régulatrices de la PKA, conduire à son activation, comme cela a été observé sur tissus (Jiang et al., 1992; Lorenz et al., 2015). D'autre part, l'augmentation du GMPc augmente l'activité de la PKG. Il a récemment été démontré *in vitro* que la PKG est capable de phosphoryler la sous-unité régulatrice R1 α sur la Ser¹⁰¹ (Haushalter et al., 2018), augmentant alors l'activité de la PKA. Toutefois, la PKG est peu exprimée dans le striatum (El-Husseini et al., 1999) et, récemment, le séquençage à l'échelle de cellules individuelles n'indique pas d'expression de la PKG dans les ChIN (Saunders et al., 2018).

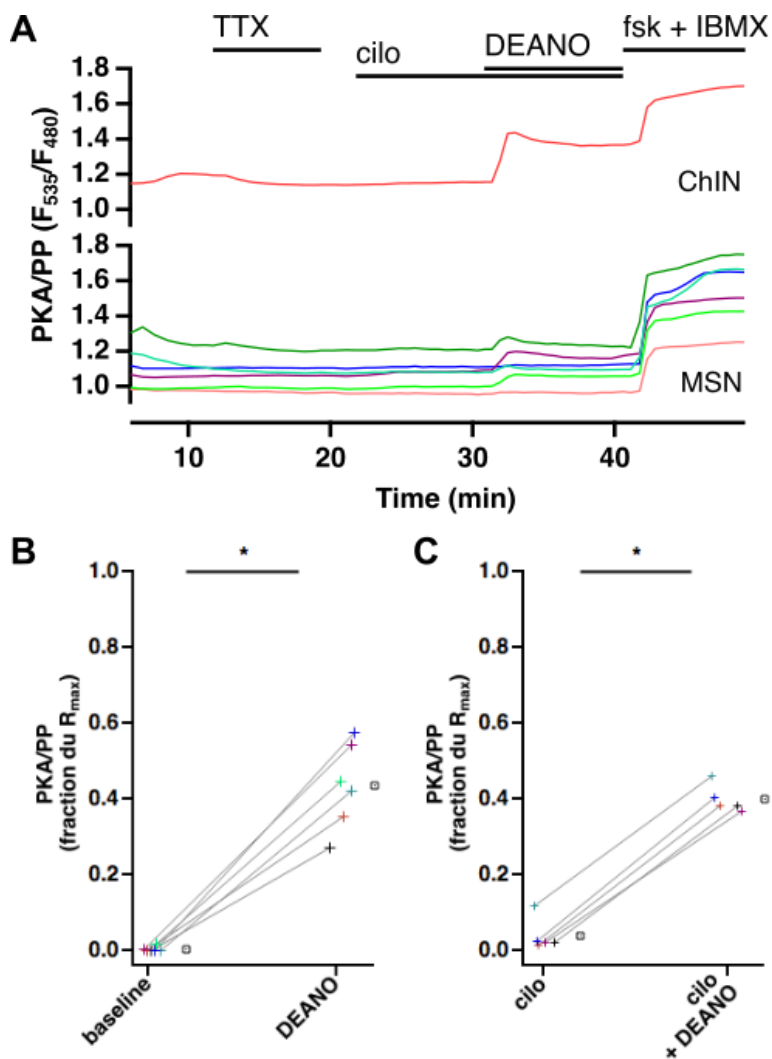


Figure 16 : Le donneur de NO (DEANO) augmente l'activité de la PKA indépendamment de la PDE3A. Imagerie plein champ réalisée sur tranche de cerveau de souris exprimant le biosenseur AKAR4 (A) Représentation du ratio accepteur/donneur (F_{535}/F_{480}) représentatif du niveau de phosphorylation dépendent de la PKA. La trace du dessus correspond au champ d'acquisition d'un ChIN. La trace de dessous correspond aux MSNs. L'application de cilostamide (inhibiteur de PDE3A, 10 μ M) ne modifie pas le ratio tandis que l'application du DEANO (donneur de NO, 10 μ M) augmente le ratio. Le ratio maximal est obtenu par application de la forskoline (fsk) et IBMX (B-C) Distribution de l'amplitude de la réponse normalisée au R_{max} , en présence de DEANO (10 μ M), cilostamide (cilo, 10 μ M) ou cilostamide et DEANO (cilo+DEANO) (B) N=6 (C) N=5. La moyenne de toutes les répétitions est représentée par un carré. * statistiquement différent

4.3.5.2 – Limites de l'étude

Il est important considérer que ces expériences ont été menées *ex vivo* sur tranche de cerveau de souris, c'est-à-dire dans un système encore immature. L'expression des protéines impliquées dans la voie AMPc/PKA et la connectivité du striatum peut différer entre un système mature et immature, suggérant une signalisation différente entre ces deux stades de vie.

L'étude du rôle fonctionnel des PDE a été conduite lors d'une stimulation de l'ensemble des AC par la forskoline, non représentative d'une stimulation physiologique par les récepteurs. Cela consiste en une première étape permettant de mieux comprendre la physiologie des ChIN. Toutefois, ce schéma d'activation ne prend pas en compte la compartimentation possible de la production d'AMPc proches des récepteurs. Les ChIN intègrent des informations via de nombreux RCPG (parmi les principaux : récepteurs à l'adénosine, l'histamine, la sérotonine, la dopamine et récepteurs métabotropiques au glutamate). Il serait désormais intéressant d'étudier spécifiquement la contribution des PDE et le rôle du GMPc comme inhibiteur de la PDE3A dans l'intégration des signaux intracellulaires suite à l'activation de récepteurs spécifiques.

4.4 – Stimulation of PDE2A activity moderates cAMP/PKA response to D₁ receptor stimulation in dyskinetic mice

4.4.1 – Contexte de l'étude

Dans la maladie de Parkinson, face à la perte progressive des afférences dopaminergiques, les MSNs D1 deviennent hypersensibles à la dopamine pour en compenser la diminution. Cette hypersensibilité se traduit par des adaptations de la voie AMPc/PKA : une augmentation de la protéine G_{olf} conduit à un couplage exacerbée entre le récepteur D₁ et la protéine G (Alcacer et al., 2012; Corvol, 2004). Cette hypersensibilité des MSNs D1 couplée à la prise répétée de L-DOPA, le traitement de référence, conduit à une activation exacerbée de la voie AMPc/PKA dans les MSNs D1 et se traduit par le développement des LID.

Les PDE régulent négativement la voie AMPc/PKA. Chaque PDE exprimée par les MSNs a une affinité spécifique pour l'AMPc. Parmi elles, la PDE2A présente une des plus faibles affinités pour l'AMPc, suggérant principalement une dégradation des niveaux élevés d'AMPc. Son inhibition augmente seulement l'amplitude de la réponse à la dopamine transitoire, mais cela n'affecte pas les niveaux de base ni ne supprime le contraste temporel de la réponse à la dopamine (É. Mota et al., 2021). L'activité de la PDE2A peut être stimulée par fixation du GMPc sur son domaine régulateur. Cette liaison augmente l'accessibilité du site catalytique, en faveur de la dégradation de l'AMPc. Il a d'ailleurs été publié auparavant par l'équipe, que l'utilisation d'un donneur de NO conduit à une diminution de l'activité de la PKA lors d'une réponse à la dopamine transitoire, cet effet étant neutralisé par l'inhibition de la PDE2A (Polito et al., 2013). Lors d'une réponse transitoire à la dopamine, la stimulation de l'activité de la PDE2A par la voie NO/GMPc semble donc réduire les niveaux d'AMPc suffisamment pour réduire l'activité de la PKA.

Nous souhaitons donc tester dans un modèle de souris dyskinétiques si la stimulation de la PDE2A est capable de réduire les niveaux excessifs d'AMPc et de la PKA responsables des LID. Cette hypothèse est notamment soutenue par deux études montrant un effet anti-dyskinétique d'un donneur de NO (Lorenc-Koci and Czarnecka, 2013; Solís et al., 2015).

L'imagerie de biosenseurs FRET génétiquement codés, sur tranche de cerveau de souris dyskinétiques, nous permet de suivre en temps réel, et dans des neurones vivants, la dynamique de la voie AMPc/PKA en réponse à la dopamine. Ainsi, nous avons testé si la stimulation de la PDE2A par un donneur de NO réduit l'amplitude de la réponse AMPc/PKA dans un modèle de souris dyskinétique.

4.4.2 – Principaux résultats

Nos résultats montrent que, dans un modèle de souris dyskinétique, la stimulation de l'activité de la PDE2A diminue la réponse excessive à la dopamine, aussi bien au niveau de l'AMPC que de l'activité PKA.

Notre étude a confirmé par imagerie de biosenseur, l'hypersensibilité des MSNs D1 à la dopamine dans le modèle murin de la maladie de Parkinson. Effectivement, la libération transitoire de dopamine conduit à une activation exacerbée de la voie AMPC/PKA, en comparaison aux souris contrôles.

Nous avons ensuite montré que la stimulation de l'activité de la PDE2A par un donneur de NO permet de réduire les niveaux d'AMPC excessifs dans un modèle parkinsonien et dyskinétique. Plus particulièrement, dans le modèle dyskinétique, cette réduction des niveaux d'AMPC est suffisante pour réduire l'activité de la PKA lors d'une stimulation continue des récepteurs à la dopamine.

4.4.3 – Conclusions

Notre étude met en évidence la PDE2A comme potentielle nouvelle cible thérapeutique pour prévenir voire ralentir le développement des dyskinésies. La stimulation de la PDE2A par un donneur de NO réduit l'amplitude des réponses hypersensibles à la dopamine dans les MSNs D1, sans modifier la temporalité de la réponse.

4.4.4 – Articles

Stimulation of PDE2A moderates cAMP/PKA response to D1 receptor stimulation in dyskinetic mice

Authors

Sékolène Bompierre (first author) (1)
Cédric Yapo (1)
Régis Blaise (1)
Pierre Vincent (2)
Liliana R.V. Castro (1)

Affiliations

(1) Sorbonne Université, CNRS, Biological Adaptation and Ageing, F-75005 Paris, France
(2) IGF, Univ. Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France

Abstract

Dopamine depletion in Parkinson's disease (PD) is associated with severe motor and cognitive disturbances. L-DOPA replacement therapy efficiently counteracts the motor symptoms, but results in long-term complications, including dyskinesia. This invalidating symptom is associated with signaling dysregulations and altered striatal plasticity. Here, we used 6-hydroxydopamine (6-OHDA) hemi-lesion and L-DOPA treatment in adult mice combined with imaging of genetically encoded biosensors to monitor cAMP and PKA signals in adult brain slices. Our results show that both cAMP and PKA responses to dopamine are up-regulated in hemiparkinsonian and in dyskinetic mice. Stimulation of the cGMP signaling by a NO donor, DEANO, efficiently down-regulates the amplitude of these hypersensitive responses and this effect is mediated by PDE2A. Indeed, activation of PDE2A by cGMP effectively reduces the amplitude of the excessive cAMP/PKA signaling triggered by D1R stimulation, and this, despite unaltered PDE2A expression. These results suggest that boosting PDE2A activity in the striatum would be of therapeutic value to moderate the excessive cAMP/PKA responses and the long-term changes in striatal neurons, which are related to the adverse effects of L-DOPA treatment.

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disorder that results in severe motor and cognitive disturbances. The motor symptoms are mainly caused by the loss of dopamine neurons of the substantia nigra, and dopamine depletion in the striatum. The dopamine replacement therapy with the precursor levodopa (L-DOPA), efficiently counteracts the motor symptoms. However, following years of treatment, levodopa loses its efficacy and patients develop involuntary movements referred to as levodopa-induced dyskinesias (LID). These motor complications represent a serious limitation to the L-Dopa therapy, particularly in advanced stages of the disease.

In the dorsal striatum, dopamine regulates the activity of GABAergic medium-sized neurons (MSNs), which are segregated in two classes: the D1 MSNs of the anatomical 'striatonigral pathway', expressing preferentially the dopamine D1 receptors (D1R), and the D2 MSN of the 'striatopallidal pathway', which express preferentially the dopamine D2 receptors (D2R). In physiological conditions, dopamine thus promotes movement both by activating the cAMP/PKA signaling pathway in D1 MSNs and by inhibiting the D2R/cAMP/PKA signaling pathway in D2 MSNs (Beaulieu & Gainetdinov, 2011; Valjent *et al.*, 2009; Bertran-Gonzalez *et al.*, 2010).

In the dopamine depleted striatum, D1 type MSNs develop hypersensitive responses to D1 receptor stimulation which results in the gradual development of LID during L-Dopa treatment (Murer & Moratalla, 2011; Santini *et al.*, 2008; Lebel *et al.*, 2010; Alcacer *et al.*, 2012). The global knock-out of D1 receptor or its chemogenetic activation of D1 inhibits or worsens, respectively, the expression of LID in mice model of the disease (Darmopil *et al.*, 2009; Alcacer *et al.*, 2017).

At the cellular level, the hypersensitive response to D1 receptor stimulation in dopamine-depleted striatum is associated with increased cAMP and PKA response to D1 receptor stimulation (Jones-Tabah *et al.*, 2021; Jones-Tabah *et al.*, 2020; Mariani *et al.*, 2019). Increased G_{off} expression found in animal models and PD patients (Corvol *et al.*, 2004) or increased adenylyl cyclase (Tong *et al.*, 2004) lead to the excessive activation of the AMPc/PKA signaling as well as the activation of its downstream effectors (DARPP-32, GluR1, ERK, $\Delta\text{Fos-B}$) (Bateup *et al.*, 2010; Alcacer *et al.*, 2012; Aubert *et al.*, 2005; Santini *et al.*, 2007; Andersson *et al.*, 1999; Santini *et al.*, 2008; Pavón *et al.*, 2006). Interestingly, hyperactivation of D1 MSNs during L-dopa likely occurs in approximately half of D1 neurons in the dorsolateral striatum but are sufficient to cause LID (Girasole *et al.*, 2018; Ryan *et al.*, 2018).

The proper integration of dopamine signals in MSNs of the striatum depends on the precise regulation of cAMP levels by cyclic-nucleotide phosphodiesterases (PDE). Robust mRNA expression of PDE1B, PDE2A, PDE7 and PDE10A were observed in the striatum (Lakics *et al.*, 2010; Kelly *et al.*, 2014). Striatal PDE differ in their affinity for cAMP, and each PDE regulate the cAMP in a limited concentration range (Neves-Zaph, 2017; Mota *et al.*, 2021a): PDE2A has particularly low affinity for cAMP ($K_m \approx 100 \mu\text{M}$) and preferentially degrades high cAMP level, (Poppe *et al.*, 2008; Mota *et al.*, 2021a) whereas PDE10A ($K_m < 1 \mu\text{M}$) is required for degrading basal cAMP and allow to maintain the PKA substrates in the dephosphorylation state (Polito *et al.*, 2015; Mota *et al.*, 2021a). Contrary to PDE10A, modulation of PDE2A activity likely provides a

more subtle control of the amplitude of the cAMP/PKA responses to D1R stimulation (Polito *et al.*, 2015; Mota *et al.*, 2021a).

High levels of PDE2A protein have been reported in the striatum (human and murine) (Stephenson *et al.*, 2009; Stephenson *et al.*, 2012) (Reyes-Irisarri *et al.*, 2007), along with PDE10A and PDE1B (Lakics *et al.*, 2010; Kelly *et al.*, 2014). PDE2A degrades both cAMP and cGMP and is activated by cGMP binding to its GAF domains, greatly increasing its activity (Martins *et al.*, 1982; Martinez *et al.*, 2002; Jäger *et al.*, 2010). In physiological conditions, PDE2A is activated by nitric oxide (NO)/cGMP signaling pathway. In the striatum Persistent Low-Threshold Spiking (PLTS) interneurons (Tepper *et al.*, 2010) release NO in response to the coincidence of dopamine and glutamate (Park & West, 2009). NO diffuses and activates guanylyl cyclase in MSNs, which produces cGMP and ultimately activates protein kinase G and PDE2A. NO also diffuses into the dendrites of MSNs where it modulates corticostriatal synaptic plasticity (Padovan-Neto *et al.*, 2011; Padovan-Neto & West, 2017; Del-Bel *et al.*, 2014; Rafalovich *et al.*, 2015). While these effects are clearly mediated by cGMP, the downstream effectors of cGMP, often assumed to be the cGMP-dependent protein kinase (PKG), remain uncertain, since only moderate levels of PKG protein have been reported in the striatum (el-Husseini *et al.*, 1995; El-Husseini *et al.*, 1999; de Vente *et al.*, 2001).

Previous studies have shown that the NO donor, molsidomine, reduced dyskinetic manifestations in a mouse model (Solís *et al.*, 2015; Lorenc-Koci *et al.*, 2013) and we hypothesize that NO effect is mediated by PDE2A activation, which down-regulate the hypersensitive cAMP/PKA signaling associated with LID. Mutations that largely reduce or suppress PDE2A activity are associated with hyperkinetic movement disorders (Salpietro *et al.*, 2018; Doummar *et al.*, 2020)

Our experiments, in morphologically intact neurons clearly show that the NO/cGMP signaling, efficiently down-regulates the amplitude of the hypersensitive cAMP and PKA response to D1 receptors stimulation in dyskinetic mouse model of PD. This effect was abolished by PDE2A inhibition, indicating that boosting PDE2A activity in the striatum would be of therapeutic value to moderate the excessive cAMP responses associated with LID or in other pathological conditions associated with excessive dopamine tonus.

METHODS

Animals

The study was performed in C57BL/6J mice purchased from Janvier labs and Envigo. The mouse litters (male and female pups, Janvier labs) were housed in open cages under standardized conditions and adult mice (aged from 5 to 12 weeks old) were housed in ventilated cages. All mice were housed in conditions with a 12-hr light/dark cycle, stable temperature (22°C +/- 1°C), controlled humidity (55 +/- 10%), with food and water ad libitum. Animal care was performed in accordance with the Sorbonne University animal care committee regulations that complies with the commonly accepted “3Rs”.

Lesion of dopaminergic neurons and post-operative care

Mice were anesthetized using 4% isoflurane in air and placed in a stereotaxic frame on a heating pad. The anesthesia was maintained with 1 to 2% of isoflurane. 6-OHDA hydrochloride was dissolved in saline solution (4 µg/kg) with 0.02 % ascorbic acid and kept at 4°C in the dark. The 6-OHDA solution was injected into the medial forebrain bundle (mfb) at the following coordinates (in mm relative to bregma) : AP = -1.2, ML = -1.3, DV = -4.75 (Franklin & Paxinos, 2007). Control mice were prepared in the same conditions except that the injected solution contained no 6-OHDA.

Before the start of surgery, mice received desipramine (25 µg/kg) by subcutaneous injection to protect noradrenergic neurons from the 6-OHDA. Buprenorphine (Buprecare, 0.1 mg/kg) was injected intraperitoneally in the morning and at the end of the surgery day.

During days following 6-OHDA surgery, mice were kept on a heating pad. Three times per day, they received sterile 4% glucose-saline solution and were fed by hand with sweetened milk. In addition, they had unlimited access to jelly food (ClearH2O, Dietgel Boost and Recovery) until complete recovery and weight regain.

L-DOPA treatment

L-DOPA methyl ester and benserazide-hydrochloride (12 mg/kg) to inhibit peripheral DOPA decarboxylase were dissolved in saline solution. Two to three weeks after 6-OHDA surgery, mice were daily injected with this solution intra-peritoneally, with 3 mg/kg during the first week and then 6 mg/kg.

Quantification of AIMS during L-DOPA treatment

Quantitative evaluation of abnormal involuntary movements (AIMs) were performed during the second week of L-DOPA treatment. Each mouse was placed in a transparent cage during 180 min and was observed individually for 1 min every 20 min, starting 20 min after L-DOPA or saline treatment. Three AIMs were evaluated: orolingual AIMs (abnormal jaw movement and contralateral tongue protrusion), axial AIMs (twist of the head and upper body toward the contralateral side to the lesion) and limbic AIMs (abnormal movement of the contralateral forelimb, corresponding to shaking and grabbing movements). Each type of AIM was score from 0 to 4 with the following criteria : 0 = absent, 1=present during less than half of the observation time, 2=present during more

than half of the observation time, 3=present the full time but interrupt by a visual cue, 4= present the full time and uninterrupted by visual cue.

Biosensor imaging in adult and pup mouse brain slices

The day before biosensor imaging, adult mice underwent a second stereotaxic surgery to inject Sindbis virus for biosensor expression. Mice were anesthetized using 4% of isoflurane in air and placed in a stereotaxic frame on a heating pad. The anesthesia was maintained using 1 to 2% of isoflurane. Sindbis virus-containing solution was injected twice into the dorsal striatum at the following coordinates (in mm relative to bregma) : AP = +1.3 , ML = -1.9, DV = -2.8 and AP = +0.3 , ML = -2.0 , DV = -2.8 (Franklin & Paxinos, 2007). Buprenorphine (Buprecare, 0.1 mg/kg) was injected intraperitoneally before the start of the surgery day.

The day after, mice were anesthetized using 5% of isoflurane, decapitated and the brain quickly removed and immersed in ice-cold solution of the following composition : 130 mM K-gluconate, 20 mM HEPES, 25 mM glucose, 14 mM KCl, 2 mM EGTA, 1 mM CaCl₂, 6 mM MgCl₂, 0.05 μM D-APV, 0.5 μM minocycline at pH 7.4. Coronal striatal brain slices were cut with a VT1200S microtome (Leica) (250 μm). The slices were incubated for 20 min in a ice-cold solution : 225 mM D-mannitol, 25 mM glucose, 25 mM NaHCO₃, 2.3 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 1 mM CaCl₂, 6 mM MgCl₂, 0.05 μM D-APV, 0.5 μM minocycline, saturated with 5% CO₂ and 95% O₂. The slices were then incubated at 32°C in the recording solution (125 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1.25 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 20 mM glucose, 2.5 mM KCl and 5 mM sodium pyruvate saturated with 5% CO₂ and 95% O₂).

Pup mice were decapitated and the brain quickly removed and immersed in ice-cold solution of the following composition: 125 mM NaCl, 0.4 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1.25 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 20 mM glucose, 2.5 mM KCl, 5 mM sodium pyruvate and 1 mM kynurenic acid, saturated with 5% CO₂ and 95% O₂. Coronal striatal brain slices were cut with a VT1200S microtome (Leica) (300 μm). The slices were incubated in this solution for 30 minutes and then placed on a Millicell-CM membrane (Millipore) in culture medium (50% Minimum Essential Medium, 50% Hanks' Balanced Salt Solution, 5.5 g/L glucose, penicillin-streptomycin, Invitrogen). The cAMP biosensor Epac-SH150 (Polito *et al.*, 2013) or AKAR4 biosensor (Depry *et al.*, 2011) were expressed using the Sindbis virus as vector (Ehrengruber *et al.*, 1999): the viral vector was added on the brain slices (~5 x 10⁵ particles per slice), and the infected slices were incubated overnight at 35°C under an atmosphere containing 5% CO₂. Before the experiment, slices were incubated for 30 min in the recording solution (125 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1.25 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 20 mM glucose, 2.5 mM KCl and 5 mM sodium pyruvate saturated with 5% CO₂ and 95% O₂). Recordings were performed with a continuous perfusion of the same solution at 32°C.

Solutions were prepared from powders purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, Isère, France). Tetrodotoxin was from Latoxan (Valence, France). Other drugs were from Tocris Bio-Techne (Lille, France).

Imaging was performed in the dorso-medial part of the striatum. Wide-field images were obtained with an Olympus BX50WI or BX51WI upright microscope with a 40x 0.8 numerical aperture water-immersion objective and an ORCA-AG camera (Hamamatsu). Images were acquired with iVision (Biovision, Exton, PA, USA). The excitation and dichroic filters were D436/20 and 455dcxt. Signals were acquired by alternating the emission filters, HQ480/40 for donor emission, and D535/40 for acceptor emission, with a filter wheel (Sutter Instruments, Novato, CA, USA). Filters were obtained from Chroma Technology and Semrock. The LED light source (420 nm with a 436 nm excitation filter) for donor excitation was purchased from Mightex (Toronto, Canada). The frequency of data acquisition was usually 1 image pair every 30 to 60 seconds.

Wide-field imaging allowed for the separation of ChINs from MSNs, provided that the infection level was kept low and no fluorescence overlap between neighboring neurons was observed. In a few cases, cells were excluded when basal ratio was elevated, when the response to maximal stimulation was lacking or when the neuronal morphology was altered (uneven cell contours).

An application of TTX (200 nM) for 5 min preceded drug applications to stop any ongoing spontaneous activity.

Immunohistochemistry

Slices used for biosensor imaging were placed for 2h in 4% paraformaldehyde (PFA) solution in phosphate buffer saline (PBS) for tissue fixation. After washing, brain slices were kept in a frozen-adapted solution (30% ethylene glycol and 30% glycerol in PBS). For the immunostaining, slices were incubated for 2h in blocking solution (1% BSA, 0.2% Triton X100, 2% goat serum), followed by an overnight incubation, at 4°C, under agitation, with primary antibodies (rabbit anti-tyrosine hydroxylase, ab152, Abcam, diluted 1/1000 in blocking solution). The day after, brain slices were washed and incubated with secondary antibodies for 2h, room temperature, under agitation. After washing, brain slices are observed under epifluorescent microscope (4x magnification).

Western-blot analysis

Half striatums were resuspended in 200µl of Neuronal Protein Extraction Reagent (N-PER, Thermofischer Scientific) plus Complete Protease Inhibitor mixture (Roche Diagnostics) and sonicated (5 cycles of 10 sec ON and 10 sec OFF). The lysates were centrifuged at 13 000 g for 10 min at 4°C, and the supernatant was collected. Striatum lysates (30µg of protein) were analyzed by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis on 4–12% gradient gels (in MOPS running buffer, Invitrogen NuPAGE system) followed by transfer to nitrocellulose membranes. After blocking 1 h at room temperature in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TBS-T) (20 mM Tris–HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20) and 5% fat-free milk, membranes were incubated in the same buffer overnight at 4°C with primary antibodies (PDE2A, PD2A-101AP, Fabgennix, 1/1000 ; Tyrosine Hydroxylase, ab152, Merck, 1/2000 ; beta-actin, A5441, 1/4000). Membranes were washed three times in TBS-T, and incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies for 1 h at room temperature. After TBS-T washes, signals were measured with a ChemiDoc Imaging System (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). Equal protein loading and transfer efficiency were determined by Ponceau Red staining after electrotransfer and

Beta-actin detection. The density patterns were analyzed with ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) and normalized to the density of b-actin.

Image analysis

Images were analyzed with custom routines, Ratioscope (Mota *et al.*, 2021b), written in the IGOR Pro environment (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA) as described previously (Polito *et al.*, 2014). No correction for bleed-through or direct excitation of the acceptor was applied. Biosensor activation level was quantified by ratiometric imaging: donor fluorescence divided by acceptor fluorescence for Epac-SH150, and acceptor divided by donor for AKAR4. The emission ratio was calculated for each pixel and displayed in pseudo-colour images, with the ratio value coded in hue and the fluorescence of the preparation coded in intensity.

Statistical tests were performed using the same Ratioscope package. Brain slices were considered as independent. One experiment is defined as one brain slice being used in a protocol such as that illustrated in Figure 1. Only a single experiment was performed on each brain slice. Responses obtained from all neurons of the same type in one experiment were averaged together. Statistics were calculated per experiment (N); (n) indicates the total number of neurons per condition; (A) indicates the number of animals used for preparing all the brain slices used per condition. No outlier was excluded in this study. The alpha level for statistical significance was fixed at 0.05, indicated by * in figures and tables. n.s. indicates that the test was not significant. For some conditions, the Shapiro-Wilk test rejected the hypothesis of normal data distribution and therefore non-parametric statistics were used throughout this study. The Wilcoxon signed rank test was used for paired data. The Wilcoxon-Mann-Whitney test was used to test whether the treatment increased the ratio value for unpaired data. Kruskal-Wallis followed by Dunn tests were used for more than 2 conditions.

UV uncaging

Photo-release of dopamine from “caged” precursor NPEC-DA was performed using high power 360 nm light-emitting diodes mounted on the epifluorescence port of the microscope, for 0.5 s duration with 14 mW power at the exit of the microscope objective. The combination of light-emitting diodes at 360 nm (for uncaging) was purchased from Mightex (Toronto, Canada). The frequency of data acquisition was increased to 0.2 Hz in order to resolve peak dynamics, starting 5 to 10 data points before dopamine uncaging.

Estimates of cAMP concentration

Ratiometric imaging can be used to determine absolute analyte concentrations, with ratio values following a Hill equation from R_{min} , the ratio in the absence of ligand, to R_{max} , the ratio in the presence of saturating ligand (Grynkiewicz *et al.*, 1985). For Epac-SH150, ratio values were translated into corresponding cAMP concentration estimates using a Hill equation with a K_d of 10 μ M and a Hill coefficient of 0.77 (Polito *et al.*, 2013; Klarenbeek *et al.*, 2015). R_{max} was determined for each neuron by the final application of 13 μ M forskolin and 200 μ M IBMX. The basal ratio in pup striatal slices has been estimated by inhibiting adenylyl cyclases with 200 μ M

SQ22536, which decreased the ratio by 0.037 ratio units to reach the minimal ratio, R_{min} (Mota *et al.*, 2021a). This basal ratio value of 0.037 was subtracted from baseline ratio when estimating cAMP concentration

RESULTS

Nitric oxide (NO) down-regulates cAMP and PKA response to brief D1R stimulation

Our previous work showed that striatal PDEs regulate cAMP/PKA signaling in response to transient dopamine in MSNs (Polito *et al.*, 2013; Mota *et al.*, 2021a). We observed that PDE10A is necessary to reduce the cAMP/PKA signal down to the baseline whereas PDE2A and PDE4B preferentially operate on moderate to high cAMP levels. Previous studies clearly show that PDE2A activity can be enhanced by the NO/cGMP signaling pathway (Polito *et al.*, 2013). Here we aim at further understanding the functional role of PDE2A when its activity is increased by cGMP.

First, we monitored cAMP and PKA responses to dopamine in the striatum of young mice (7 to 12 days old) with FRET biosensors. We tested the effect of NO/cGMP signaling on cAMP level increase after D1 receptor stimulation in the striatum. The cAMP biosensor Epac-SH150 was expressed by viral transfection in mouse striatal brain slices from young mice (7 to 12 days old). We imaged in real time, with a wide-field microscope, the intracellular cAMP variations in individual D1 MSNs following a transient dopaminergic stimulation (Figure 1 A-B). This stimulation was performed by a caged-derivative of dopamine, NPEC-DA (1 μ M), which has no effect by itself on the cAMP level. After the diffusion of the compound into the brain slice, a flash of UV light was applied and dopamine was immediately released in the striatum. This dopamine release transiently increased cAMP levels in D1 MSNs in the field of view (Figure 1A, B, D). These transient responses to dopamine have already been described: they are dose-dependent and could be reproduced several times with 20 min recovery time in between, with no significant changes in amplitude or kinetics (Betolngar *et al.*, 2019; Yapo *et al.*, 2017). Thus, we perform a second release of dopamine in the presence of a NO donor (DEANO, 10 μ M) to stimulate the cGMP pathway. DEANO alone did not change the basal ratio of the biosensor in D1 MSNs but it significantly decreased the amplitude of the already small cAMP response triggered by 1 μ M dopamine. At the end of the protocol, the selective D1-like agonist SKF-81297 (SKF, 100 nM) was applied in the bath to confirm the identity of D1 MSNs. Then, the maximal ratio response (R_{max}) of the biosensor was reached by stimulating cAMP production using adenylyl cyclase agonist (forskolin, fsk, 13 μ M) together with a non-specific PDEs inhibitor (IBMX, 200 nM). This maximal response was used for normalization. The same experiment was performed 6 times, each response was normalized to the maximal response and the average response for each condition is displayed in Figure 1D. The amplitude of the dopamine response is decreased by the DEANO treatment: in control conditions, the amplitude of the dopamine response reached 0.19 of the maximal response, whereas in the presence of DEANO the amplitude was 0.14, statistically different (Test Wilconxon ; $p < 0,05$).

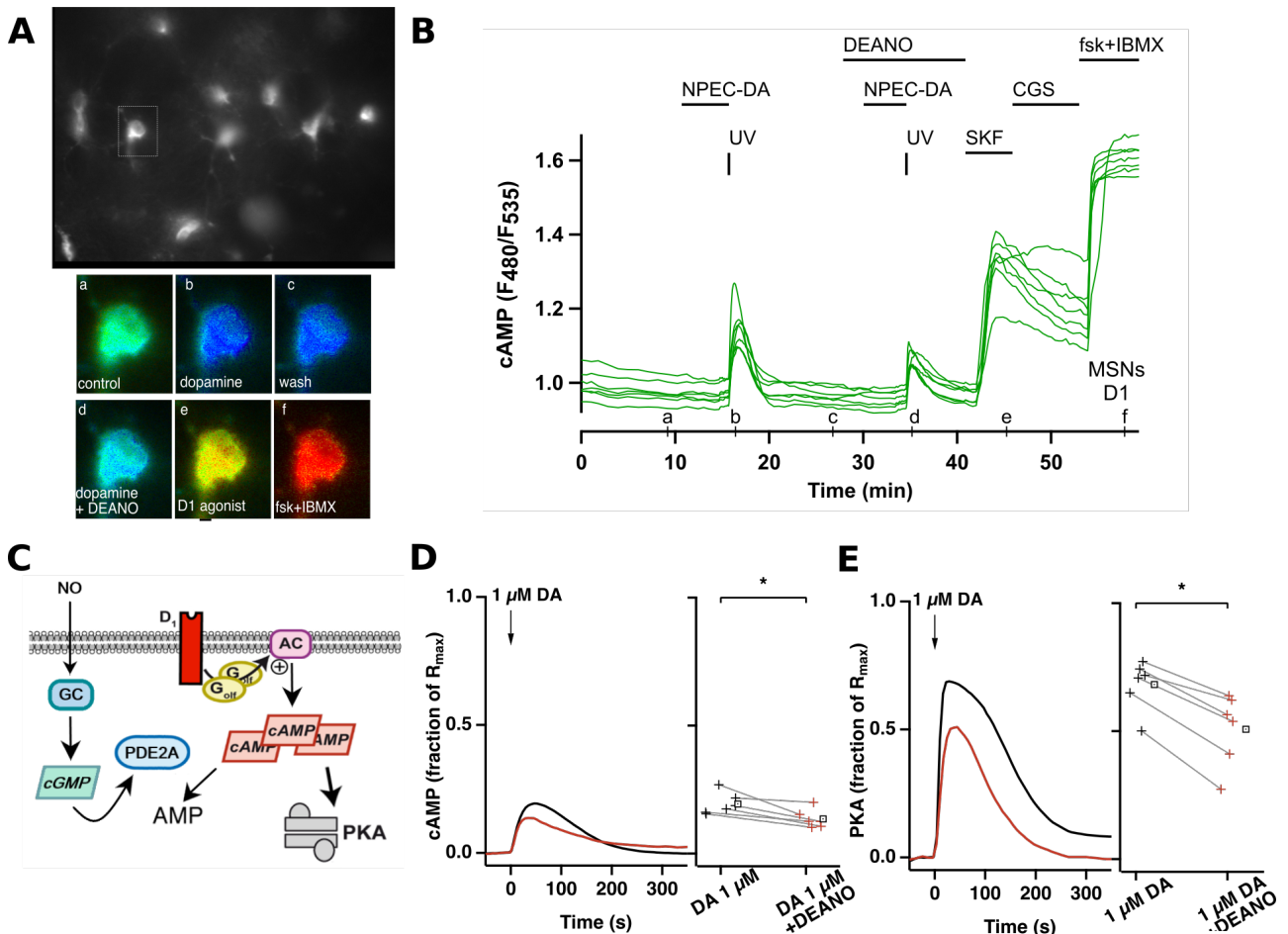


Figure 1: NO donor reduces the cAMP/PKA response to transient dopamine in D1 MSNs. The Epac-SH150 biosensor was expressed in striatal brain slices from pup mice and imaged with wide-field microscopy. (A) top: field of view showing the fluorescence at 535 nm (F535). The region of interest on individual neurons defines the area used to measure the ratio (F480/F535). below: pseudo-color images (a-f) of the region indicated by the rectangle in the field of view and corresponding to the time points on the graph B. (B) The graph represents the variations in the emission ratio reporting intracellular cAMP concentration in D1 MSNs. Each trace on the graph indicates the emission ratio measured on the cell body of individual neurons. Horizontal bars represent the application time of the different drugs. Dopamine (1 μM) is released from NPEC-DA by a flash of UV light which increases cAMP levels in D1 MSNs. After recovery, this protocol was executed again in the presence of DEANO, which produced a smaller increase in cAMP. SKF-81297 (100 nM) increased cAMP level specifically in D1 MSNs, confirming their identity. Forskolin (fsk, 13 μM) and IBMX (200 μM) maximally increased cAMP levels. (C) Schematic representation of cAMP/PKA and NO/GMPc signalings in D1 MSNs. (D) Average traces and amplitude measurements: the graph on the left shows the average ratio of the first and the second peak of dopamine (normalized to the fsk and IBMX response) from 6 individual experiments: black line corresponds to the control dopamine response (1 μM DA) and the red line corresponds to the dopamine response in the presence of DEANO. Right: plot displays the peak amplitude of dopamine responses in D1 MSNs for dopamine control response (1 μM DA) and dopamine response in the presence of DEANO (1 μM DA + DEANO) (N=6). (E) Same as D except that the AKAR4 biosensor was used to report PKA-dependent phosphorylation (N=6). The average of the different repeats is represented with a square symbol. * indicates a statistically significant difference

Then we used the PKA biosensor, AKAR4 (Depry *et al.*, 2011), to evaluate the efficacy of DEANO down-regulating the response to dopamine at the PKA level. The ratio variations represent the equilibrium between the phosphorylation by PKA and dephosphorylation by phosphatase (here Activating PDE2A in LID

described as PKA activity). The transient release of dopamine in the brain slice triggered a transient increase in PKA activity in D1 MSNs. As previously shown, the amplitude at the PKA level is larger than at the level of cAMP, as expected from PKA responding to low cAMP concentrations. The activation of the NO/cGMP signaling pathway by the NO donor (DEANO, 10 μ M) significantly decreased the amplitude of this response, without suppressing it (Figure 1E, NPEC-DA 1 μ M : 0.68 of the Rmax and NPEC-DA 1 μ M + DEANO 10 μ M : 0.51 of Rmax, N = 6).

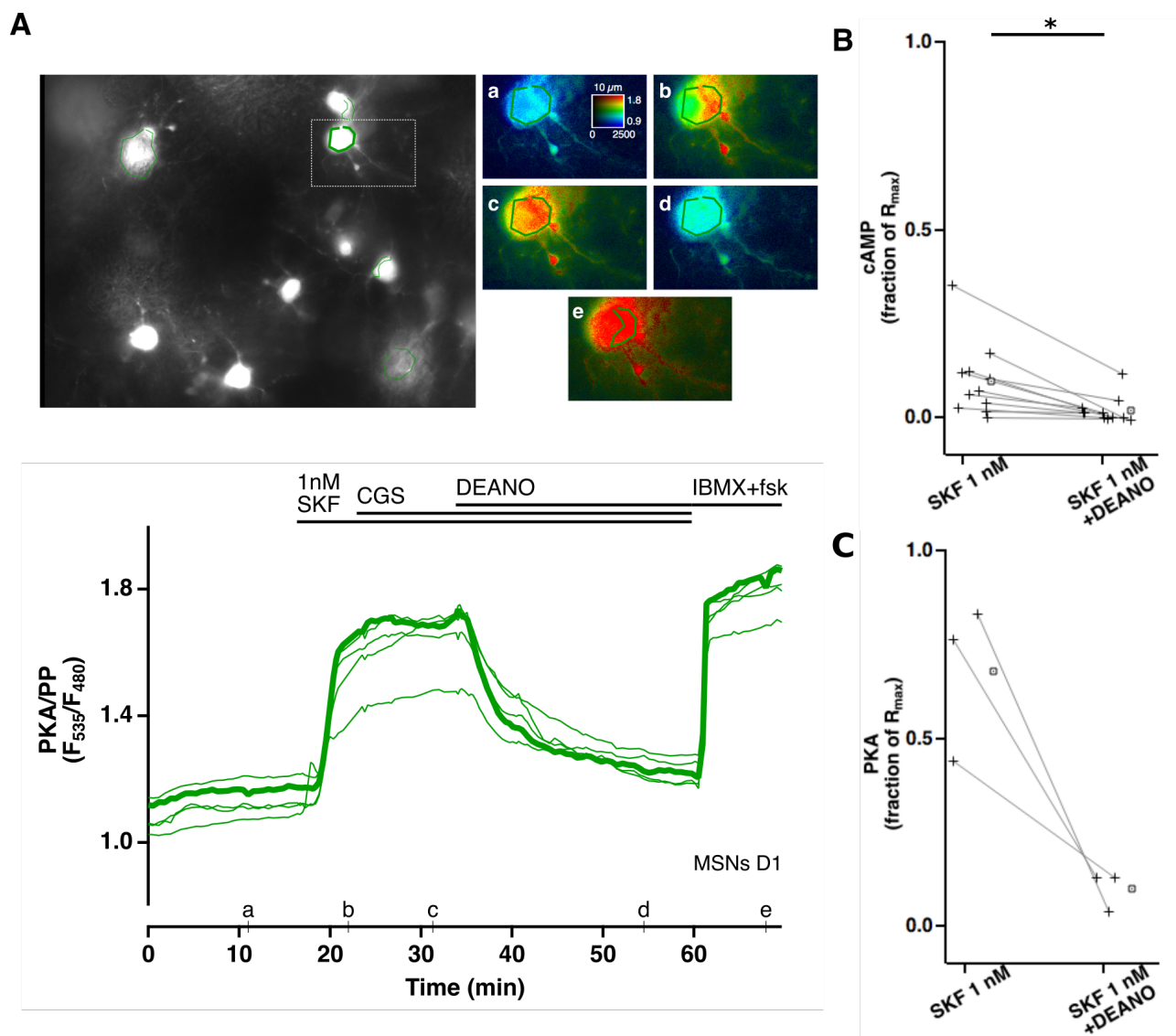


Figure 2: NO donor decreases sustained cAMP/PKA signal induced by continuous stimulation of D1 receptors. The AKAR4 biosensor was expressed in striatal brain slices from pup mice and imaged with wide-field microscopy. (A) top left: field of view showing the fluorescence at 535 nM (F535). The regions of interest on individual neurons define the area used to measure the ratio (F535/F480). Pseudo-color images (a-e) of the region indicated by the rectangle in the field of view and corresponding to the time points on the graph below. Below: each trace on the graph indicates the emission ratio corresponding to the PKA-dependent phosphorylation level and measured on the cell body of individual neurons, identified as D1 MSNs. Horizontal bars represent the application time of the different drugs. SKF-81297 (1 nM) increased the ratio in D1 MSNs and DEANO (10 μ M) reduced this response. Forskolin (fsk, 13 μ M) and IBMX (200 μ M) maximally increased cAMP levels. (B-C) Plots display the average of the response to SKF-81297 (SKF 1 nM) alone or in presence of DEANO (SKF 1 nM + DEANO) obtained with Epac-SH150 biosensor (N=11, B) or

*AKAR4 biosensor (N=3, C) . The average of the different repeats is represented with a square symbol. * indicates a statistically significant difference. The number of repetitions will be increased during the next few weeks to allow statistical analysis.*

We then evaluated the efficiency of the NO/cGMP signaling down-regulating the cAMP/PKA response triggered by long-lasting and weak D1 receptor stimulation. Continuous bath application of submaximal doses of the selective D1 receptor agonist, SKF (1 nM) alone or in the presence of DEANO had very little effect on basal cAMP (SKF 1 nM: 0.10 of Rmax versus SKF+DEANO 10 μ M: 0.02 of Rmax, N = 11). However, with the more sensitive AKAR4 biosensor, we observed a large and long-lasting, yet submaximal, increase in PKA activity. Application of DEANO on top of this response decreased the PKA signal (SKF 1 nM: 0.68 of Rmax versus SKF with DEANO 10 μ M: 0.10 of Rmax, N = 3)

Altogether these results clearly show that the PDE2A activation by the NO/cGMP signaling efficiently moderates the cAMP/PKA response to D1 receptor activation.

Increased cAMP and PKA responses to D1 receptor stimulation in parkinsonian mice

We next adapted our protocol to record the cAMP/PKA responses in the 6-OHDA mouse model of Parkinson's disease. Saline (for sham mice) or 6-OHDA (for hemi-parkinsonian mice) solution was injected in adult mice unilaterally, either into the medial forebrain bundle (mfb) or in the dorsal striatum by stereotactic surgery (Francardo *et al.*, 2011). Two to three weeks later, the sindbis virus coding for Epac-SH150 or AKAR4 was injected *in vivo* at two sites in the dorsal striatum (see methods) and biosensor monitoring in brain slices was performed in brain slices the next day (Figure 3A). The 6-OHDA lesion in hemi-parkinsonian mice was confirmed for every animal by a loss of tyrosine hydroxylase (TH) immunoreactivity in the dorsal striatum as seen by immunohistochemistry and western blot (see below).

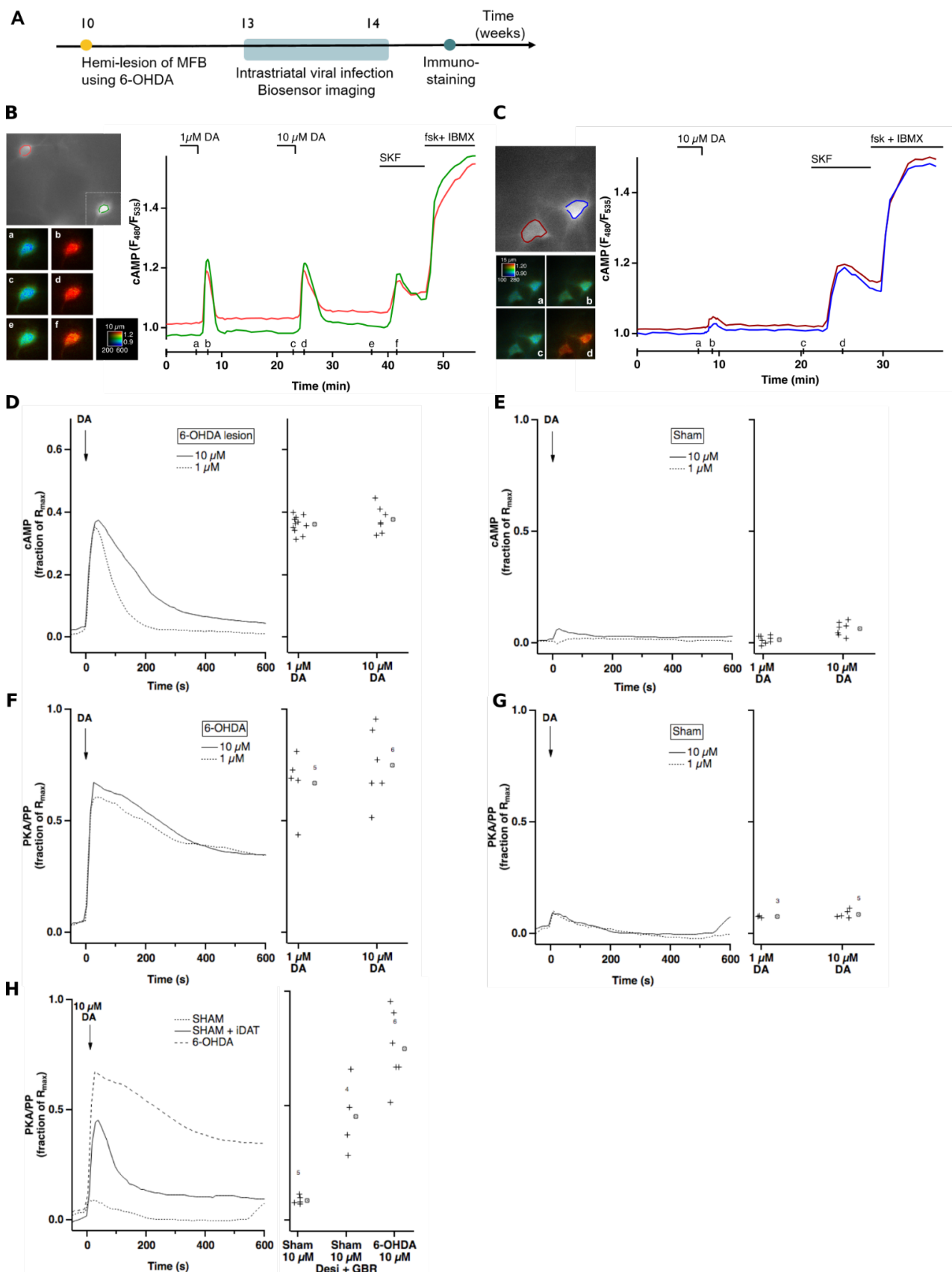


Figure 3: Hypersensitive response to dopamine in D1 MSNs in 6-OHDA lesioned mice. The *Epac-SH150* biosensor was expressed in striatal brain slices from adult mice and imaged with wide-field microscopy. (A) Timeline of experiments. Mice (8-11 weeks old) were injected with 6-OHDA or saline (sham-operated) solution into the mfb. After three weeks of recovery, biosensor-expressing Sindbis virus were injected into the dorsal striatum and the day after, biosensor imaging was performed on acute brain slices. Slices were fixed for TH-immunostaining to confirm the Activating PDE2A in LID

dopaminergic lesion for each animal. (B-C) left: field of view showing the fluorescence at 535 nm (F535) in brain slices from 6-OHDA lesioned mice (B) or sham-operated mice (C). Pseudo-color images (a-f and a-d) of the region indicated by the rectangle and corresponding to the time points on the graph. Right: Graph represents the emission ratio reporting the intracellular cAMP concentration measured on the cell body of individual D1 MSNs. Horizontal bars represent the application time of the different drugs. Dopamine (1 or 10 μ M) is released from NPEC-DA by a flash of UV light. SKF-81297 (100 nM) increased cAMP level specifically in D1 MSNs, confirming their identity. Forskolin (fsk, 13 μ M) and IBMX (200 μ M) maximally increased cAMP levels. (D-E) Average traces and amplitude measurements for Epac-SH150 biosensor. The graph on the left shows the average ratio during the response to dopamine (1 and 10 μ M) normalized to maximal forskolin and IBMX response from individual experiments in 6-OHDA lesioned mice (D) and sham mice (E). Right: plots display the peak amplitude of dopamine responses in D1 MSNs for each dose of dopamine tested in 6-OHDA mice (D) and sham mice (E) (F, G) Same as D-E except that the AKAR4 biosensor was used to report PKA-dependent phosphorylation (H) Average traces and amplitude measurements for dopamine effects (10 μ M) on AKAR4. Traces display the normalized responses to dopamine alone in sham mice (N=5), dopamine in the presence of monoamine reuptake inhibitors (GBR12783 (GBR, 1 μ M) + desipramine (desi, 1 μ M))(N=4) and dopamine alone in 6-OHDA lesioned mice (N=6). (D) 1 μ M N=11 ; 10 μ M N=7 (E) 1 μ M N=8 ; 10 μ M N=7 (F) 1 μ M N=5 ; 10 μ M N=6 (G) 1 μ M N=3 ; 10 μ M N=5. The average of the different repeats is represented with a square symbol.

We evaluated the dopamine response in sham and hemi-parkinsonian mice using Epac-SH150 and AKAR4 (Figure 3). The biosensor signal was monitored in individual D1 MSNs during the response triggered by NPEC-DA (1 μ M or 10 μ M) uncaging. At the end of the protocol, the selective D1-like agonist SKF-81297 (SKF, 100 nM) was applied in the bath to confirm the identity of D1 MSNs. Then, the maximal ratio response of the biosensor was reached by forskolin (fsk, 13 μ M) and IBMX (200 μ M). In hemiparkinsonian mice, dopamine uncaging in the brain slice transiently increased cAMP levels in D1 MSNs (Figure 3B). The amplitude of the cAMP responses were not statistically different between 1 and 10 μ M of NPEC-DA uncaging (NPEC-DA 1 μ M: 0.36 of Rmax, N=11 and NPEC-DA 10 μ M: 0.38 of Rmax, N=7), but the duration of the response was longer with 10 μ M NPEC-DA than with 1 μ M (Figure 3D).

The same protocol was performed with the AKAR4 sensor (Figure 3F). As expected from the higher sensitivity of this biosensor, dopamine uncaging in the brain slice triggered large and long-lasting PKA responses in D1 MSNs (NPEC-DA 1 μ M: 0.67 of Rmax, N=5 ; NPEC-DA 10 μ M 0.75 of Rmax, N=6).

The D1 response in slices from sham mice strongly departed from the response measured in slices from hemi-parkinsonian animals: no detectable cAMP response to this dopamine uncaging protocol (NPEC-DA, 1 or 10 μ M) was observed, although bath application of the D1 receptor with the selective agonist SKF-81297 (100 nM) applied at the end of the experiment triggered a large cAMP response (figure 3C, 3F). The same protocol was performed with the AKAR4 biosensor (figure 3G). As observed at cAMP level, there was no response to transient dopamine in sham mice whereas the SKF application efficiently increased in PKA activity (data not shown).

In adult mice, the striatum is highly innervated by DA terminals responsible for efficient dopamine re-uptake. We hypothesize that this re-uptake mechanism, intact in non-lesioned mice, but absent in 6-OHDA lesioned mice, by quickly lowering dopamine concentration, prevents the

activation of D1 receptors by dopamine. Therefore, we selectively inhibited the dopamine transporter (DAT) and noradrenaline transporter (NAT) with GBR12783 (GBR, 1 μ M) and desipramine (desi, 1 μ M), respectively. In these conditions, the release of dopamine (10 μ M) in the brain slice increased the PKA signal, confirming that dopamine re-uptake dampens the response to dopamine in non-lesioned mice. However, the response to dopamine was still smaller in amplitude and duration, when compared to hemi-parkinsonian mice (Figure 3H) (SHAM, NPEC-DA : 0.90 of Rmax N=5 ; SHAM, NPEC-DA+GBR+desi: 0.45 of Rmax N=4 ; 6-OHDA, NPEC-DA: 0.75 of Rmax, N=6). These results suggest that in the hemi-parkinsonian mouse model, transient dopamine triggers large cAMP levels and PKA responses to dopamine that are lacking in sham-operated mice. These results are consistent with the hypersensitive cAMP/PKA responses to dopamine observed in Parkinsonian mice and described in the literature (Alcacer *et al.*, 2012; Jones-Tabah *et al.*, 2020; Mariani *et al.*, 2019).

PDE2A activation moderates the hypersensitive cAMP responses in 6-OHDA mice

Here we aim at evaluating whether the activation of PDE2A by NO/cGMP signaling efficiently reduces excessive cAMP levels after D1 receptor stimulation in Parkinsonian mice. We first observed with Western-blot analysis that the expression levels of PDE2A protein in the dorsal striatum are similar in 6-OHDA and in sham mice. No differences in PDE2A expression were observed in the left and right hemisphere of sham and 6-OHDA mice (figure 4A). As expected, the 6-OHDA lesion striatum (right brain hemisphere, R) lacks tyrosine hydroxylase (TH), confirming the success of dopamine terminal lesion whereas in the non lesioned striatum (left brain hemisphere, L) TH was largely expressed. In sham mice, TH protein was detected in both striatal hemispheres, with no significant difference between them. We then monitored the effect of the NO donor in the cAMP responses to dopamine. A first release of transient dopamine (3 μ M) displayed a transient increase in cAMP levels. After cAMP level returned to baseline, a second release of dopamine was performed in the presence of the NO donor (DEANO, 10 μ M), which significantly decreased the amplitude of this cAMP response (NPEC-DA 3 μ M: 0.44 of Rmax versus dopamine with DEANO: 0.27 of Rmax, N=6). A third trial of dopamine release was performed in the presence of both DEANO and a selective PDE2A inhibitor (PF-05180999, 'PF-05', 1 μ M), which restored the amplitude of the cAMP response (NPEC-DA + DEANO + PF-05: 0.50 of Rmax, N=6). At the end of the protocol, D1 receptor agonist was applied to confirm the identity of D1 MSNs, and the maximal ratio was obtained using fsk and IBMX.

As in young mice (Betolngar *et al.*, 2019; Yapo *et al.*, 2017), these dopamine responses were repeatable 3 times in the same slice, with no changes in amplitude or kinetics were observed (supplementary data).

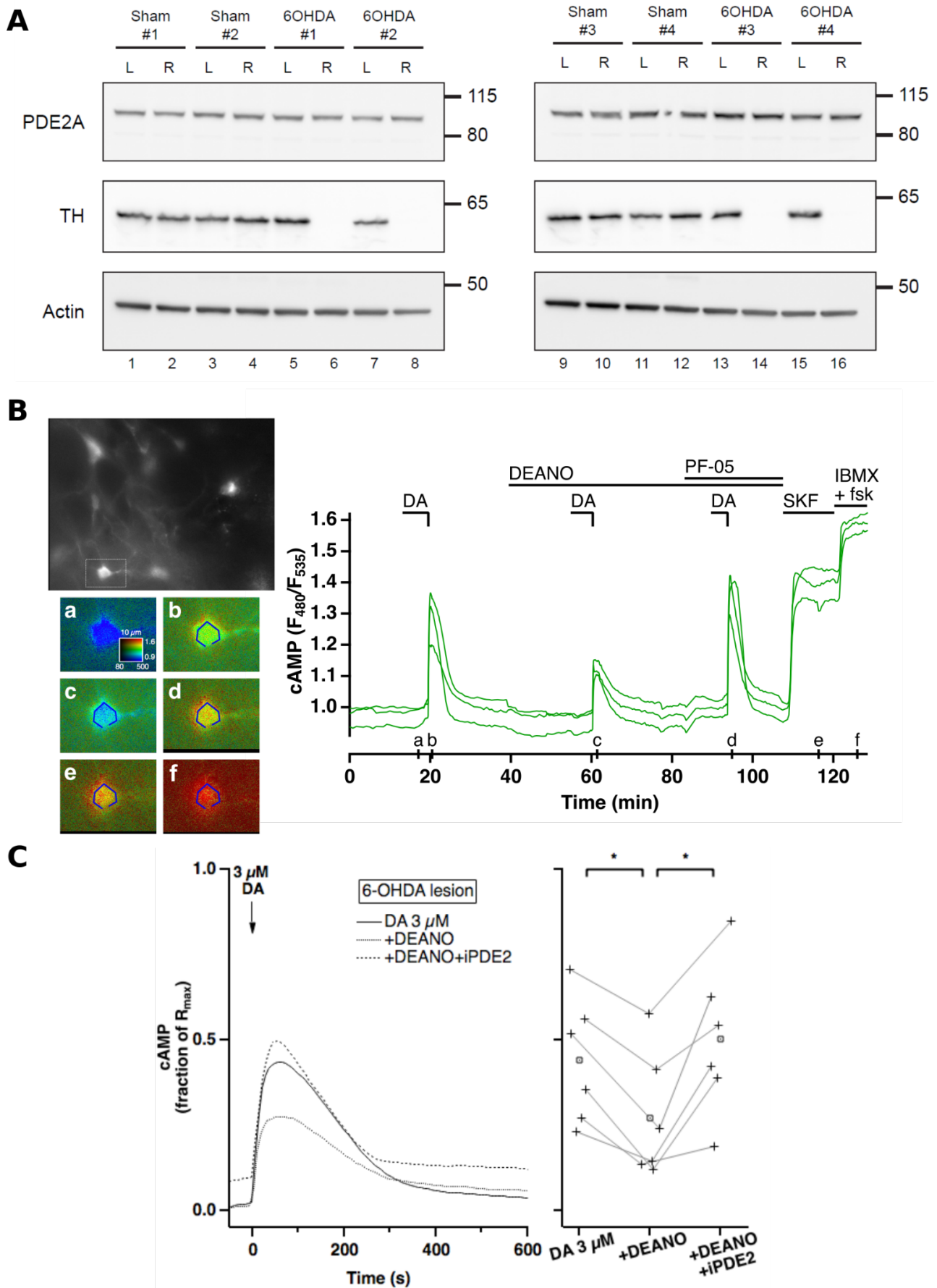


Figure 4 : Stimulation of PDE2A activity by NO donor reduces hypersensitive cAMP responses in D1 MSNs of 6-OHDA lesioned mice. (A) Western blot analysis of PDE2A and tyrosine hydroxylase

(TH) expression of the right (R) and left (L) striatum of four representative control mice (Sham) and four representative 6-OHDA-lesioned mice (unilateral lesion of the right striatum). (B) Striatal brain slices from adult 6-OHDA-lesioned mice expressing Epac-SH150 biosensor were imaged with wide-field microscopy. The regions of interest on individual neurons define the area used to measure the ratio (F480/F535). Pseudo-color images (e-f) of the region indicated by the rectangle in the field of view and corresponding to the time points on the graph. Graph represents the emission ratio reporting the intracellular cAMP concentration measured on the cell body of D1 MSNs. Horizontal bars represent drug applications. Dopamine (3 μ M) is released by a flash of UV light and increases transiently cAMP level in D1 MSNs. DEANO (10 μ M) reduced the amplitude of a second dopamine release and this effect was abolished by PDE2A inhibition (PF-05, 1 μ M) in a third dopamine release. SKF-81297 (100 nM) increased cAMP level specifically in D1 MSNs, confirming their identity. Forskolin (13 μ M) and IBMX (200 μ M) maximally increased cAMP levels. (C) Left: average traces normalized to the maximal response to forskolin and IBMX. Dopamine response (DA 3 μ M) alone, in the presence of the NO donor DEANO) or in the presence of DEANO and the PDE2A inhibitors (iPDE2, PF-05). Right: plots display the peak amplitude of dopamine responses in D1 MSNs for each condition (N=6). The average of the different repeats is represented with a square symbol. * indicates a statistically significant difference.

PDE2A activation down-regulates cAMP responses in dyskinetic mice

In 6-OHDA mice, L-DOPA treatment induced excessive activity in some D1 MSNs resulting in the development of dyskinesia (Girasole *et al.*, 2018). We thus wanted to test whether PDE2A activation might moderate the D1 response to dopamine in brain slices from dyskinetic mice. Three weeks after 6-OHDA injection into the mfb, mice were daily injected intraperitoneally with L-DOPA (3 mg/kg during the first week and then 6 mg/kg) (figure 5A). Benserazide was added to the solution to prevent peripheral L-DOPA decarboxylation. Some mice were injected with saline solution and considered as hemi-parkinsonian mice after the validation of the lesion by TH-immunochemistry. After two to three weeks of treatment (saline or L-DOPA), dyskinesia were evaluated by AIMS scoring (Francardo *et al.*, 2011) (figure 5B). Only L-DOPA-treated mice with a total AIMS score significantly higher than saline-treated mice were considered as dyskinetic mice. As in hemi-parkinsonian mice, virus was injected in two sites of the dorsal striatum by stereotaxic surgery for biosensor expression. The day after, acute brain slices were prepared and imaging was performed.

We monitored cAMP changes after NPEC-DA uncaging (3 μ M). As in hemi-parkinsonian mice, the control response was a transient increase in cAMP level in D1 MSNs. The application of DEANO (10 μ M) moderated the cAMP response. The addition of PF-05 (1 μ M) to DEANO restored the response amplitude in a third trial, indicating that the effect of DEANO was mediated by PDE2A (NPEC-DA 3 μ M: 0.44 of Rmax ; NPEC-DA+DEANO: 0.19 of Rmax ; NPEC-DA+DEANO + PF-05: 0.46 of Rmax, N=5).

Together these results indicate that the excess of cAMP level in response to transient dopamine in hemi-parkinsonian and dyskinetic mouse brain slices is efficiently moderated by the activation of NO/cGMP signaling pathway, through a PDE2A dependent mechanism.

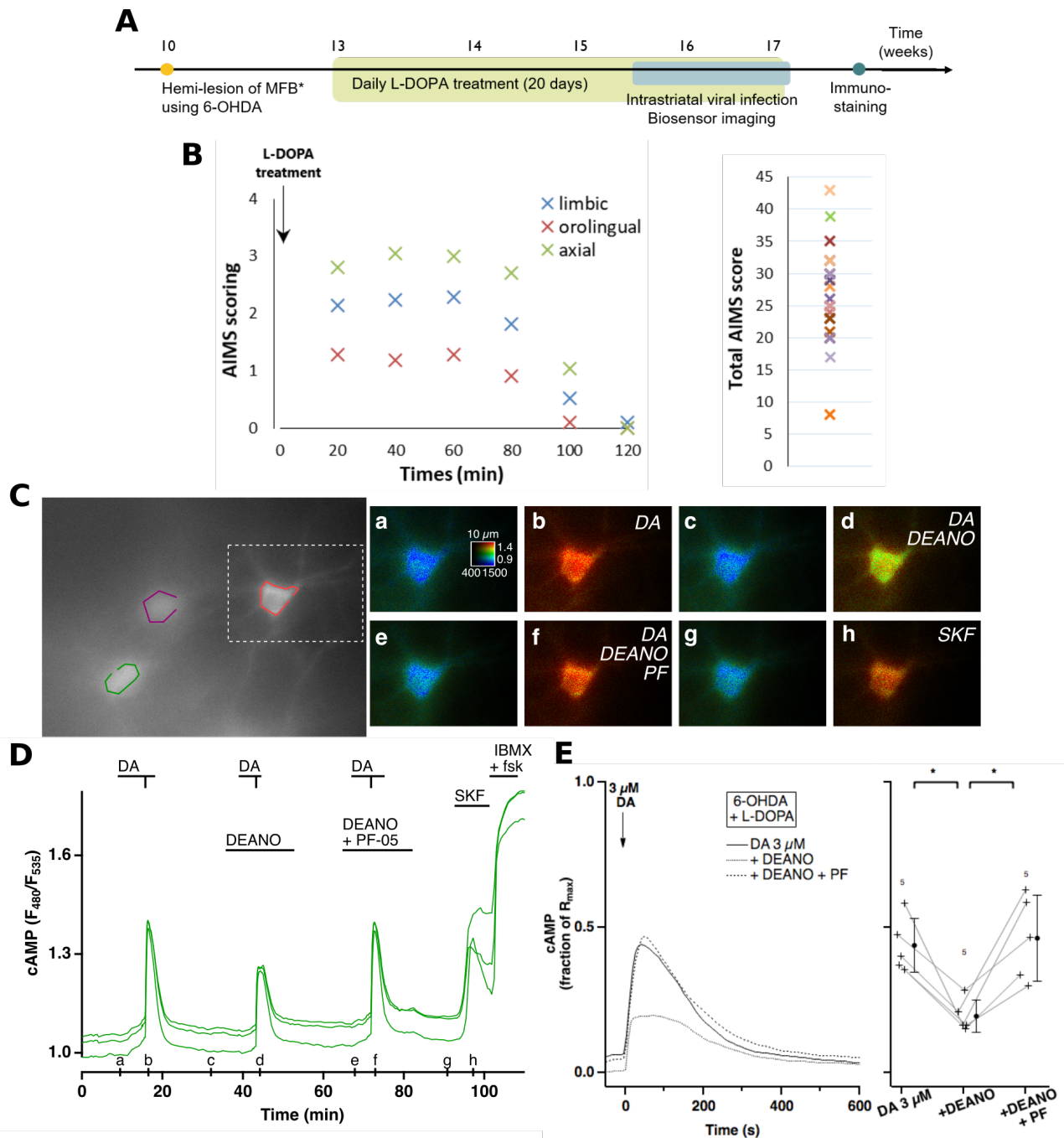


Figure 5 : Stimulation of PDE2A activity reduces the amplitude of cAMP responses to dopamine in the mouse model of L-DOPA-induced dyskinesia. (A) Timeline of the experiment. Mice (8-11 weeks old) were injected with 6-OHDA solution into the mfb. After three weeks of recovery, mice were daily treated with L-DOPA (3 mg/kg during the first week and then 6 mg/kg) and benserazide (12 mg/kg). Biosensor-expressing Sindbis virus were injected into the dorsal striatum and the day after, biosensor imaging was performed on acute brain slices. Slices were fixed for TH-immunostaining to confirm the dopaminergic lesion (B) Quantitative evaluation of AIMs after L-DOPA treatment Left: the duration and score of orolingual (red), limbic (blue) and axial (green) AIMs at day 10 of L-DOPA treatment. Right : the sum of orolingual, limbic and axial AIMs at day 10 of L-DOPA treatment obtained in each dyskinetic mouse. (C) The Epac-SH150 biosensor was expressed in striatal brain slices from dyskinetic mice and imaged with wide-field microscopy. Pseudo-color images (a-h) of the region indicated by the rectangle in the field of view and corresponding to the time points on the graph D. (D) Graph represents the emission ratio reporting the intracellular cAMP concentration measured on the cell body of individual neurons. Horizontal bars represent drug applications. The protocol is the same as described in Figure 4. (E) Left: average traces

*normalized to the maximal response forskolin and IBMX. Dopamine control response (DA 3 μ M) alone or in the presence of DEANO (DEANO, 10 μ M) and PF-05 (PF, 1 μ M) Right: plots display the peak amplitude of dopamine responses in D1 MSNs for each condition (N=6) The average of the different repeats is represented with a square symbol. * indicates a statistically significant difference.*

PDE2A activation moderates the PKA response to dopamine in dyskinesia

Since PDE2A stimulation is sufficient to decrease cAMP level after transient dopamine release without suppressing the response, we tested whether stimulation of PDE2A on sustained dopamine stimulus was sufficient to reduce PKA activity. The application of continuous dopamine (3 μ M) leads to an increase of PKA activity specifically in D1 MSNs, which remains stable as long as dopamine was present in the bath. Application of DEANO (10 μ M) on the top of this steady state response reduced the PKA-dependent phosphorylation level by 20% (dopamine 3 μ M: 0.73 of Rmax ; dopamine and DEANO: 0.53 of Rmax, N=6) and this was reversed by the application of the PDE2A inhibitor PF-05 (dopamine, DEANO and PF-05: 0.78 of Rmax) (figure 6A-C). When PDE2A was inhibited before the application of DEANO, this one had no effect on PKA signal (figure 6D). Although the PDE2A inhibitor alone does not increase the phosphorylation level, it prevents the effect of DEANO. These results showed that PDE2A stimulation reduces but does not suppress cAMP/PKA signaling pathway in dyskinetic mouse brain slices.

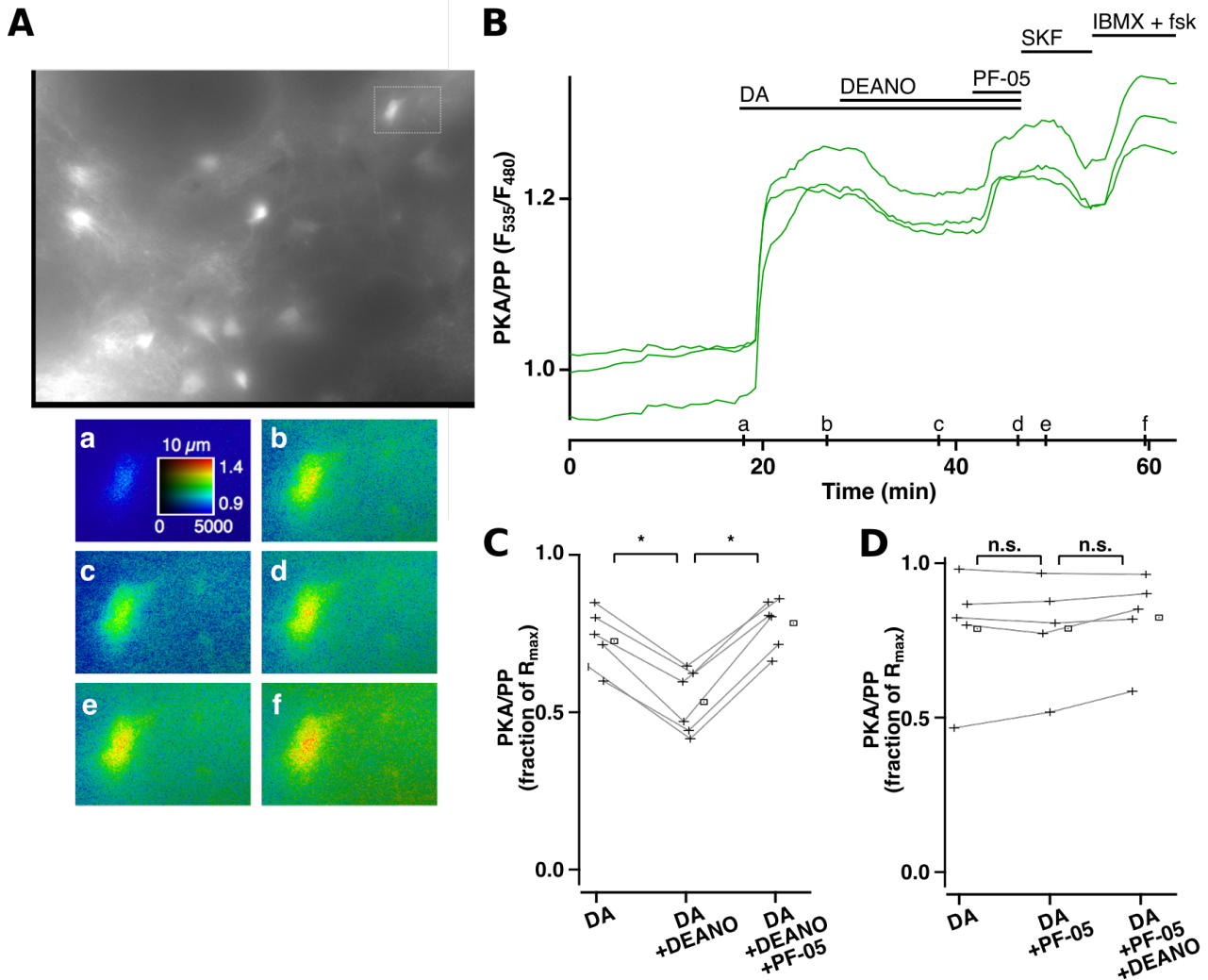


Figure 6 : Stimulation of PDE2A activity by a NO donor reduces PKA activity in response to continuous stimulation of D1 receptors by dopamine. The AKAR4 biosensor was expressed in dyskinetic mice. Striatal brain slices were imaged with wide-field microscopy. Pseudo-color images (a-f) of the region indicated by the rectangle in the field of view and corresponding to the time points on the graph B. (B) Each trace on the graph reports the emission ratio corresponding to the PKA-dependent phosphorylation level measured on the cell body of individual neurons. Horizontal bars represent drug applications. Continuous dopamine ($3\mu\text{M}$) application in the bath increases PKA-dependent phosphorylation level in D1 MSNs. DEANO ($10\mu\text{M}$) application decreased the PKA response and this effect was reverted by PDE2A inhibitor (PF-05, $1\mu\text{M}$). Forskolin ($13\mu\text{M}$) and IBMX ($200\mu\text{M}$) maximally increased cAMP levels. (C-D) Plots display the average of the response to sustained dopamine (DA) applied alone, in presence of DEANO ($10\mu\text{M}$) or in the presence of DEANO and PF-05 ($1\mu\text{M}$). The average of individual experiments is represented by a square symbol. * indicates a statistically significant difference, n.s. non significant

DISCUSSION

Using biosensor imaging in the striatum of adult mice our work confirms and extends previous observations on signaling dys-regulations in hemi-parkinsonian and dyskinetic mice. Our results suggest that PDE2A activation may constitute a novel therapeutic strategy to moderate the cAMP/PKA signaling pathway which becomes pathologically high in D1 MSNs during L-DOPA-induced dyskinesia.

In agreement with previous studies we observed that cAMP and PKA responses to dopamine were increased in hemi-parkinsonian and dyskinetic-mice. Indeed, administration of L-DOPA is associated with the hyper-phosphorylation of the PKA targets, such as DARPP-32, GluA1 or Δ Fos-B (Bateup *et al.*, 2010; Alcacer *et al.*, 2012; Aubert *et al.*, 2005; Santini *et al.*, 2007; Feyder *et al.*, 2016; Andersson *et al.*, 1999; Santini *et al.*, 2008). In this context, PKA signaling appears as an important mediator of these effects because its pharmacological intrastriatal inhibition partially reduces the intensity of LID and its molecular correlates such as Δ FosB accumulation (Santini *et al.*, 2007; Lebel *et al.*, 2010).

The hypersensitivity to dopamine observed in D1 MSNs is not related to D1 receptors, as their expression levels are not significantly changed following DA depletion in animal models (Savasta *et al.*, 1988; Herve *et al.*, 1989; Gerfen *et al.*, 1990; Hervé, 2011; Pavón *et al.*, 2006) or in PD patients (Nikolaus, 2009). This sensitization to dopamine relies on increased levels of $G_{\alpha_{olf}}$ protein, observed in PD patients and rodents after DA depletion (Hervé *et al.*, 1993; Corvol *et al.*, 2004; Alcacer *et al.*, 2012; Ruiz-DeDiego *et al.*, 2015; Morigaki *et al.*, 2017; Mariani *et al.*, 2019) (Marcotte, 1994).

As previously reported, transient dopamine triggered a large increase in cAMP levels and PKA activity in juvenile mice (Castro *et al.*, 2013; Yapo *et al.*, 2017). In adult mice, our biosensor approach only detects a response to transient dopamine when DAT and NAT transporters were inhibited, in agreement with efficient dopamine re-uptake in adult brain slices (Patriarchi *et al.*, 2018). However, these responses remained very small in amplitude and duration, compared to the responses observed in juvenile mice or 6-OHDA mice.

Several studies have reported morphological and electrophysiological changes in dopaminergic neurons and MSNs during the first three postnatal weeks in rodents (Lieberman *et al.*, 2018; Tepper *et al.*, 1998; Tepper & Trent, 1993; Valtcheva *et al.*, 2017; Voorn *et al.*, 1988). During this juvenile period, MSNs are in a hyper-excitabile state before evolving into a more mature state (Lieberman *et al.*, 2018). Our experiments in these mice (P7-P12) were performed in this critical period, where immature MSNs display large cAMP/PKA responses to dopamine.

Interestingly, our protocol of transient dopamine release in adult 6-OHDA mice also triggered a large and long-lasting PKA signal, in contrast with the adult control. These results suggest that chronic dopamine depletion triggers a cellular ‘remodeling’ that forces the MSNs to return to the immature state. This hypersensitivity to dopamine persisted after L-DOPA treatment, and is associated with persistent phosphorylation of PKA targets during LID (Bateup *et al.*, 2010; Alcacer *et al.*, 2012; Aubert *et al.*, 2005; Santini *et al.*, 2007; Feyder *et al.*, 2016; Andersson *et al.*, 1999; Santini *et al.*, 2008). Our results clearly show that PDE2A activation moderates the amplitude of the

PKA response without suppressing it. These results show that PDE2A, by its low affinity for cAMP, preferentially regulates high levels of cAMP in dyskinetic mice. This window of PDE2A action has a major advantage over PDE10A: PDE2A would regulate the excessive responses to dopamine, responsible for LID manifestations, without affecting the therapeutic action of L-DOPA treatment.

The regulation of cAMP levels by the NO/cGMP pathway thus seems to be crucial in the control of the excitability of output pathways of the striatum. However the action of NO on MSNs activity remains controversial. Some studies show that NO release increases their electrical activity (Ondracek *et al.*, 2008; Sammut *et al.*, 2007; Threlfell & West, 2013; West & Grace, 2004; West & Tseng, 2011) while other studies show a decrease (Calabresi *et al.*, 2007; Calabresi *et al.*, 1999; Di Giovanni *et al.*, 2003; Galati *et al.*, 2008). The effect of NO on MSNs thus seems to differ depending on the experimental conditions. The effect of NOergic interneurons is usually simulated by an application of NO donor, not reflecting the physiological NO release by these interneurons. It appears that NO has a permissive role toward potentiation or depression depending on the excitability state of the MSNs (West & Tseng, 2011). Optogenetic activation of NOergic interneurons has provided insight into the effect of NO on MSNs and supports this hypothesis (Fino *et al.*, 2018; Rafalovich *et al.*, 2015; Straub *et al.*, 2016). Thus, opto-activation of NOergic interneurons promotes depression of MSNs through a mechanism of AMPA receptor internalization (Rafalovich *et al.*, 2015). Increasing cGMP levels stimulates PDE2A in favor of decreased cAMP levels and AMPA receptor internalization (Song *et al.*, 2016).

PDE10A inhibitors were shown to reduce LID in different rodent models and in monkeys, without affecting the efficacy of L-DOPA (Padovan-Neto *et al.*, 2015; Beck *et al.*, 2018; Arakawa *et al.*, 2020; Guimarães *et al.*, 2022). The mechanism of PDE10A action is not fully elucidated but the importance of PDE10A activity in regulating basal cAMP levels in MSNs was clearly described (Polito *et al.*, 2015; Mota *et al.*, 2021a; Sano *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2006). However, the hydrolysis of cGMP by PDE10A is the subject of divergent results. Some studies showed that its inhibition does not alter cGMP levels in MSNs (Polito *et al.*, 2015; Russwurm *et al.*, 2015; Sano *et al.*, 2008), whereas other studies show an elevation of cGMP levels in MSNs following PDE10A inhibition (Grauer *et al.*, 2009; Padovan-Neto *et al.*, 2015; Schmidt *et al.*, 2008; Siuciak *et al.*, 2006b). PDE10A inhibition was shown to enhance membrane excitability and responsiveness of MSNs to cortical inputs (Threlfell *et al.*, 2009; West & Grace, 2004; Padovan-Neto *et al.*, 2015). This facilitative effect was lost by striatal infusion of the soluble guanylyl cyclase (sGC) inhibitor, ODQ, and absent in neuronal nitric oxide (nNOS) knockout mice (Padovan-Neto *et al.*, 2015; Siuciak *et al.*, 2006a). The inhibition of adenylyl cyclase with SQ 22536, had no effect. These results suggest that the antidyskinetic effects of PDE10A inhibitors on LID may be mediated by cGMP. However, the effect of cGMP in the development of LID is contradictory and needs further investigation: intravenous administration of the NO-donor, molsidomine, reduces LID (Lorenc-Koci *et al.*, 2013; Solís *et al.*, 2015) but inhibition of cGMP production by NOS inhibitors also reduces LID (Padovan-Neto *et al.*, 2009; Takuma *et al.*, 2012).

Our observations provide a mechanism for the observation that activation of the NO-cGMP pathway can moderate LID (Lorenc-Koci *et al.*, 2013; Solís *et al.*, 2015). This mechanism implies PDE2A activation and is in line with previous studies describing hyperkinetic movement disorders

in human mutations reducing or suppressing PDE2A activity. (Salpietro *et al.*, 2018; Doummar *et al.*, 2020)

Our experiments clearly show the mechanistic effect of cGMP/PDE2A signaling in MSNs of parkinsonian and dyskinetic mice. Although further studies are needed to validate this effect in vivo. Targeting PDE2A using a NO donor is not feasible in humans due to its lack of specificity. We hypothesize that direct activation of PDE2A may be an interesting strategy to reduce overactivation of D1 MSNs. So far, 2 allosteric modulators of PDE2A activity were developed, 5,6-DM-cBIMP and 5,6-DCl-cBIMP (Jäger *et al.*, 2010), but they lack specificity and activate PKA. The opto-activation of NOergic interneurons could be a first step. The expression of a photo-activatable PDE2A in the striatum (Gasser *et al.*, 2014) would allow the study of striatal PDE2A in LID expression, and eventually comfort the development of therapeutic strategies targeting PDE2A for the treatment of LID or other pathologies associated with D1 MSNs hyperactivity.

REFERENCES

- Alcacer C, Andreoli L, Sebastianutto I, Jakobsson J, Fieblinger T & Cenci MA (2017). Chemogenetic stimulation of striatal projection neurons modulates responses to Parkinson's disease therapy. *J Clin Invest* **127**, 720–734.
- Alcacer C, Santini E, Valjent E, Gaven F, Girault JA & Herve D (2012). Galphao1f Mutation Allows Parsing the Role of cAMP-Dependent and Extracellular Signal-Regulated Kinase-Dependent Signaling in L-3,4-Dihydroxyphenylalanine-Induced Dyskinesia. *J Neurosci* **32**, 5900–5910.
- Andersson M, Hilbertson A & Cenci MA (1999). Striatal fosB expression is causally linked with l-DOPA-induced abnormal involuntary movements and the associated upregulation of striatal prodynorphin mRNA in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* **6**, 461–474.
- Arakawa K, Yuge N & Maehara S (2020). Ameliorative effects of a phosphodiesterase 10A inhibitor, MR1916 on L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats. *Pharmacol Rep* **72**, 443–448.
- Aubert I, Guigoni C, Hakansson K, Li Q, Dovero S, Barthe N, Bioulac BH, Gross CE, Fisone G, Bloch B & Bezard E (2005). Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia. *Ann Neurol* **57**, 17–26.
- Bateup HS, Santini E, Shen W, Birnbaum S, Valjent E, Surmeier DJ, Fisone G, Nestler EJ & Greengard P (2010). Distinct subclasses of medium spiny neurons differentially regulate striatal motor behaviors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 14845–14850.
- Beaulieu JM & Gainetdinov RR (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev* **63**, 182–217.
- Beck G, Maehara S, Chang PL & Papa SM (2018). A Selective Phosphodiesterase 10A Inhibitor Reduces L-Dopa-Induced Dyskinesias in Parkinsonian Monkeys. *Mov Disord* **33**, 805–814.
- Bertran-Gonzalez J, Hervé D, Girault JA & Valjent E (2010). What is the Degree of Segregation between Striatonigral and Striatopallidal Projections. *Front Neuroanat* **4**, 136.
- Betolngar DB, Mota É, Fabritius A, Nielsen J, Hougaard C, Christoffersen CT, Yang J, Kehler J, Griesbeck O, Castro LRV & Vincent P (2019). Phosphodiesterase 1 Bridges Glutamate Inputs with NO- and Dopamine-Induced Cyclic Nucleotide Signals in the Striatum. *Cereb Cortex* **29**, 5022–5036.
- Calabresi P, Gubellini P, Centonze D, Sancesario G, Morello M, Giorgi M, Pisani A & Bernardi G (1999). A critical role of the nitric oxide/cGMP pathway in corticostriatal long-term depression. *J Neurosci* **19**, 2489–2499.
- Calabresi P, Picconi B, Tozzi A & Di Filippo M (2007). Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends Neurosci* **30**, 211–219.
- Castro LR, Brito M, Guiot E, Polito M, Korn CW, Herve D, Girault JA, Paupardin-Tritsch D & Vincent P (2013). Striatal neurones have a specific ability to respond to phasic dopamine release. *J Physiol* **591**, 3197–3214.
- Corvol JC, Muriel MP, Valjent E, Feger J, Hanoun N, Girault JA, Hirsch EC & Herve D (2004). Persistent increase in olfactory type G-protein alpha subunit levels may underlie D1 receptor functional hypersensitivity in Parkinson disease. *J Neurosci* **24**, 7007–7014.
- Darmopil S, Martín AB, De Diego IR, Ares S & Moratalla R (2009). Genetic inactivation of dopamine D1 but not D2 receptors inhibits L-DOPA-induced dyskinesia and histone activation. *Biol Psychiatry* **66**, 603–613.
- de Vente J, Asan E, Gambaryan S, Markerink-van Ittersum M, Axer H, Gallatz K, Lohmann SM & Palkovits M (2001). Localization of cGMP-dependent protein kinase type II in rat brain. *Neuroscience* **108**, 27–49.
- Del-Bel E, Padovan-Neto FE, Szawka RE, da-Silva CA, Raisman-Vozari R, Anselmo-Franci J, Romano-Dutra AC & Guimaraes FS (2014). Counteraction by nitric oxide synthase inhibitor of neurochemical alterations of dopaminergic system in 6-OHDA-lesioned rats under L-DOPA treatment. *Neurotox Res* **25**, 33–44.
- Depry C, Allen MD & Zhang J (2011). Visualization of PKA activity in plasma membrane microdomains. *Mol Biosyst* **7**, 52–58.
- Di Giovanni G, Ferraro G, Sardo P, Galati S, Esposito E & La Grutta V (2003). Nitric oxide modulates striatal neuronal activity via soluble guanylyl cyclase: an in vivo microiontophoretic study in rats. *Synapse* **48**, 100–107.
- Doumar D, Dentel C, Lyautey R, Metreau J, Keren B, Drouot N, Malherbe L, Boullieret V, Courraud J, Valenti-Hirsch MP, Minotti L, Dozieres-Puyravel B, Bär S, Scholly J, Schaefer E, Nava C, Wirth T,

- Nasser H, de Salins M, de Saint Martin A, Warde MTA, Kahane P, Hirsch E, Anheim M, Friant S, Chelly J, Mignot C & Rudolf G (2020). Biallelic PDE2A variants: a new cause of syndromic paroxysmal dyskinesia. *Eur J Hum Genet* **28**, 1403–1413.
- Ehrengruber MU, Lundstrom K, Schweitzer C, Heuss C, Schlesinger S & Gähwiler BH (1999). Recombinant Semliki Forest virus and Sindbis virus efficiently infect neurons in hippocampal slice cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7041–7046.
- el-Husseini AE, Bladen C & Vincent SR (1995). Molecular characterization of a type II cyclic GMP-dependent protein kinase expressed in the rat brain. *J Neurochem* **64**, 2814–2817.
- El-Husseini AE, Williams J, Reiner PB, Pelech S & Vincent SR (1999). Localization of the cGMP-dependent protein kinases in relation to nitric oxide synthase in the brain. *J Chem Neuroanat* **17**, 45–55.
- Feyder M, Södersten E, Santini E, Vialou V, LaPlant Q, Watts EL, Spigolon G, Hansen K, Caboche J, Nestler EJ & Fisone G (2016). A Role for Mitogen- and Stress-Activated Kinase 1 in L-DOPA-Induced Dyskinesia and Δ FosB Expression. *Biol Psychiatry* **79**, 362–371.
- Fino E, Vandecasteele M, Perez S, Saudou F & Venance L (2018). Region-specific and state-dependent action of striatal GABAergic interneurons. *Nat Commun* **9**, 3339.
- Francardo V, Recchia A, Popovic N, Andersson D, Nissbrandt H & Cenci MA (2011). Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* **42**, 327–340.
- Franklin KBJ & Paxinos G (2007). Elsevier,
- Galati S, D'angelo V, Scarnati E, Stanzione P, Martorana A, Procopio T, Sancesario G & Stefani A (2008). In vivo electrophysiology of dopamine-denervated striatum: focus on the nitric oxide/cGMP signaling pathway. *Synapse* **62**, 409–420.
- Gasser C, Taiber S, Yeh CM, Wittig CH, Hegemann P, Ryu S, Wunder F & Moglich A (2014). Engineering of a red-light-activated human cAMP/cGMP-specific phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 8803–8808.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJJ & Sibley DR (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* **250**, 1429–1432.
- Girasole AE, Lum MY, Nathaniel D, Bair-Marshall CJ, Guenther CJ, Luo L, Kreitzer AC & Nelson AB (2018). A Subpopulation of Striatal Neurons Mediates Levodopa-Induced Dyskinesia. *Neuron* **97**, 787–795.e6.
- Grauer SM, Pulito VL, Navarra RL, Kelly M, Kelley C, Graf R, Langen B, Logue S, Brennan J, Jiang L, Charych E, Egerland U, Liu F, Marquis KL, Malamas M, Hage T, Comery TA & Brandon NJ (2009). PDE10A Inhibitor Activity in Preclinical Models of the Positive, Cognitive and Negative Symptoms of Schizophrenia. *J Pharmacol Exp Ther*
- Gryniewicz G, Poenie M & Tsien RY (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**, 3440–3450.
- Guimarães RP, Ribeiro DL, Dos Santos KB, Talarico CHZ, Godoy LD & Padovan-Neto FE (2022). Phosphodiesterase 10A Inhibition Modulates the Corticostriatal Activity and L-DOPA-Induced Dyskinesia. *Pharmaceuticals (Basel)* **15**, 947.
- Hervé D (2011). Identification of a specific assembly of the g protein golf as a critical and regulated module of dopamine and adenosine-activated cAMP pathways in the striatum. *Front Neuroanat* **5**, 48.
- Hervé D, Levi-Strauss M, Marey-Semper I, Verney C, Tassin JP, Glowinski J & Girault JA (1993). G(olf) and Gs in rat basal ganglia: possible involvement of G(olf) in the coupling of dopamine D1 receptor with adenylyl cyclase. *J Neurosci* **13**, 2237–2248.
- Herve D, Trovero F, Blanc G, Thierry AM, Glowinski J & Tassin JP (1989). Nondopaminergic prefrontocortical efferent fibers modulate D1 receptor denervation supersensitivity in specific regions of the rat striatum. *J Neurosci* **9**, 3699–3708.
- Jäger R, Schwede F, Genieser HG, Koesling D & Russwurm M (2010). Activation of PDE2 and PDE5 by specific GAF ligands: delayed activation of PDE5. *Br J Pharmacol* **161**, 1645–1660.
- Jones-Tabah J, Mohammad H, Hadj-Youssef S, Kim LEH, Martin RD, Benaliouad F, Tanny JC, Clarke PBS & Hébert TE (2020). Dopamine D1 receptor signalling in dyskinetic Parkinsonian rats revealed by fiber photometry using FRET-based biosensors. *Sci Rep* **10**, 14426.
- Jones-Tabah J, Mohammad H, Paulus EG, Clarke PBS & Hébert TE (2021). The Signaling and Pharmacology of the Dopamine D1 Receptor. *Front Cell Neurosci* **15**, 806618.

- Kelly MP, Adamowicz W, Bove S, Hartman AJ, Mariga A, Pathak G, Reinhart V, Romegialli A & Kleiman RJ (2014). Select 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases exhibit altered expression in the aged rodent brain. *Cell Signal* **26**, 383–397.
- Klarenbeek J, Goedhart J, van Batenburg A, Groenewald D & Jalink K (2015). Fourth-Generation Epac-Based FRET Sensors for cAMP Feature Exceptional Brightness, Photostability and Dynamic Range: Characterization of Dedicated Sensors for FLIM, for Ratiometry and with High Affinity. *PLoS One* **10**, e0122513.
- Lakics V, Karran EH & Boess FG (2010). Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. *Neuropharmacology* **59**, 367–374.
- Lebel M, Chagniel L, Bureau G & Cyr M (2010). Striatal inhibition of PKA prevents levodopa-induced behavioural and molecular changes in the hemiparkinsonian rat. *Neurobiol Dis* **38**, 59–67.
- Lieberman OJ, McGuirt AF, Mosharov EV, Pigulevskiy I, Hobson BD, Choi S, Frier MD, Santini E, Borgkvist A & Sulzer D (2018). Dopamine Triggers the Maturation of Striatal Spiny Projection Neuron Excitability during a Critical Period. *Neuron* **99**, 540–554.e4.
- Lorenc-Koci E, Czarnecka A, Lenda T, Kamińska K & Konieczny J (2013). Molsidomine, a nitric oxide donor, modulates rotational behavior and monoamine metabolism in 6-OHDA lesioned rats treated chronically with L-DOPA. *Neurochem Int* **63**, 790–804.
- Mariani LL, Longueville S, Girault JA, Hervé D & Gervasi N (2019). Differential enhancement of ERK, PKA and Ca²⁺ signaling in direct and indirect striatal neurons of Parkinsonian mice. *Neurobiol Dis* 104506.
- Martinez SE, Wu AY, Glavas NA, Tang XB, Turley S, Hol WG & Beavo JA (2002). The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13260–13265.
- Martins TJ, Mumby MC & Beavo JA (1982). Purification and characterization of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine tissues. *J Biol Chem* **257**, 1973–1979.
- Morigaki R, Okita S & Goto S (2017). Dopamine-Induced Changes in G_{α_{olf}} Protein Levels in Striatonigral and Striatopallidal Medium Spiny Neurons Underlie the Genesis of l-DOPA-Induced Dyskinesia in Parkinsonian Mice. *Front Cell Neurosci* **11**, 26.
- Mota É, Bompierre S, Betolngar D, Castro LRV & Vincent P (2021a). Pivotal role of phosphodiesterase 10A in the integration of dopamine signals in mice striatal D₁ and D₂ medium-sized spiny neurones. *Br J Pharmacol* **178**, 4873–4890.
- Mota E, Bompierre S, Castro LRV & Vincent P (2021b). Phosphodiesterase 2A, 4 and 10A contribution in the integration of dopamine signals in mice striatal D1 and D2 medium-sized spiny neurones. *EBRAINS*
- Murer MG & Moratalla R (2011). Striatal Signaling in L-DOPA-Induced Dyskinesia: Common Mechanisms with Drug Abuse and Long Term Memory Involving D1 Dopamine Receptor Stimulation. *Front Neuroanat* **5**, 51.
- Neves-Zaph SR (2017). Phosphodiesterase Diversity and Signal Processing Within cAMP Signaling Networks. *Adv Neurobiol* **17**, 3–14.
- Ondracek JM, Dec A, Hoque KE, Lim SA, Rasouli G, Indorkar RP, Linardakis J, Klika B, Mukherji SJ, Burnazi M, Threlfell S, Sammut S & West AR (2008). Feed-forward excitation of striatal neuron activity by frontal cortical activation of nitric oxide signaling in vivo. *Eur J Neurosci* **27**, 1739–1754.
- Padovan-Neto FE, Echeverry MB, Chiavegatto S & Del-Bel E (2011). Nitric Oxide Synthase Inhibitor Improves De Novo and Long-Term l-DOPA-Induced Dyskinesia in Hemiparkinsonian Rats. *Front Syst Neurosci* **5**, 40.
- Padovan-Neto FE, Echeverry MB, Tumas V & Del-Bel EA (2009). Nitric oxide synthase inhibition attenuates L-DOPA-induced dyskinesias in a rodent model of Parkinson's disease. *Neuroscience* **159**, 927–935.
- Padovan-Neto FE, Sammut S, Chakroborty S, Dec AM, Threlfell S, Campbell PW, Mudrakola V, Harms JF, Schmidt CJ & West AR (2015). Facilitation of Corticostriatal Transmission following Pharmacological Inhibition of Striatal Phosphodiesterase 10A: Role of Nitric Oxide-Soluble Guanylyl Cyclase-cGMP Signaling Pathways. *J Neurosci* **35**, 5781–5791.
- Padovan-Neto FE & West AR (2017). Regulation of Striatal Neuron Activity by Cyclic Nucleotide Signaling and Phosphodiesterase Inhibition: Implications for the Treatment of Parkinson's Disease. *Adv Neurobiol* **17**, 257–283.

- Park DJ & West AR (2009). Regulation of striatal nitric oxide synthesis by local dopamine and glutamate interactions. *J Neurochem* **111**, 1457–1465.
- Patriarchi T, Cho JR, Merten K, Howe MW, Marley A, Xiong WH, Folk RW, Broussard GJ, Liang R, Jang MJ, Zhong H, Dombeck D, von Zastrow M, Nimmerjahn A, Gradinaru V, Williams JT & Tian L (2018). Ultrafast neuronal imaging of dopamine dynamics with designed genetically encoded sensors. *Science* **360**,
- Pavón N, Martín AB, Mendiáldua A & Moratalla R (2006). ERK phosphorylation and FosB expression are associated with L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice. *Biol Psychiatry* **59**, 64–74.
- Polito M, Guiot E, Gangarossa G, Longueville S, Doulazmi M, Valjent E, Hervé D, Girault JA, Paupardin-Tritsch D, Castro LR & Vincent P (2015). Selective Effects of PDE10A Inhibitors on Striatopallidal Neurons Require Phosphatase Inhibition by DARPP-32. *eNeuro* **2**, ENEURO.0060–15.2015.
- Polito M, Klarenbeek J, Jalink K, Paupardin-Tritsch D, Vincent P & Castro LR (2013). The NO/cGMP pathway inhibits transient cAMP signals through the activation of PDE2 in striatal neurons. *Front Cell Neurosci* **7**, 211.
- Polito M, Vincent P & Guiot E (2014). Biosensor imaging in brain slice preparations. In *1071* ed. Zhang J, pp. 175–194. Humana Press,
- Poppe H, Rybalkin SD, Rehmann H, Hinds TR, Tang XB, Christensen AE, Schwede F, Genieser HG, Bos JL, Doskeland SO, Beavo JA & Butt E (2008). Cyclic nucleotide analogs as probes of signaling pathways. *Nat Methods* **5**, 277–278.
- Rafalovich IV, Melendez AE, Plotkin JL, Tanimura A, Zhai S & Surmeier DJ (2015). Interneuronal Nitric Oxide Signaling Mediates Post-synaptic Long-Term Depression of Striatal Glutamatergic Synapses. *Cell Rep* **13**, 1336–1342.
- Reyes-Irisarri E, Markerink-Van Ittersum M, Mengod G & de Vente J (2007). Expression of the cGMP-specific phosphodiesterases 2 and 9 in normal and Alzheimer's disease human brains. *Eur J Neurosci* **25**, 3332–3338.
- Ruiz-DeDiego I, Naranjo JR, Herve D & Moratalla R (2015). Dopaminergic regulation of olfactory type G-protein alpha subunit expression in the striatum. *Mov Disord*
- Russwurm C, Koesling D & Russwurm M (2015). Phosphodiesterase 10A Is Tethered to a Synaptic Signaling Complex in Striatum. *J Biol Chem* **290**, 11936–11947.
- Ryan MB, Bair-Marshall C & Nelson AB (2018). Aberrant Striatal Activity in Parkinsonism and Levodopa-Induced Dyskinesia. *Cell Rep* **23**, 3438–3446.e5.
- Salpietro V, Perez-Dueñas B, Nakashima K, San Antonio-Arce V, Manole A, Efthymiou S, Vandrovцова J, Bettencourt C, Mencacci NE, Klein C, Kelly MP, Davies CH, Kimura H, Macaya A & Houlden H (2018). A homozygous loss-of-function mutation in PDE2A associated to early-onset hereditary chorea. *Mov Disord* **33**, 482–488.
- Sammut S, Bray KE & West AR (2007). Dopamine D2 receptor-dependent modulation of striatal NO synthase activity. *Psychopharmacology (Berl)* **191**, 793–803.
- Sano H, Nagai Y, Miyakawa T, Shigemoto R & Yokoi M (2008). Increased social interaction in mice deficient of the striatal medium spiny neuron-specific phosphodiesterase 10A2. *J Neurochem* **105**, 546–556.
- Santini E, Valjent E & Fisone G (2008). Parkinson's disease: levodopa-induced dyskinesia and signal transduction. *FEBS J* **275**, 1392–1399.
- Santini E, Valjent E, Usiello A, Carta M, Borgkvist A, Girault JA, Herve D, Greengard P & Fisone G (2007). Critical involvement of cAMP/DARPP-32 and extracellular signal-regulated protein kinase signaling in L-DOPA-induced dyskinesia. *J Neurosci* **27**, 6995–7005.
- Savasta M, Dubois A, Benavidès J & Scatton B (1988). Different plasticity changes in D1 and D2 receptors in rat striatal subregions following impairment of dopaminergic transmission. *Neurosci Lett* **85**, 119–124.
- Schmidt CJ, Chapin DS, Cianfrogna J, Corman ML, Hajos M, Harms JF, Hoffman WE, Lebel LA, McCarthy SA, Nelson FR, Proulx-LaFrance C, Majchrzak MJ, Ramirez AD, Schmidt K, Seymour PA, Siuciak JA, Tingley FD, Williams RD, Verhoest PR & Menniti FS (2008). Preclinical characterization of selective phosphodiesterase 10A inhibitors: a new therapeutic approach to the treatment of schizophrenia. *J Pharmacol Exp Ther* **325**, 681–690.
- Siuciak JA, Chapin DS, Harms JF, Lebel LA, McCarthy SA, Chambers L, Shrikhande A, Wong S, Menniti FS & Schmidt CJ (2006a). Inhibition of the striatum-enriched phosphodiesterase PDE10A: a novel approach to the treatment of psychosis. *Neuropharmacology* **51**, 386–396.

- Siuciak JA, McCarthy SA, Chapin DS, Fujiwara RA, James LC, Williams RD, Stock JL, McNeish JD, Strick CA, Menniti FS & Schmidt CJ (2006b). Genetic deletion of the striatum-enriched phosphodiesterase PDE10A: evidence for altered striatal function. *Neuropharmacology* **51**, 374–385.
- Solís O, Espadas I, Del-Bel EA & Moratalla R (2015). Nitric oxide synthase inhibition decreases l-DOPA-induced dyskinesia and the expression of striatal molecular markers in Pitx3(-/-) aphakia mice. *Neurobiol Dis* **73**, 49–59.
- Song RS, Tolentino R, Sobie EA & Neves-Zaph SR (2016). Cross-regulation of Phosphodiesterase 1 and Phosphodiesterase 2 Activities Controls Dopamine-mediated Striatal α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid (AMPA) Receptor Trafficking. *J Biol Chem* **291**, 23257–23267.
- Straub C, Saulnier JL, Bègue A, Feng DD, Huang KW & Sabatini BL (2016). Principles of Synaptic Organization of GABAergic Interneurons in the Striatum. *Neuron* **92**, 84–92.
- Takuma K, Tanaka T, Takahashi T, Hiramatsu N, Ota Y, Ago Y & Matsuda T (2012). Neuronal nitric oxide synthase inhibition attenuates the development of L-DOPA-induced dyskinesia in hemi-Parkinsonian rats. *Eur J Pharmacol* **683**, 166–173.
- Tepper JM, Sharpe NA, Koós TZ & Trent F (1998). Postnatal development of the rat neostriatum: electrophysiological, light- and electron-microscopic studies. *Dev Neurosci* **20**, 125–145.
- Tepper JM, Tecuapetla F, Koos T & Ibanez-Sandoval O (2010). Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. *Front Neuroanat* **4**, 150.
- Tepper JM & Trent F (1993). In vivo studies of the postnatal development of rat neostriatal neurons. *Prog Brain Res* **99**, 35–50.
- Threlfell S, Sammut S, Menniti FS, Schmidt CJ & West AR (2009). Inhibition of Phosphodiesterase 10A Increases the Responsiveness of Striatal Projection Neurons to Cortical Stimulation. *J Pharmacol Exp Ther* **328**, 785–795.
- Threlfell S & West AR (2013). Review: Modulation of striatal neuron activity by cyclic nucleotide signaling and phosphodiesterase inhibition. *Basal Ganglia* **3**, 137–146.
- Tong J, Fitzmaurice PS, Ang LC, Furukawa Y, Guttman M & Kish SJ (2004). Brain dopamine-stimulated adenylyl cyclase activity in Parkinson's disease, multiple system atrophy, and progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol* **55**, 125–129.
- Valjent E, Bertran-Gonzalez J, Herve D, Fisone G & Girault JA (2009). Looking BAC at striatal signaling: cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends Neurosci* **32**, 538–547.
- Valtcheva S, Paillé V, Dembitskaya Y, Perez S, Gangarossa G, Fino E & Venance L (2017). Developmental control of spike-timing-dependent plasticity by tonic GABAergic signaling in striatum. *Neuropharmacology* **121**, 261–277.
- Voorn P, Kalsbeek A, Jorritsma-Byham B & Groenewegen HJ (1988). The pre- and postnatal development of the dopaminergic cell groups in the ventral mesencephalon and the dopaminergic innervation of the striatum of the rat. *Neuroscience* **25**, 857–887.
- West AR & Grace AA (2004). The nitric oxide-guanylyl cyclase signaling pathway modulates membrane activity states and electrophysiological properties of striatal medium spiny neurons recorded in vivo. *J Neurosci* **24**, 1924–1935.
- West AR & Tseng KY (2011). Nitric Oxide-Soluble Guanylyl Cyclase-Cyclic GMP Signaling in the Striatum: New Targets for the Treatment of Parkinson's Disease? *Front Syst Neurosci* **5**, 55.
- Xie Z, Adamowicz WO, Eldred WD, Jakowski AB, Kleiman RJ, Morton DG, Stephenson DT, Strick CA, Williams RD & Menniti FS (2006). Cellular and subcellular localization of PDE10A, a striatum-enriched phosphodiesterase. *Neuroscience* **139**, 597–607.
- Yapo C, Nair AG, Clement L, Castro LR, Hellgren Kotaleski J & Vincent P (2017). Detection of phasic dopamine by D1 and D2 striatal medium spiny neurons. *J Physiol* **595**, 7451–7475.

4.5 – Pharmacologie des récepteurs à la dopamine

L'étude de la dynamique de la voie de signalisation AMPc/PKA par imagerie de biosenseurs FRET est réalisée au sein de l'équipe depuis plusieurs années. Ces études ont dans un premier temps été réalisées chez le souriceau, âgé entre 7 et 12 jours, puis chez l'adulte (sham, hémi-parkinsonien ou dyskinétique). Un protocole a été mis en place par Lorna Clément et Cédric Yapo, qui permet l'identification des MSNs D1 et D2, par ailleurs morphologiquement identiques (Yapo et al., 2017). Ce protocole s'applique très bien chez le souriceau. Toutefois, chez les souris adultes, nous avons rencontré plusieurs difficultés et incohérences que je souhaiterais exposer dans ce chapitre. Certaines expériences exploratoires (et n'ayant pas forcément atteint un nombre de répétitions suffisant permettant une analyse statistique) ont été réalisées dans le but de mieux comprendre ces incohérences. Certaines observations demeurent sans explication aujourd'hui ; elles n'en sont toutefois pas moins importantes, et seront peut-être comprises à l'avenir par la poursuite d'autres projets.

4.5.1 – Reproduction du protocole D1/D2 chez l'adulte

Bien que le projet réalisé chez l'adulte se focalise principalement sur les MSNs D1 et leur hyper-activation dans les dyskinésies, nous avons souhaité tester chez les souris sham le protocole permettant d'identifier les MSNs D1 et D2.

Pour identifier les MSNs D1, l'agoniste spécifique des récepteurs D₁, le SKF-81297, est ajouté dans le bain, ce qui active la voie AMPc/PKA spécifiquement dans ces neurones. Les corps cellulaires des cellules dont le ratio augmente significativement sont alors considérés comme des MSNs D1. Quelque soit le modèle adulte utilisé (sham, parkinsonien ou dyskinétique), l'agoniste des récepteurs D₁ conduit à une augmentation des niveaux d'AMPc et une activation de la PKA, nous permettant d'identifier les MSNs D1. Une augmentation de l'activité de la PKA suite à l'application du SKF-81297 a également été observée dans une autre étude sur préparations de tranches de cerveau (Mariani et al., 2019), ainsi qu'*in vivo* (Jones-Tabah et al., 2020; Ma et al., 2022).

Concernant les MSNs D2, leur identification par application d'un agoniste des récepteurs D₂ est possible uniquement sur un niveau déjà élevé d'AMPc. C'est pourquoi l'identification des MSNs D2 est faite via les récepteurs à l'adénosine de type A_{2A}. Pour cela, nous utilisons un agoniste de ces récepteurs, le CGS-21680, pour augmenter les niveaux d'AMPc spécifiquement dans les MSNs D2. Toutefois, chez l'adulte sham, l'application du CGS-21680 ne modifie pas les niveaux d'AMPc des MSNs non-D1 (figure 17A). Cette expérience a été répétée 19 fois, sans jamais montrer de réponse au CGS. Ces résultats entrent en contradiction avec ceux obtenus par Mariani et al., où le CGS

induit une augmentation de l'activité PKA chez 50 % des neurones (Mariani et al., 2019). Cependant, lorsque les niveaux d'AMPC sont augmentés par la forskoline dans MSNs, l'application de l'agoniste des récepteurs D₂, quinpirole, diminue efficacement la réponse dans la sous-population des MSNs qui ne répond pas à l'agoniste des récepteurs D₁, SKF-81297 (Figure 17B). Cela confirme la ségrégation des MSN D1 et D2.

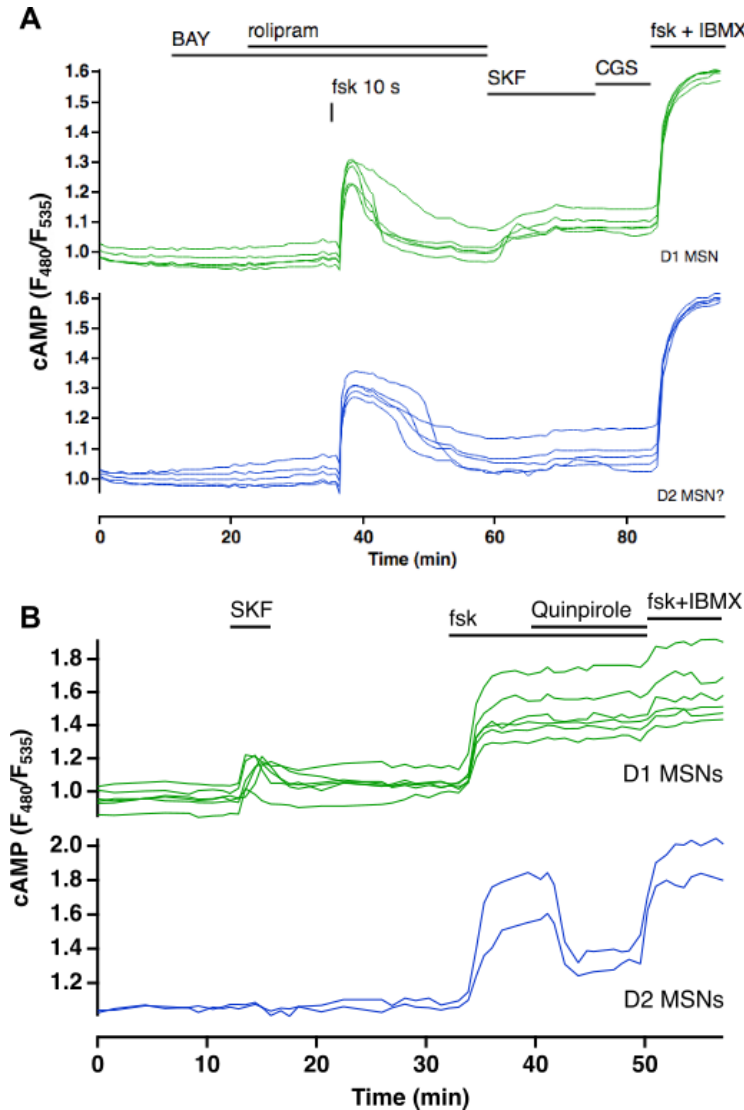


Figure 17 : Identification des MSNs D1 et D2 chez l'adulte contrôlé. Tranches de cerveau de souris adultes contrôlés exprimant le biosenseur Epac-S^{H150}. (A) Imagerie plein champ. Chaque trace du graphique indique le ratio donneur/accepteur (F₄₈₀/F₅₃₅) d'une région de champ d'acquisition correspondant à un neurone. La réponse à la forskoline transitoire est caractéristique d'une réponse des MSNs. Le SKF-81297 augmente le ratio dans les MSNs D₁. Toutefois, l'application de CGS ne modifie pas le ratio des autres neurones. Tous les neurones répondent positivement à l'application de forskoline et IBMX. (B) Imagerie bi-photonique. L'activité des AC est stimulée par la forskoline et augmente les niveaux d'AMPC dans les MSNs. L'activation des récepteurs D₂ par le quinpirole diminuent cette réponse AMPC spécifiquement dans les MSNs D₂. Les MSNs D₁ sont identifiés par la réponse positive à l'agoniste des récepteurs D₁, SKF-81297.

4.5.2 – Activation du récepteur D₁

Afin d'étudier l'intégration de la réponse à la dopamine par les MSNs D₁, nous stimulons les récepteurs à la dopamine en utilisant de la dopamine dans le bain ou de la dopamine « cagée » que nous libérons par un flash de lumière UV. La dopamine cagée permet de simuler une libération de dopamine phasique dans le striatum. Il est important de noter que la libération de dopamine perdure environ une centaine de secondes dans la chambre de perfusion, tandis que la libération phasique suite à une rafale de potentiels d'action des neurones dopaminergiques dure seulement quelques secondes (Day et al., 2007; Yapo et al., 2017). Lors de l'étude de la réponse AMPc/PKA pendant une activation maintenue des récepteurs, nous appliquons la dopamine en continu. Cette dopamine continue ne peut être comparée à la dopamine tonique puisque nous utilisons des concentrations supérieures à la dopamine tonique. A la fin du protocole, nous utilisons l'agoniste des récepteurs D₁ pour identifier spécifiquement les MSNs D₁.

La dopamine et le SKF-81297 agissent sur le même site de liaison du récepteur D₁. A l'inverse d'autres composants SKF (comme le SKF-83959), le SKF-81297 est considéré comme un agoniste total du récepteur. Ainsi, nous nous attendions à une réponse AMPc similaire lors de l'utilisation de la dopamine ou du SKF-81297. Cependant, nous remarquons, aussi bien au niveau de l'AMPc que de l'activité de la PKA, que l'activation des récepteurs D₁ par la dopamine (transitoire ou continue) ou le SKF-81297 ne conduit pas au même niveau d'activation (figure 19). Globalement, nous observons une augmentation de la réponse lors de l'application du SKF-81297 chez le souriceau en comparaison à la dopamine transitoire ou continue, aussi bien au niveau de l'AMPc que de l'activité PKA (figure 19, 1^{ère} ligne). Chez l'adulte sham, la réponse est également significativement augmentée lors d'une application de dopamine transitoire. Une tendance similaire est observée au niveau de l'activité de la PKA, en dopamine transitoire ou continue (figure 19, 2^{ème} ligne). A l'inverse, chez le modèle murin parkinsonien ou dyskinétique, il n'y a de différence significative entre une application de dopamine et de SKF (figure 19, 3^{ème} et 4^{ème} ligne). La variabilité de réponse semble toutefois plus importante.

L'application de la dopamine transitoire active les récepteurs pendant un temps très bref, en comparaison à la dopamine continue ou au SKF-81297. Un temps d'application court peut ainsi limiter l'activation de la voie AMPc/PKA. D'ailleurs, dans une précédente étude de l'équipe, l'amplitude de la réponse transitoire à la dopamine (avec des concentrations de 0,01 à 10,0 µM) a été quantifiée en fonction de la réponse au SKF-81297 (100 nM). La courbe dose-réponse montre que la stimulation transitoire des récepteurs D₁ atteint une réponse maximale correspondant à 80 % de la réponse au SKF (Yapo et al., 2017). La réponse à la dopamine transitoire ne permet donc pas d'obtenir

la réponse maximale des récepteurs D₁. Cela peut expliquer la différence d'amplitude entre la réponse à la dopamine « cagée » et celle au SKF-81297.

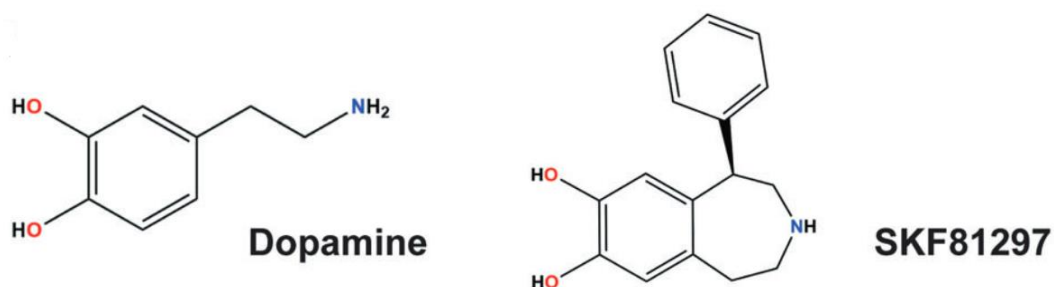


Figure 18 : structure chimique de la dopamine et du SKF-81297 (figure reprise de Zhuang et al. 2021).

Concernant la différence entre la réponse au SKF-81297 et la réponse à la dopamine continue, cela peut, d'une part, s'expliquer par une affinité du SKF-81297 pour le récepteur D₁ supérieure à celle de la dopamine. Une étude par cristallographie a d'ailleurs montré que le groupe benzène du SKF-81297 (groupe non présent sur la dopamine) (figure 18) établit quatre liaisons supplémentaires lui conférant une affinité légèrement supérieure à la dopamine (Zhuang et al., 2021). D'autre part, chez le modèle dyskinétique, l'application de deux doses de SKF-81297 (100 nM et 1 µM) induit une augmentation similaire des niveaux d'AMPC, montrant qu'une dose de 100 nM de SKF-81297 correspond à une dose saturante dans ce modèle. Cela suppose une activation de tous les récepteurs à la dopamine. A l'inverse la concentration de dopamine à 1 ou 3 µM n'est pas saturante, suggérant qu'une fraction des récepteurs à la dopamine n'est pas activée. Ceci pourrait expliquer une activation moins importante de la voie AMPC/PKA. De plus, il n'est également pas à exclure que le SKF-81297 puisse traverser la membrane plasmique et activer des récepteurs à la dopamine internalisés. Les résultats obtenus lors de la réponse à la dopamine (10 µM) chez l'adulte sham sont discutés dans le paragraphe suivant.

Il est important de noter que l'application du SKF-81297 est toujours réalisée à la fin du protocole. Avant cette application, les cellules ont donc été exposées à diverses drogues pharmacologiques (les données montrées ici proviennent de protocoles différents où divers agents pharmacologiques ont été testés). Ainsi, il est possible que ces diverses stimulations modifient la réponse au SKF-81297, soit par une modification de la sensibilité du récepteur, soit par une modification de la voie de signalisation AMPC/PKA. Cependant, dans certains de nos protocoles, nous réalisons trois libérations successives de dopamine transitoire et aucune variation des réponses à la dopamine ne se produit. Ainsi il est peu probable que la réponse au SKF-81297 appliqué en fin de protocole soit modifiée par les stimulations précédentes.

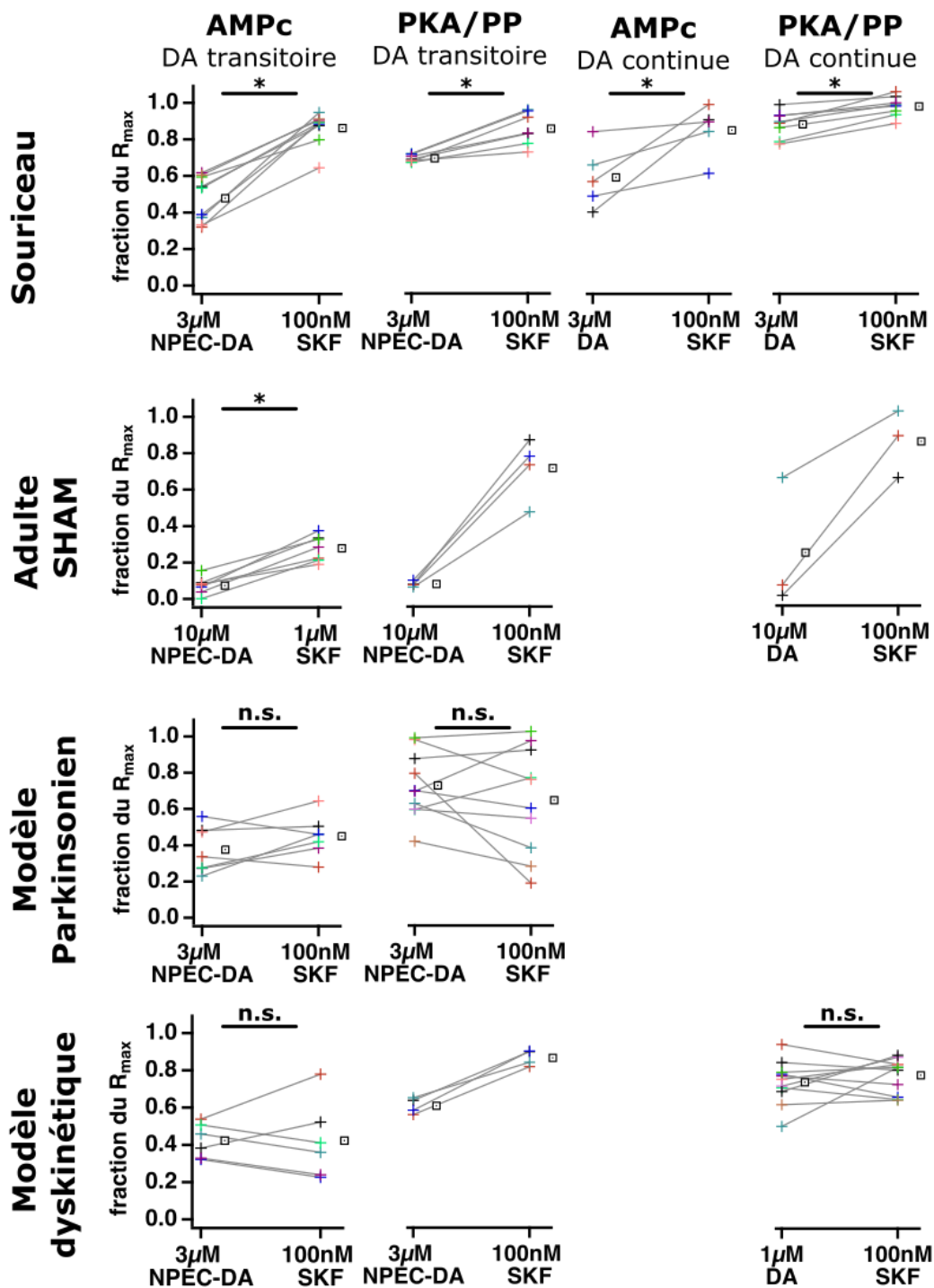


Figure 19 : Activation des récepteurs D₁ par la dopamine ou le SKF-81297 chez le souriceau et le modèle murin adulte (sham), parkinsonien et dyskinétique. Chaque graphique montre, pour l'AMPc (avec le biosenseur Epac-S^{H150}) ou l'activité PKA (avec le biosenseur AKAR4) l'amplitude de la réponse lors d'une application de dopamine transitoire (NPEC-DA, 3 ou 10 μM) ou continue (1, 3 ou 10 μM) *versus* la réponse au SKF-81297 appliqué en fin de protocole pour identifier les MSNs D1. Les réponses sont normalisées entre le R_{min} et le R_{max}. Pour chaque stimulation, la moyenne de toutes les répétitions est représentée par un carré. Lorsque le nombre de répétitions est supérieur à 4, un test statistique de Wilcoxon a été fait. n.s. = non significatif ; * statistiquement différent.

4.5.3 – Faible réponse à la dopamine chez les souris sham

Les réponses à la dopamine transitoire mesurées chez l'adulte sham sont très faibles, aussi bien au niveau de l'AMPC que de la réponse PKA. Pourtant, l'amplitude de la réponse au SKF-81297 est importante et nous permet d'identifier les MSNs D1. Dans une autre étude, l'utilisation d'AKAR3 en imagerie biphotonique chez l'adulte sain montre également une augmentation de l'activité PKA lors de l'application de l'agoniste des récepteurs D₁ (Mariani et al., 2019). Nous avons essayé de mieux comprendre la différence de réponse entre la dopamine et l'agoniste des récepteurs D₁ (SKF-81297) chez l'adulte sham.

Chez l'adulte, la dopamine extracellulaire est rapidement recapturée par les transporteurs DATs présents sur les afférences dopaminergiques et peut expliquer la faible réponse à la dopamine transitoire. D'ailleurs, une étude par microdialyse montre que l'inhibition de la recapture de la dopamine augmente les niveaux extracellulaires de dopamine jusqu'à atteindre des niveaux semblables à ceux des modèles murins hémiparkinsoniens (Abercrombie et al., 1990). Pour tester cette hypothèse, nous avons mesuré la réponse à la dopamine chez l'adulte sham en présence d'inhibiteurs des transporteurs DAT. Les réponses chez l'adulte étant faibles, nous avons réalisé le protocole avec le biosenseur AKAR4 présentant une meilleure sensibilité. Une première libération transitoire de dopamine (NPEC-DA, 10 µM) conduit à une faible augmentation de l'activité PKA (figure 20B). Après une récupération de 10 à 15 minutes, nous avons appliqué deux inhibiteurs de la recapture de la dopamine (Désipramine, 1 µM, et GBR12783, 1 µM). Ces inhibiteurs ne modifient pas le niveau de base de l'activité PKA. La libération transitoire de dopamine (10 µM) en présence de ces inhibiteurs conduit à une augmentation de l'activité de la PKA (figure 20B). A la fin du protocole, l'agoniste sélectif des récepteurs D₁ (SKF-81297, 100nM) est appliqué afin d'identifier sélectivement les MSNs D1, puis l'IBMX et la forskoline sont appliqués pour saturer le biosenseur. Ces résultats montrent que la faible réponse à la dopamine chez les souris sham est en partie causée par une recapture de la dopamine par les transporteurs DAT. Toutefois, lorsque nous comparons la réponse à la dopamine en présence des inhibiteurs de la recapture à la réponse à la dopamine chez le modèle parkinsonien (figure 20C), la réponse chez l'adulte sham demeure plus faible. Ces résultats sont cohérents avec les études montrant une hypersensibilité des MSNs D1 à la dopamine lors d'une lésion des neurones dopaminergiques. L'augmentation de la réponse à la dopamine chez les souris parkinsoniennes par rapport aux souris sham s'explique donc par une absence de recapture de la dopamine et une hypersensibilité des MSNs D1 dans ce modèle parkinsonien.

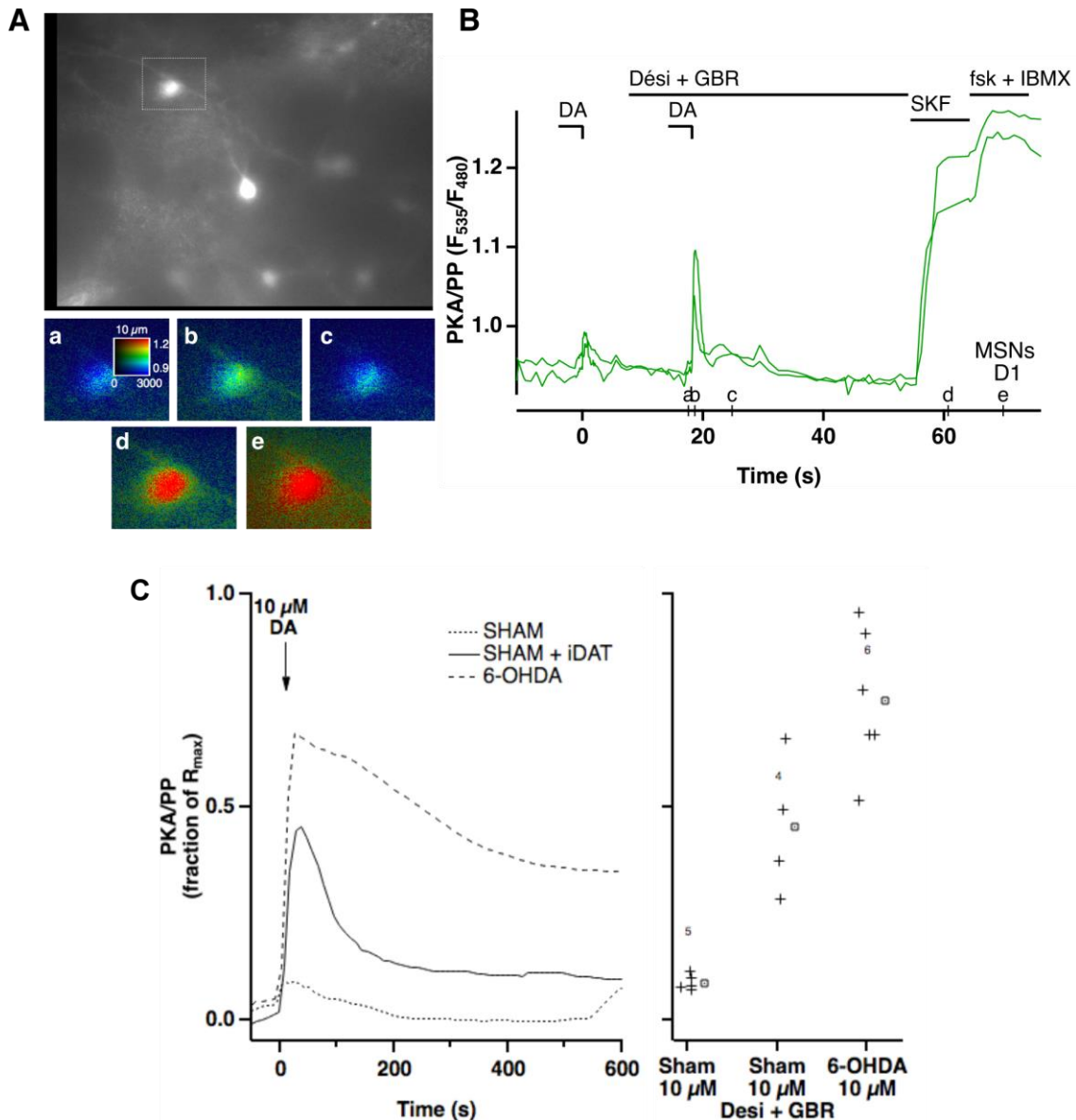


Figure 20 : l'inhibition de la recapture de la dopamine augmente la réponse à la dopamine transitoire chez le modèle murin contrôle. (A) Mesure de l'activité PKA avec le biosenseur AKAR4 dans des neurones du striatum dorso-médial d'une tranche de cerveau de souris adulte contrôle (SHAM) ou Parkinson (6-OHDA). Chaque trace du graphique indique le ratio accepteur /donneur (F_{535}/F_{480}) d'une région du champ d'acquisition. (B) A gauche : traces du ratio normalisée entre le ratio basal et le ratio maximal (application de fsk + IBMX). A droite : distribution de l'amplitude du signal du biosenseur AKAR4 lors d'une réponse transitoire à la dopamine ($10 \mu\text{M}$) chez le sham (+/- inhibiteurs des DAT) et le modèle Parkinsonien (6-OHDA), normalisée au R_{max} . Desi (désipramine) et GBR sont des inhibiteurs des DAT.

5 – DISCUSSION GENERALE

La physiologie des neurones est gouvernée par une multitude de voies de signalisation qui interagissent entre elles et permettent d'intégrer un grand nombre de signaux extracellulaires. Les dynamiques de ces voies de signalisation sont à la base des changements électriques des neurones. Ainsi, il est primordial de mieux comprendre le fonctionnement de chacune de ces voies et leurs interactions. L'imagerie de biosenseurs rend compte de ces dynamiques et nous permet ainsi d'étudier les différentes protéines impliquées dans la régulation de ces voies de signalisation, en particulier la voie AMPc/PKA, NO/GMPc et calcium. Nous nous sommes particulièrement intéressés au rôle fonctionnel des PDE dans la régulation des niveaux d'AMPc dans les MSNs D1 et D2 et dans les ChIN. Nous avons mis en évidence un rôle différentiel des PDE dans ces populations neuronales. La PDE10A est nécessaire à l'intégration du signal dopaminergique dans les MSNs D1 et D2, tandis que la PDE2A et PDE4 modulent l'amplitude de cette réponse. Dans les ChIN, ce sont préférentiellement les PDE1A, PDE3A et PDE4 qui régulent les niveaux d'AMPc. Nous avons également mis en évidence un rôle opposé du NO dans les MSNs et ChIN : il favorise l'hydrolyse de l'AMPc dans les MSNs via la PDE2A tandis qu'il inhibe la PDE3A dans les ChIN en faveur d'une augmentation des niveaux d'AMPc. Dans un modèle murin de la maladie de Parkinson et des LID, l'effet du NO sur les MSNs est efficace pour réduire la réponse hypersensible à la dopamine, suggérant que la stimulation de la PDE2A pourrait constituer un nouveau mécanisme d'action pour traiter les LID.

5.1 – L'évolution de la réponse à la dopamine, du jeune jusqu'à l'état parkinsonien

L'imagerie de biosenseurs FRET nous a permis de suivre, spécifiquement dans les MSNs D1, la dynamique de l'AMPc et l'activité PKA lors d'une stimulation transitoire de dopamine chez quatre modèles murins : modèle jeune, adulte sain, parkinsonien et dyskinétique. Nous avons ainsi mis en évidence une réponse différente entre le modèle jeune, le modèle adulte et l'état parkinsonien.

5.1.1 – Maturation du striatum entre les premières semaines post-natales et l'âge adulte

Chez le souriceau, une stimulation transitoire par la dopamine conduit à une augmentation des niveaux d'AMPc et de l'activité PKA. A l'inverse, la réponse à la dopamine transitoire chez l'adulte contrôle demeure très faible, aussi bien au niveau de l'AMPc que de l'activité PKA. Ces différences peuvent notamment s'expliquer par une

maturation du striatum. Plusieurs études ont reporté des changements morphologiques et électrophysiologiques des neurones dopaminergiques de la SNc et des MSNs pendant les trois premières semaines post-natales chez les rongeurs (Lieberman et al., 2018; Tepper et al., 1998; Tepper and Trent, 1993; Valtcheva et al., 2017; Voorn et al., 1988), correspondant à la période pendant laquelle nous réalisons l'imagerie de biosenseurs (entre P7 et P12). C'est seulement à partir de la 4^{ème} semaine post-natale que le système acquiert des caractéristiques semblables à celles retrouvées à l'âge adulte (Tepper et al., 1998; Voorn et al., 1988). Pendant cette période juvénile, les MSNs se trouvent dans un état hyper-excitabile avant d'évoluer vers leur état mature (Lieberman et al., 2018). Cette maturation est dépendante de l'activation des récepteurs par la dopamine et est associée à une modération de la réponse des MSNs à la dopamine (Kim et al., 2000; Lieberman et al., 2018). En absence de dopamine, la voie AMPc/PKA, en aval du récepteur, présente une sensibilité exacerbée (Kim et al., 2000). Lorsque nous réalisons l'imagerie de biosenseurs chez la souris juvénile, nous nous situons dans cette période critique, où les MSNs se trouvent encore dans un état immature. L'amplitude de la réponse à la dopamine mesurée chez le souriceau correspond donc à un état immature, tandis que la faible réponse à la dopamine mesurée chez l'adulte correspond à un système mature.

D'autres modifications moléculaires ont lieu au cours de la vie, notamment des changements d'expressions protéiques. L'AC1 est fortement exprimée pendant les premières semaines de vie dans le striatum, tandis que l'AC5 prédomine à l'âge adulte (Matsuoka et al., 1997; Nicol et al., 2005). L'expression de la DARPP-32 évolue également entre les semaines post-natales et l'âge adulte : son expression est forte et croissante de la naissance jusqu'à la troisième semaine post-natale, puis décroît ensuite jusqu'à l'âge adulte. La décroissance mesurée n'est pas causée par une diminution du nombre de neurones du striatum exprimant la DARPP-32, mais par une diminution du niveau d'expression de l'ARNm de la DARPP-32 (Gustafson et al., 1992). De la même manière, le niveau d'expression de certaines PDE évolue jusqu'à l'âge adulte (Kelly et al., 2014). Toutefois, dans le striatum, aucune modification de l'expression des PDE2A, PDE4 et PDE10A n'a été mesurée. L'expression des PDE essentielles à l'intégration du signal dopaminergique ne semble donc pas affectée par des variations d'expression au cours de la vie.

L'ensemble de ces données montre l'importance du choix du modèle d'étude. Les études réalisées chez le souriceau sont essentielles pour une meilleure compréhension du fonctionnement cellulaire et moléculaire chez le jeune. Ces connaissances peuvent ensuite être utilisées dans le cas de pathologies juvéniles. D'un point de vue technique, l'imagerie sur tranche de cerveau de souriceau est également plus simple à mettre en

place, en comparaison à l'imagerie sur tranche de cerveau d'adulte. Ces études permettent d'affiner les connaissances générales de la régulation des voies de signalisation et de définir les propriétés cellulaires lors de l'intégration de la réponse à un signal (dans notre cas, le signal dopaminergique). Ces données peuvent aider à la mise en place de modèles mathématiques permettant une approche du fonctionnement du striatum dans sa globalité, comme cela a été fait pour souligner la spécificité du signal PKA/PP dans le striatum (Yapo et al., 2018).

5.1.1 – L'état Parkinsonien : un retour à l'état juvénile ?

La réponse à la dopamine transitoire chez le modèle Parkinson est plus importante que chez le modèle contrôle. Nous pouvons également remarquer que la réponse chez le modèle Parkinson est semblable à celle mesurée chez le souriceau. Chez le modèle murin adulte, la réponse à la dopamine est dépendante de la recapture de la dopamine par les DATs et de l'intégration du signal dopaminergique par le couplage récepteur $D_1/G_{\text{olf}}/AC5$. Nous avons observé une augmentation de la réponse à la dopamine transitoire chez le modèle parkinsonien en comparaison au contrôle. Cette observation est cohérente avec la perte des terminaisons dopaminergiques qui entraîne une diminution de la recapture de la dopamine par les DATs (Abercrombie et al., 1990) et le développement d'une réponse hypersensible des MSNs à la dopamine (Alcacer et al., 2012; Jones-Tabah et al., 2020; Mariani et al., 2019). Cette réponse hypersensible à la dopamine ainsi que l'absence de recapture de la dopamine par les afférences dopaminergiques sont comparables à la situation dans le modèle juvénile, laissant penser que l'état parkinsonien correspond à un retour vers un état immature. D'autres observations faites sur les MSNs et les neurones dopaminergiques de la SNc montrent une situation similaire entre le modèle juvénile et le modèle de la maladie de Parkinson. Une similarité dans la morphologie des MSNs est observée : la lésion des neurones dopaminergiques conduit à une réduction de la longueur des dendrites et de la densité des épines dendritiques (Fieblinger et al., 2018; Gagnon et al., 2017; Nishijima et al., 2014; Villalba et al., 2009; Zaja-Milatovic et al., 2005) donnant lieu à une morphologie similaire à celle rencontrée pendant les trois premières semaines post-natales (peu de ramifications et une faible densité d'épines dendritiques) (Tepper et al., 1998; Tepper and Trent, 1993). En plus de la morphologie, une augmentation globale d'excitabilité des MSNs se produit dans les modèles de la maladie de Parkinson (Chen et al., 2001; Liang et al., 2008; Schultz and Ungerstedt, 1978; Tseng et al., 2001), correspondant à l'état électrique retrouvé dans le modèle juvénile (Lieberman et al., 2018). La présence de dopamine semble essentielle pour la maturation de la réponse à la dopamine des MSNs et son maintien, ainsi que le maintien de l'arborescence dendritique des MSNs. De la

même manière, une étude montre un changement de contributions des canaux ioniques responsables de l'activité autonome des neurones dopaminergiques de la SNc dans la maladie de Parkinson, vers une situation similaire à celle présente chez le souriceau (Chan et al., 2007). Effectivement, l'activité autonome, dépendante du courant des canaux calciques Cav1.3 chez l'adulte sain, repose désormais sur le courant des canaux Na⁺ et HCN dans la maladie de Parkinson (Chan et al., 2007), ces derniers étant responsables de l'activité pacemaker autonome des neurones dopaminergiques de la SNc chez le juvénile. L'ensemble de ces données met en évidence un retour à l'état immature dans le fonctionnement des MSNs lorsque les niveaux de dopamine diminuent. En fonction de la présence ou absence de dopamine, l'ensemble du système semble s'adapter à la situation. Cela explique qu'en cas de dégénérescence des neurones dopaminergiques, les symptômes moteurs se développent seulement lorsque la diminution des niveaux de dopamine est supérieure à 70 %.

5.2 – Les PDE striatales responsables de la temporalité du signal AMPc dans les MSNs et ChIN

Les niveaux d'AMPc dépendent de la production par les AC et de leur dégradation par les PDE. Ainsi, le couplage des récepteurs aux AC et leur stimulation, ainsi que la localisation sous-cellulaire des PDE représentent des paramètres déterminants dans les variations spatio-temporelles des niveaux d'AMPc intracellulaires.

Nos résultats mettent en évidence la spécificité fonctionnelle des différentes PDE exprimées dans les MSNs et les ChIN par l'étude dynamique de l'AMPc par imagerie de biosenseurs. Plus précisément, quatre PDE (PDE1B, PDE2A, PDE4, PDE10A) dans les MSNs et trois PDE (PDE1A, PDE3A et PDE4) dans les ChIN sont impliquées dans l'hydrolyse des seconds messagers. On peut se demander la raison pour laquelle trois ou quatre types de PDE sont exprimés au sein d'une même cellule. Toutes ont la capacité d'hydrolyser l'AMPc, mais chaque PDE possède des caractéristiques propres lui conférant un rôle spécifique dans la régulation de l'AMPc intracellulaire. La voie AMPc/PKA étant impliquée dans de nombreuses pathologies (*e.g.* maladies neuropsychiatriques et neurodégénératives, maladies cardiovasculaires...), il est nécessaire de mieux comprendre le rôle spécifique de chacune de ces PDE dans la régulation des seconds messagers. La structure moléculaire de ces enzymes permettant la conception de ligands avec une haute affinité, plusieurs inhibiteurs spécifiques à chaque PDE sont aujourd'hui disponibles et permettent de cibler l'activité d'une PDE, sans modifier l'activité des autres PDE. Ces inhibiteurs sont autant d'outils à notre disposition pour étayer et approfondir la compréhension du rôle des PDE et mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques. Plusieurs essais cliniques ciblant les PDE

sont en cours concernant des pathologies du système nerveux central, principalement les déficits cognitifs (Sanders and Rajagopal, 2020).

L'imagerie de biosenseurs nous a permis d'étudier le rôle fonctionnel des PDE dans l'intégration du signal dopaminergique dans les MSNs, et cette étude a fait l'objet d'une publication (É. Mota et al., 2021). Le rôle fonctionnel de la PDE1B avait fait l'objet d'une étude précédente au sein de l'équipe (Betolngar et al., 2019), celle-ci a été exclue de notre étude. Par ailleurs, il est important de noter que son activité est dépendante du calcium, absent dans nos conditions expérimentales. Ainsi, la PDE1B n'entre pas en jeu dans notre étude. Les études dynamiques de la voie AMPc/PKA dans les ChIN étant à un stade moins abouti que dans les MSNs, l'imagerie de biosenseur a permis de caractériser les PDE responsables de la dégradation de l'AMPc dans les ChIN.

5.2.1 – Les PDE10A, PDE4 et PDE2A déterminent la dynamique de la réponse transitoire à la dopamine dans les MSNs

5.2.1.1 – Régulation des niveaux d'AMPc en réponse à la dopamine par les PDE

Dans le striatum, une rafale de potentiels d'action des neurones dopaminergiques conduit à une libération de dopamine phasique, correspondant à une libération brève, de l'ordre de quelques secondes (Day et al., 2007; Patriarchi et al., 2018). Le signal dopaminergique agit de manière opposée chez les deux sous-populations de MSNs. Un projet précédent au sein de l'équipe a permis de mettre en place un protocole de libération transitoire de dopamine et ainsi de simuler la libération de la dopamine phasique. Cette libération transitoire perdure environ une centaine de secondes dans la chambre de perfusion, son temps d'action est donc supérieure à celui de la dopamine phasique (Yapo et al., 2017), mais permet néanmoins d'étudier des aspects dynamiques de l'intégration du signal dopaminergique. Dans les MSNs D1, la libération transitoire de dopamine conduit à une augmentation des niveaux d'AMPc, suivie d'un retour au niveau de base (Yapo et al., 2017). L'activité des PDE est primordiale lors de cette seconde phase d'extinction du signal dopaminergique. Dans les MSNs D2, sur un niveau élevé d'AMPc, la libération phasique entraîne une diminution des niveaux d'AMPc, qui est également transitoire et suivie d'un retour au niveau d'AMPc précédant la stimulation dopaminergique (Yapo et al., 2017). Dans ce cas, l'activité des PDE est essentielle dans la première phase de réponse à la dopamine. Nous avons ainsi caractérisé le rôle des PDE10A, PDE2A et PDE4 dans les MSNs D1 et D2 lors de ces deux types de réponses transitoires à la dopamine. Nos résultats mettent en évidence un rôle fonctionnel spécifique pour chaque PDE striatale. Dans les deux situations, l'inhibition de la PDE10A supprime la réponse à la dopamine, montrant ainsi que son activité est nécessaire et

suffisante au maintien du contraste temporel de la réponse à la dopamine. Quant à l'activité des PDE2A et PDE4, elles modulent préférentiellement l'amplitude de cette réponse. Cette différence qualitative, entre la PDE10A d'une part et les PDE2A et PDE4 d'autre part, est cohérente avec les affinités respectives de ces PDE pour l'AMPC : la PDE10A présente une forte affinité pour l'AMPC ($K_m = 0,25 \mu\text{M}$) par rapport à l'affinité des PDE2A et PDE4 ($K_m = 30 \mu\text{M}$ et $5,5 \mu\text{M}$ respectivement) (Neves-Zaph, 2017) : la PDE10A régule les niveaux faibles d'AMPC tandis que les PDE2A et PDE4 régulent les niveaux élevés. Cela est cohérent avec nos résultats montrant que les niveaux de base sont régulés principalement par la PDE10A. L'inhibition des PDE2A ou PDE4 ne modifie pas les niveaux de base d'AMPC (c'est-à-dire sans stimulation), tandis que l'inhibition de la PDE10A augmente significativement ces niveaux ($\sim 35\%$ du R_{max} , soit $\sim 5 \mu\text{M}$ d'AMPC), confirmant le rôle de la PDE10A dans le maintien des niveaux de base d'AMPC (Polito et al., 2015; Russwurm et al., 2015; Sano et al., 2008). Des résultats similaires ont été retrouvés dans d'autres études réalisées sur tranche de cerveau de souris ($\sim 35\%$ du R_{max}) (Polito et al., 2015) ou sur prélèvement striatal d'un modèle de souris KO pour le gène de la PDE10A ($\sim 45\%$ du R_{max}) (Sano et al., 2008). De manière surprenante, nos résultats montrent que la PDE10A, en plus de réguler les niveaux de base d'AMPC, prend aussi en charge les concentrations plus élevées. Généralement, en enzymologie, l'enzyme de K_m le plus bas, avec un V_{max} faible, est saturée par le substrat lorsque celui-ci se trouve à une concentration élevée. Dans ces conditions, une autre enzyme, de K_m plus élevé avec un V_{max} plus élevé, prend en charge ces concentrations élevées. Ainsi, la modélisation sur la contribution des PDE en fonction de la concentration de dopamine suggère une faible contribution de la PDE10A ($< 30\%$) lors d'une forte concentration de dopamine ($10 \mu\text{M}$) (Neves-Zaph, 2017). Or, même lorsque les PDE2A et PDE4 sont inhibées, la PDE10A reste capable de prendre en charge une concentration élevée d'AMPC ($\sim 30 \mu\text{M}$ d'AMPC). L'hydrolyse de forte concentration d'AMPC par la PDE10A est donc possible seulement dans le cas d'une forte expression, comme cela a été reporté dans les MSNs (Nishi et al., 2008; Xie et al., 2006).

Les PDE2A et PDE4 participent à la régulation des niveaux élevés d'AMPC. Dans les MSNs D2, leur inhibition conduit à une augmentation des niveaux d'AMPC atteint par l'application de l'agoniste des récepteurs A_{2A} . Ainsi, lors d'une libération transitoire de dopamine, l'inhibition des PDE2A et PDE4 renforce l'amplitude du signal, aussi bien dans les MSNs D1 que D2. Ainsi, l'inhibition des PDE2A et PDE4 renforce le signal à la dopamine transitoire.

Lors d'une stimulation des récepteurs à la dopamine, la contribution de chaque PDE dans la régulation des niveaux d'AMPC ne semble pas différer entre les MSNs D1 et D2. Lorsque la dopamine est remplacée par une application brève (10s) de forskoline, cela

conduit à une activation globale des AC, et à une augmentation transitoire d'AMPc dans les MSNs D1 et D2. Toutefois, cette augmentation transitoire d'AMPc a une amplitude et une durée plus élevées dans les MSNs D2 que dans les MSNs D1. Cette différence d'amplitude est supprimée lors de l'inhibition non sélective des PDE (par l'IBMX) (Polito et al., 2013). Ainsi, lorsque l'AMPc est produit globalement par toutes les AC cellulaires, le rôle des PDE dans l'hydrolyse de l'AMPc diffère entre les deux populations de MSNs. Ces divergences suggèrent qu'en fonction du site de production de l'AMPc (production globale suite à l'activation de toutes les AC ou production locale suite à l'activation des récepteurs D₁/A_{2A}), la contribution des PDE dans la régulation des niveaux d'AMPc est différente.

5.2.1.2 – Conséquences de la régulation de l'AMPc par les PDE sur l'activité de la PKA

Lorsque la PDE10A est inhibée, les PDE2A et PDE4 ne sont pas capables de dégrader les niveaux d'AMPc en dessous de 5 µM, aussi bien dans les MSNs D1 (pour permettre le retour au niveau de base et la récupération après la libération transitoire de dopamine) que dans les MSNs D2 (pour atteindre le niveau de base après inhibition des cyclases par le récepteur D₂, lors de la libération transitoire de dopamine). La PKA ayant un seuil d'activation inférieur à des concentrations sub-micromolaires d'AMPc (Dostmann and Taylor, 1991), l'effet de l'inhibition de la PDE10A sur l'AMPc se répercute sur l'activité de la PKA, qui se trouve alors dans son état maximal d'activation. Même en absence de stimulation, l'inhibition de la PDE10A augmente l'AMPc à un niveau suffisant pour activer la PKA, ce qui est visualisé par la phosphorylation maximale du biosenseur AKAR4 sensible à l'activité de la PKA, et ce dans les deux populations de MSNs. Dans les MSNs D1, le biosenseur AKAR4 étant déjà saturé, la libération transitoire de dopamine ne produit pas d'augmentation supplémentaire du ratio. De plus, la phosphorylation de la DARPP-32 par la PKA agit comme un contrôle positif de la voie AMPc/PKA (Girault and Nairn, 2021), en faveur d'un maintien du niveau élevé de phosphorylation des cibles de la PKA dans le cytoplasme. L'ensemble de ces données est cohérent avec des études montrant que l'inhibition de la PDE10A ou la suppression du gène de la PDE10A conduit à une augmentation du niveau de phosphorylation de CREB, cible de la PKA (Becker and Grecksch, 2008; Rodefer et al., 2005; Sano et al., 2008; Siuciak et al., 2006).

Dans les MSNs D2 soumis à une activation tonique des récepteurs à l'adénosine, l'activation transitoire des récepteurs D₂ est trop brève pour permettre une dé-activation de la PKA (É. Mota et al., 2021; Yapo et al., 2017). L'action de la dopamine « cagée » libérée par un flash de lumière UV étant brève, il est probable que le temps d'application de la dopamine soit inférieur au temps nécessaire pour une déphosphorylation des cibles de la PKA (dont le biosenseur AKAR4) par les

phosphatases. La contribution fonctionnelle de la PDE10A a donc été testée lors d'une application continue de dopamine et donc dans une situation où l'arrêt de la production d'AMPC dure plusieurs minutes : dans cette condition, si la PDE10A est active, la dopamine tonique suffit à dé-activer la PKA, alors que si la PDE10A est inhibée, le niveau de phosphorylation des cibles de la PKA demeure maximal. Ceci suggère que les activités des PDE2A et PDE4 ne sont pas suffisantes pour prendre le relais et dé-activer la PKA. A l'inverse, l'inhibition des PDE2A et PDE4 n'empêche pas la dé-activation de la PKA lors d'une application continue de la dopamine. La PDE10A est donc essentielle pour hydrolyser les niveaux d'AMPC inférieurs à $\sim 5 \mu\text{M}$ et ainsi permettre une dé-activation de la PKA et donc un arrêt du signal AMPC/PKA, aussi bien dans les MSNs D1 que D2. Cela suggère que la PDE10A est critique pour déterminer la fenêtre temporelle d'action de la PKA. Or, cette fenêtre d'activation de la PKA est déterminante dans la mise en place de la potentiation synaptique. Lorsque le signal calcique précède le signal dopaminergique, cela conduit à un renforcement de l'activité de la CaMKII dépendant de la PKA (la PKA activée phosphoryle la DARPP-32 qui inhibe la PP1 inhibant ainsi la déphosphorylation des cibles de CaMKII) (Nair et al., 2016; Shindou et al., 2019; Urakubo et al., 2020; Yagishita et al., 2014). L'inhibition de la PDE10A désorganise cette fenêtre temporelle (Yagishita et al., 2014). Nos données appuient le fait que la PDE10A est essentielle pour maintenir le renforcement de la plasticité dans les épines dendritiques et le rôle des MSNs comme détecteur de coïncidence de l'activité dopaminergique et glutamatergique.

Les essais cliniques d'inhibiteurs de la PDE10A dans le traitement de la schizophrénie ou de la maladie de Huntington n'ont, jusqu'à aujourd'hui, pas abouti (Baillie et al., 2019; DeMartinis et al., 2019). Ces échecs ont principalement été causés par des effets secondaires trop importants. Notre étude démontre effectivement que l'inhibition de la PDE10A, dans les deux populations de MSNs, altère complètement la signalisation AMPC/PKA, aussi bien en absence de stimulation que lors d'une stimulation des récepteurs D₁ et D₂. Récemment, l'effet d'un inhibiteur de la PDE10A (PDM-042) sur les LID montre que la fenêtre thérapeutique est dépendante de la dose administrée (Guimarães et al., 2022). Seule une dose de 1 mg/kg de PDM-042 présente un effet anti-dyskinétique. A l'inverse, une dose de 3 mg/kg (seulement supérieure d'un facteur de trois) prolonge la durée des LID. Cela suggère qu'au-delà d'un certain seuil d'inhibition de la PDE10A, le niveau de phosphorylation dépendant de la PKA augmente et est maintenu pendant une période prolongée par l'action de la DARPP-32. La fenêtre thérapeutique est donc extrêmement étroite, ce qui complexifie la caractérisation d'une dose thérapeutique efficace, probablement variable en fonction de l'avancement de la maladie et des patients.

L'ensemble de ces résultats suggèrent un rôle important de l'ensemble des PDE dans la modulation de l'amplitude et de la temporalité de la réponse AMPc, deux facteurs déterminants les niveaux de phosphorylation des cibles de la PKA.

5.2.1.3 – La réponse à la dopamine : une réponse compartimentée ?

La PDE2A présente une faible affinité pour l'AMPc ($K_m = 30 \mu\text{M}$) (Neves-Zaph, 2017) et la stimulation de son activité par le GMPc ne modifie pas cette affinité, mais augmente la vitesse maximale de dégradation (Martinez et al., 2002; Martins et al., 1982), suggérant principalement une régulation des niveaux élevés d'AMPc. Il a d'ailleurs été montré que lors d'une activation globale et brève (10s) des AC (par la forskoline), l'inhibition de la PDE2A ne modifie pas la réponse à la forskoline (Polito et al., 2013). Pourtant, lors d'une stimulation transitoire des récepteurs à la dopamine, nos résultats montrent que l'inhibition de la PDE2A dans les MSNs D1 conduit à une augmentation de l'amplitude de la réponse. De plus, la stimulation de la PDE2A (par le DEANO) lors d'une activation partielle des récepteurs D_1 diminue l'activité de la PKA, tandis que les niveaux d'AMPc globaux demeurent faibles. Si l'affinité de la PDE2A pour l'AMPc est faible, cela suggère que l'activation partielle des récepteurs D_1 induit, localement, une forte augmentation des niveaux d'AMPc. Ces niveaux élevés localement ne sont pas détectés par le biosenseur Epac- $S^{\text{H}150}$ cytoplasmique, mais ils semblent être régulés par la PDE2A responsable de l'hydrolyse de concentrations élevées d'AMPc. Cela suggère une localisation de la PDE2A autour des récepteurs à la dopamine, renforçant l'idée des PDE comme barrière enzymatique en faveur de la formation de microdomaines. Localement, les PDE restreignent la diffusion de l'AMPc, mais n'empêchent pas la diffusion de la sous-unité catalytique de la PKA, localement activée. Ainsi, une augmentation locale d'AMPc conduit à une phosphorylation des cibles de la PKA dans le cytoplasme, telles que le biosenseur AKAR4. Cela est cohérent avec la modélisation de la signalisation AMPc/PKA dans les MSNs (Oliveira et al., 2012). Ce modèle montre que la concentration d'AMPc est très élevée à proximité de la source de production et que l'ancrage de la PKA sur le site de production d'AMPc est essentiel pour son activation. Une fois les sous-unités catalytiques libérées, elles diffusent dans le cytosol, et phosphorylent leurs cibles. Une autre modélisation mathématique montre également un effet important des PDE sur l'activité de la PKA dans des compartiments avec un haut ratio surface/volume (tels que les épines dendritiques). A l'inverse, l'inhibition des PDE dans le soma n'affecte pas l'activité de la PKA (Urakubo et al., 2020).

Les acteurs qui composent ces microdomaines (*e.g.* PDE, PKA...) déterminent alors la manière dont sont intégrés les signaux extracellulaires. Ces microdomaines semblent jouer un rôle dans la spécificité du signal intracellulaire. En fonction du type de stimulation, la concentration d'AMPc n'est pas homogène dans la cellule (Jurevicius and

Fischmeister, 1996; Nishi et al., 2008; Oliveira et al., 2012). Nos résultats suggèrent la formation de microdomaines proches des récepteurs à la dopamine. Plusieurs hypothèses tendent à expliquer la formation de ces microdomaines. D'une part, la variation du rapport surface/volume des neurones entre les dendrites et le corps cellulaire et la diffusion de l'AMPC peut en partie expliquer la formation de microdomaines dans les dendrites (Bacskai et al., 1993; Li et al., 2015; Neves et al., 2008; Nikolaev et al., 2004). D'autre part, plusieurs études suggèrent un rôle local des PDE, agissant comme barrière enzymatique (Castro et al., 2010; Gervasi et al., 2010; Neves et al., 2008). Nos observations sont cohérentes avec l'hypothèse des PDE comme barrière enzymatique des microdomaines d'AMPC (Jurevicius and Fischmeister, 1996; Lohse et al., 2017; Mongillo et al., 2004; Oliveira et al., 2012). Par ailleurs, l'imagerie bi-photonique permettrait d'améliorer la résolution spatiale et ainsi de mesurer les variations d'AMPC dans les dendrites et dans le soma, comme cela a déjà été fait dans les neurones pyramidaux corticaux (Castro et al., 2010).

La démonstration des PDE comme barrière enzymatique a généralement été démontrée par l'inhibition des PDE induisant une augmentation de l'AMPC dans le cytosol. Pourtant, nos résultats montrent que l'inhibition de la PDE2A chez le souriceau et chez le modèle parkinsonien et dyskinétique ne supprime pas la réponse transitoire à l'AMPC en réponse à la dopamine. Chez le souriceau, seule l'amplitude de la réponse est augmentée montrant un rôle de la PDE2A dans la régulation des niveaux élevés d'AMPC, tandis qu'aucune modification n'a lieu dans les modèles parkinsonien et dyskinétique. Cela suggère une prise en charge de l'hydrolyse de l'AMPC par les PDE10A et PDE4. Ainsi, il est probable que plusieurs PDE se trouvent à proximité des AC et restreignent l'augmentation de l'AMPC aux microdomaines.

5.2.2 – PDE3A et PDE4 responsables de l'hydrolyse de l'AMPC dans les ChIN

Les ChIN présentent une morphologie très différente de celle des MSNs et autres interneurones. Ainsi, l'imagerie de biosenseurs nous permet facilement de les identifier. Nous avons mis en évidence un rôle majeur de la PDE3A et PDE4 dans l'hydrolyse de l'AMPC. Lors d'une élévation de calcium intracellulaire, la PDE1A régule également les niveaux d'AMPC. Il est toutefois important de noter que l'identification des PDE3A et PDE4 s'est faite en présence d'une élévation de l'AMPC globale des ChIN par un activateur non spécifique des AC (forskoline). Effectivement, à l'état de base, les AC semblent peu actives dans ces interneurones et leur stimulation par une dose saturante de forskoline se traduit par une réponse AMPC/PKA plus lente que dans les MSNs.

Les ChIN expriment de nombreux récepteurs métabotropiques couplés à la voie AMPc/PKA. Parmi eux, ils expriment notamment les récepteurs à la dopamine de type D₂ et D₅, couplés de manière opposée à la voie AMPc/PKA. Or, une application de dopamine induit une dépolarisation des ChIN dépendante de l'activation des récepteurs de type D₁-like (D₅) (Aosaki et al., 1998). Il serait ainsi pertinent d'étudier le rôle fonctionnel des PDE identifiées dans l'intégration de la réponse à la dopamine. De plus, le récepteur D₅ a récemment été impliqué dans l'hyperexcitabilité des ChIN retrouvée chez le modèle murin des LID (Paz et al., 2021). Bien que la dynamique de la voie AMPc/PKA soit plus lente dans les ChIN que les MSNs, cette voie de signalisation semble importante dans la régulation de leur activité électrique.

5.3 – L'action opposée de la voie NO/GMPc dans les MSNs et ChIN : régulation de la fenêtre temporelle d'action de la dopamine

5.3.1 – PDE10A, PDE2A, PDE3A : au carrefour de la voie AMPc/PKA et NO/GMPc

Parmi les PDE identifiées, les PDE10A, PDE2A et PDE3B sont capables d'hydrolyser l'AMPc et le GMPc, et leur activité est modulée par le GMPc. Ainsi, ces PDE se trouvent à l'interface de deux voies de signalisation.

La PDE10A est essentielle dans la régulation de l'AMPc dans les MSNs. Nos résultats démontrent l'importance de la PDE10A dans la régulation des niveaux d'AMPc dans les MSNs. Cependant, l'hydrolyse du GMPc par la PDE10A fait l'objet de résultats divergents. Certaines études montrent que son inhibition ne modifie pas les niveaux de GMPc des MSNs (Polito et al., 2015; Russwurm et al., 2015) et que le modèle de souris KO pour la PDE10A ne présente pas de modification des niveaux de GMPc (Sano et al., 2008). A l'inverse d'autres études montrent une élévation des niveaux de GMPc dans les MSNs suite à l'inhibition de la PDE10A (Grauer et al., 2009; Fernando E. Padovan-Neto et al., 2015; Schmidt et al., 2008; Siuciak et al., 2006). L'action des inhibiteurs de la PDE10A sur le GMPc est dépendante de l'activité des interneurons NOergiques : dans un modèle KO pour la nNOS, l'inhibition de la PDE10A n'a plus d'effet sur le GMPc (Fernando E. Padovan-Neto et al., 2015; Siuciak et al., 2006). La stimulation des GC et la production du GMPc dans les MSNs sont donc dépendantes de la libération de NO par les interneurons NOergiques. En fonction des conditions expérimentales, l'activité de ces interneurons peut différer, expliquant les résultats divergents. Toutefois, Polito et al. montrent que l'inhibiteur de la PDE10A, en présence d'un donneur de NO, ne modifie

pas le niveau de GMPc (Polito et al., 2015). Il n'est pas à exclure que la forte concentration du donneur de NO utilisée conduise à une élévation trop importante du GMPc, si bien que l'activité de la PDE10A sur le GMPc n'est pas détectable. L'effet de la PDE10A devrait donc être testé sur différents niveaux de GMPc. Même si la PDE10A pourrait intervenir sur la voie NO/GMPc/PKG, l'ensemble des données actuelles suggère plutôt une contribution essentiellement dans la régulation de la voie AMPc/PKA. Par ailleurs, la PDE10A contient sur ses domaines régulateurs deux domaines GAF, semblables à ceux retrouvés sur la PDE2A (et les PDE5 et PDE6). Le domaine GAF-B de la PDE10A présente une haute affinité pour l'AMPc ($K_d = 48$ nM) (Matthiesen and Nielsen, 2009), mais les études suggèrent que la liaison de l'AMPc n'augmente pas ou peu l'activité catalytique de la PDE10A (Jäger et al., 2012; Matthiesen and Nielsen, 2009). Ces études ont toutes été conduites *in vitro* et, à notre connaissance, aucune modification de l'activité catalytique par liaison de l'AMPc au domaine GAF-B n'a été démontrée dans des neurones. La PDE10A ne semble donc pas être à l'interface de la voie AMPc/PKA et NO/GMPc.

Nos résultats montrent dans les MSNs un rôle de la PDE2A dans la régulation de l'amplitude la réponse AMPc lors d'une stimulation des récepteurs à la dopamine. Par ailleurs, l'imagerie du GMPc avec le biosenseur cyGNAL montre que l'inhibition de la PDE2A sur un niveau déjà élevé de GMPc (par stimulation des GC par le donneur de NO) augmente les niveaux de GMPc jusqu'au ratio maximal dans les MSNs (*cf.* 4.3 – figure 3). Ces données sont cohérentes avec d'autres études montrant un rôle majeur de la PDE2A dans la régulation des niveaux de GMPc (Polito et al., 2013; Wykes et al., 2002). La PKG étant faiblement exprimée dans le striatum (El-Husseini et al., 1999), cela suggère que la PDE2A pourrait être la cible principale du NO dans les MSNs. Ainsi la voie NO/GMPc agit comme un régulateur négatif de la voie AMPc/PKA lors d'une stimulation des récepteurs D₁. Nos résultats démontrent que cet effet est dépendant de la PDE2A. Par ailleurs, la diminution des niveaux d'AMPc suite à l'activation de la voie NO/GMPc induit une réduction de la sous-unité GluA1 des récepteurs AMPA exprimés à la surface (Song et al., 2016). Cet effet est annulé lors de l'inhibition de la PDE2A et est donc dépendant de la PDE2A. L'utilisation d'une PDE2A activable par lumière rouge (Gasser et al., 2014) montre que la stimulation de la PDE2A, indépendamment d'une augmentation de GMPc, est suffisante pour induire l'internalisation des récepteurs AMPA (Song et al., 2016). L'ensemble de ces données appuie le fait que la stimulation de la PDE2A, en régulant l'accessibilité des récepteurs AMPA à la membrane, pourrait contribuer à une réduction de l'activité électrique des MSNs.

Dans les ChIN, la PDE3A se trouve à l'interface entre la voie AMPc/PKA et NO/GMPc. La régulation de la voie NO/GMPc sur la PDE3A est toutefois inversée à celle observée dans

les MSNs sur la PDE2A. Le GMPc agit par compétition comme un inhibiteur de la PDE3A. L'augmentation des niveaux de GMPc favorise ainsi l'augmentation des niveaux d'AMPc. L'inhibition de la PDE3A affecte seulement les niveaux d'AMPc, mais ne modifie pas l'activité de la PKA. Or, il a été montré qu'une augmentation d'AMPc active les canaux I_h en faveur d'une dépolarisation des ChIN (DiFrancesco and Tortora, 1991) et qu'une libération de NO augmente l'excitabilité des ChIN (Blomeley et al., 2015). Ainsi nos résultats suggèrent que l'effet du NO sur l'excitabilité des ChIN est en partie médié par l'inhibition de la PDE3A.

5.3.2 – Les interneurones NOergiques modulent la fenêtre d'action de la dopamine

Dans le striatum, l'activité électrique des MSNs est modulée par les afférences glutamatergiques cortico- et thalamostriatales et par les afférences dopaminergiques de la substance noire et de l'aire tegmentale ventrale. Les MSNs agissent comme détecteurs de coïncidence de l'activité glutamatergique et dopaminergique. Cette activité est également modulée par plusieurs types d'interneurones striataux, notamment les interneurones NOergiques et les ChIN. Or, l'activité de ces deux populations d'interneurones est également modulée par les afférences glutamatergiques et dopaminergiques, suggérant une modulation « anticipatrice » (*feedforward*) de ces interneurones sur l'activité des MSNs (Centonze et al., 2003b). L'ensemble de ces interactions est responsable de l'activité électrique « sortante » des MSNs et donc de la modulation des voies de sortie des ganglions de la base. Ainsi, ces interactions sont impliquées dans les différentes fonctionnalités du striatum, telles que la mise en place de programmes moteurs, la sélection de l'action, l'apprentissage et le circuit de la récompense. Au cours des vingt dernières années, de nombreuses études tendent à mieux élucider l'intégration de ces informations par les MSNs afin de mieux comprendre le fonctionnement du striatum. Dans la suite de cette partie, je propose d'intégrer le rôle de la voie AMPc/PKA et sa modulation par le NO/GMPc lors d'une activité concomitante dopaminergique et glutamatergique, afin de proposer une hypothèse sur le rôle des voies de signalisation dans le fonctionnement du striatum.

La libération phasique de dopamine est associée à une pause de l'activité des ChIN (Aosaki et al., 2010; Morris et al., 2004; Straub et al., 2014), levant ainsi l'inhibition de l'ACh sur les MSNs D1 (Nair et al., 2015). Lorsque la libération phasique de dopamine coïncide avec une activité corticostriatale, l'activité électrique des MSNs D1 est augmentée (Kerr and Wickens, 2001; Pawlak and Kerr, 2008; Shen et al., 2008). En parallèle, l'activation concomitante des récepteurs D_1/D_5 et des récepteurs NMDA des interneurones NOergiques favorise la libération de NO (Park and West, 2009; Sammut

et al., 2007; West and Tseng, 2011). Le NO diffuse alors librement et active les GC, notamment dans les ChIN et les MSNs, en faveur d'une production de GMPc. Nos résultats montrent que l'action du NO sur l'AMPc est opposée dans les ChIN et les MSNs : le NO favorise la production d'AMPc dans les ChIN par inhibition de la PDE3A tandis qu'il favorise l'hydrolyse de l'AMPc dans les MSNs D1 par stimulation de la PDE2A. Or, l'augmentation et la diminution des niveaux d'AMPc est associée, respectivement, à une augmentation et diminution de l'activité électrique des neurones (Colwell and Levine, 1995; Sammut et al., 2010; Threlfell et al., 2009; West and Grace, 2004). Cela suggère que la libération de NO, médiée par une libération concomitante de dopamine et glutamate, favorise l'excitabilité des ChIN et défavorise celle des MSNs D1. Les interneurones NOergiques serviraient de modérateur direct (via la PDE2A) et indirect (via les ChIN et la PDE3A) des MSNs D1. En favorisant l'excitabilité des ChIN, cela contribue également à la libération d'ACh qui renforce l'inhibition des MSNs D1 via le récepteur M₄ (Nair et al., 2019). Cette hypothèse est cohérente avec une étude montrant que la libération de NO diminue l'activité des MSNs via une augmentation de l'activité des ChIN (Blomeley et al., 2015). Il est toutefois important de prendre en compte la dimension temporelle de l'ensemble de ces événements (comme le temps de synthèse du NO dans les interneurones NOergiques et la synthèse du GMPc dans les ChIN et MSNs). Plus d'études sont nécessaires pour comprendre la fenêtre temporelle d'action du NO et des modélisations mathématiques permettraient d'intégrer l'ensemble de ces informations. Dans la suite de cette partie, je souhaiterais développer un ensemble de données appuyant cette hypothèse concernant la fonction des interneurones NOergiques comme modulateurs directs et indirects des MSNs.

Plusieurs études montrent que l'augmentation de l'excitabilité des ChIN médiée par le NO est associée à une augmentation des niveaux de GMPc (Centonze et al., 2001; Guevara-Guzman et al., 1994; Prast et al., 1998). Nos résultats montrent que cette augmentation du GMPc inhibe, par compétition, la PDE3A, en faveur d'une augmentation des niveaux d'AMPc. Cette augmentation des niveaux d'AMPc dans les ChIN est également associée à une augmentation de l'activité électrique. L'ensemble de ces données suggère donc que l'activation des interneurones NOergiques, par une libération concomitante de dopamine et glutamate, favorise l'activité électrique des ChIN (précédemment inhibés par la dopamine) par une augmentation des niveaux de GMPc et d'AMPc. Ces données sont cohérentes avec la rafale de potentiel d'action observée après la pause des ChIN (Straub et al., 2014). Le rôle de ce « rebond » est encore méconnu, toutefois, une étude montre que ce rebond d'activité des ChIN coïncide avec une diminution de l'activité des MSNs (English et al., 2011). Par ailleurs, les ChIN étant impliqués dans la terminaison du mouvement (Gritton et al., 2019), il

serait pertinent d'étudier, *in vivo*, le rôle de l'opto-activation des NOergiques sur les ChIN et leur implication dans les comportements moteurs.

L'action du NO sur l'activité des MSNs demeure controversée. Certaines études montrent que la libération de NO augmente leur activité électrique (Ondracek et al., 2008; Sammut et al., 2007; Threlfell and West, 2013; West and Grace, 2004; West and Tseng, 2011) tandis que d'autres études montrent une diminution de l'activité électrique des MSNs (Calabresi et al., 2007; P. Calabresi et al., 1999b; Di Giovanni et al., 2003; Galati et al., 2008). L'effet du NO sur les MSNs semble donc différer en fonction des conditions expérimentales. Les résultats obtenus semblent dépendre de l'état du circuit neuronal (*ex vivo* ou *in vivo*) et du protocole de stimulation utilisé. De plus, l'effet des interneurons NOergiques est généralement simulé par une application de donneur de NO, ne reflétant pas le profil de décharge de ces interneurons. Il semblerait que le NO ait un rôle permissif vers une potentiation ou dépression en fonction de l'état d'excitabilité du MSNs (West and Tseng, 2011). L'activation par optogénétique des interneurons NOergiques a permis de mieux comprendre l'effet du NO sur les MSNs et appuie cette hypothèse (Fino et al., 2018; Rafalovich et al., 2015; Straub et al., 2016). Ainsi, l'opto-activation des interneurons NOergiques favorise la LTD des MSNs par un mécanisme d'internalisation des récepteurs AMPA (Rafalovich et al., 2015). Or, dans les MSNs, l'augmentation des niveaux de GMPc (par un donneur de NO ou par l'inhibition de la PDE1B) stimule la PDE2A en faveur d'une diminution des niveaux d'AMPc et d'une internalisation des récepteurs AMPA (Song et al., 2016). Ce mécanisme présents dans les MSNs est probablement contrebalancé en faveur d'une LTP lorsque les récepteurs à la dopamine et NMDA sont simultanément activés : l'entrée de calcium par les récepteurs NMDA active la PDE1B, qui hydrolyse le GMPc et facilite l'induction d'une LTP (Betolngar et al., 2019; Song et al., 2016). L'état initial du MSN et les stimuli qu'il reçoit (glutamate ou NO) favorisent soit une LTP ou LTD, mettant en jeu, respectivement, la PDE1B ou la PDE2A. La régulation des niveaux d'AMPc par la voie NO/GMPc et les PDE semble donc déterminante dans le contrôle de l'excitabilité des MSNs, c'est-à-dire des voies de sortie du striatum.

5.4 – La PDE2A : une nouvelle cible thérapeutique pour traiter les LID ?

5.4.1 – Implication de la PDE2A dans la régulation des mouvements

La lésion des neurones dopaminergiques conduit à de nombreuses adaptations moléculaires et cellulaires dans le striatum. Entre autres, les MSNs D1 deviennent

hypersensibles à la dopamine. Nous avons confirmé cette hypersensibilité à la dopamine par imagerie de biosenseurs, aussi bien au niveau de l'AMPC que de l'activité PKA. Cette hypersensibilité, combinée à la prise répétée quotidienne de L-DOPA, conduit au développement des LID. Une sur-activation de la voie AMPc/PKA dans les MSNs D1 est associée à l'expression des LID. Notre hypothèse consiste à stimuler la PDE2A afin de réduire les niveaux excessifs d'AMPC, sans toutefois supprimer la réponse impliquée dans la mise en place des programmes moteurs. Plusieurs arguments sont en faveur de cette hypothèse. Chez l'humain, des mutations induisant une réduction de l'activité enzymatique de la PDE2A sont associées à des dyskinésies paroxystiques (maladie liée à des mouvements hyperkinétiques) (Doummar et al., 2020) et une mutation dans le domaine régulateur GAF-B (domaine de liaison du GMPc) a été mise en évidence dans un développement précoce de chorée (production de mouvements involontaires) (Salpietro et al., 2018). Dans un modèle murin de la maladie de Parkinson, le donneur de NO (molsidomine) administré en systémique diminue les LID (Lorenc-Koci and Czarnecka, 2013; Solís et al., 2015). Nos résultats montrent, *ex vivo*, que la stimulation de la PDE2A par un donneur de NO réduit l'amplitude des réponses hypersensibles à la dopamine dans les MSNs D1, sans modifier la temporalité de la réponse. L'ensemble de ces données suggère donc un rôle de la PDE2A dans la modulation de la voie de signalisation AMPc/PKA impliquée dans la mise en place des mouvements.

L'effet du NO sur les niveaux d'AMPC dans les MSNs D1 pourrait expliquer le rôle antidyskinétique de la molsidomine (donneur de NO) (Lorenc-Koci and Czarnecka, 2013; Solís et al., 2015). Cependant, le mécanisme d'action de la molsidomine n'a pas été analysé dans ces études. Nos résultats suggèrent que cet effet pourrait être en partie médié par la PDE2A. Ainsi, il serait intéressant de vérifier, *in vivo*, si un inhibiteur de la PDE2A supprime l'effet anti-dyskinétique de la molsidomine.

La stimulation de la PDE2A réduit la réponse AMPc lors d'une application transitoire de dopamine. Cependant, ces expériences ont été conduites *ex vivo*. Le temps de présence de la dopamine est supérieur à celui de la dopamine phasique. De plus, de nombreux paramètres ne sont pas pris en compte dans nos conditions expérimentales, tels que l'activité des interneurons striataux et des afférences glutamatergiques. Ainsi, il serait pertinent de poursuivre cette étude *in vivo*. L'opto-activation des interneurons NOergiques pourrait constituer une première étape. Cependant, le NO active les GC de tous les neurones striataux et ne cible donc pas uniquement la PDE2A. L'expression d'une PDE2A photoactivable (Gasser et al., 2014) dans le striatum permettrait d'éviter l'activation des cibles non spécifiques et de valider (ou invalider) la PDE2A comme cible thérapeutique dans le traitement des dyskinésies.

5.4.2 – Cibler la PDE2A pour traiter les LID

La réponse à la dopamine dans le striatum est modulée principalement par quatre PDE : PDE1B, PDE2A, PDE4(B) et PDE10A. L'intérêt de la PDE2A face aux autres enzymes est double. D'une part, la PDE2A a une faible affinité pour l'AMPc. Ainsi, elle intervient essentiellement dans les niveaux élevés d'AMPc (et excessifs dans le cas des LID). Son activité module l'amplitude de la réponse à la dopamine, mais n'en modifie pas la durée. D'autre part, les domaines régulateurs GAF-B lui confèrent la particularité d'être stimuable. Or, les domaines régulateurs des PDE sont peu conservés entre les différentes PDE et constituent ainsi des cibles spécifiques à chaque PDE (Baillie et al., 2019). D'ailleurs, des activateurs se fixant au domaine GAF-B existent (5,6-DM-cBIMP et 5,6-DCI-cBIMP) (Jäger et al., 2010). Ces molécules lient le domaine GAF-B de la PDE2A. Toutefois, ils présentent l'inconvénient d'activer également la PKA.

Cibler la PDE2A en utilisant un donneur de NO n'est pas envisageable chez l'humain de par son absence de spécificité. Dans le striatum, la libération du NO module l'activité des MSNs mais augmente également l'activité des ChIN. Or, une augmentation de l'activité électrique des ChIN médiée par le récepteur D₁/D₅ est impliquée dans le développement des LID (Paz et al., 2021). Un donneur de NO pourrait alors renforcer ce mécanisme. De plus, la modulation de la voie de signalisation nNOS/NO/GMPc mène à des résultats contradictoires. L'utilisation de la molsidomine, favorisant l'augmentation du GMPc, et l'utilisation d'inhibiteurs de la nNOS, réduisant la production de GMPc, montrent des effets anti-dyskinétiques (Lorenc-Koci and Czarnecka, 2013; Padovan-Neto et al., 2009; Solís et al., 2015; Takuma et al., 2012). Ces divergences peuvent s'expliquer par des mécanismes d'action différents. D'une part, la molsidomine peut réduire la sur-activation des MSNs D1 via l'activation de la PDE2A. D'autre part, les inhibiteurs de la nNOS réduisent les niveaux de GMPc, en faveur d'une réduction de l'activité des MSNs. Plus généralement, le NO est également connu pour ses propriétés vasodilatatrices. Les cibles du NO sont multiples, les principales dans le cœur étant la PDE2, PDE3 et la PKG (Vandecasteele et al., 2001). Ces données suggèrent qu'il serait plus pertinent de cibler pharmacologiquement la PDE2A.

5.4.3 – Limites de la PDE2A comme cible thérapeutique

L'activité des interneurons NOergiques est augmentée dans les LID (Itokawa et al., 2006; Pavón et al., 2006). Cela conduit à une augmentation de l'activité de la GC et donc des niveaux de GMPc. Or, si les niveaux intracellulaires de GMPc sont élevés, il est possible que l'activité de la PDE2A soit déjà maximale, ce qui préviendrait l'action d'un activateur de la PDE2A. Toutefois, la stimulation de la PDE2A pourrait éventuellement

constituer un traitement pour prévenir le développement des LID, c'est-à-dire prévenir les adaptations cellulaires associées aux LID.

La PDE2A est largement exprimée dans l'organisme, et son activation pharmacologique pourrait donner lieu à de multiples effets indésirables, en particulier dans le cœur où elle est fortement exprimée. Toutefois, une étude a montré que la stimulation de la PDE2A présente un rôle protecteur dans l'arythmie cardiaque (Vettel et al., 2017). L'utilisation d'un activateur de la PDE2A ne devrait donc pas être limitée par son implication dans la contraction cardiaque.

6 – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse met en évidence un rôle majeur des PDE dans la régulation spatiale et temporelle des seconds messagers dans les MSNs et les ChIN du striatum. Chaque type neuronal exprime une combinaison particulière de PDE. Dans les MSNs, ce sont les PDE1B, PDE2A, PDE4 et PDE10A, tandis que dans les ChIN, ce sont principalement les PDE1A, PDE3A et PDE4. Chaque PDE présente des caractéristiques uniques, que ce soit par leur affinité pour un ou plusieurs seconds messagers, ou par leur régulation, et permettent ainsi une régulation du signal AMPc et GMPc différente dans chaque type neuronal. Dans les MSNs, ces PDE jouent un rôle fondamental dans l'intégration du signal dopaminergique. Elles permettent d'encoder la temporalité de la réponse à la dopamine nécessaire aux nombreuses fonctions du striatum, telles que l'apprentissage basé sur la récompense ou la mise en place de programmes moteurs. Dans les ChIN, nos résultats montrent une dynamique de la voie AMPc très différente de celle rencontrée dans les MSNs, suggérant des propriétés d'intégration des signaux distinctes. Cela laisse supposer une régulation des voies de signalisation adaptée aux fonctionnalités de chaque type neuronal.

La régulation de l'activité des PDE par le GMPc, ou le calcium complexifie le rôle des PDE dans l'intégration des signaux biologiques. La modulation de la PDE2A et PDE3A par la voie NO/GMPc, dans les MSNs et ChIN, respectivement, illustre bien cela : en fonction de l'état d'activation du neurone, l'effet du NO peut différer. Cet effet du NO sur la régulation de l'AMPc et du GMPc a été étudié sur tranche de cerveau, lors d'une application continue de NO. Désormais, il serait intéressant de combiner l'imagerie de biosenseurs à l'optogénétique afin d'étudier la dynamique de la voie AMPc/PKA lors d'une opto-stimulation des interneurones NOergiques. Ce type d'expérience pourrait également être conduit *in vivo* afin de mieux comprendre le rôle des interneurones NOergiques dans la mise en place du mouvement et d'en disséquer les mécanismes d'action sur les ChIN et les MSNs. De plus, il est aujourd'hui incontournable d'aborder la complexité de l'intégration des signaux par les seconds messagers à l'aide des modélisations numériques. De nombreux modèles mathématiques permettent une meilleure compréhension du fonctionnement du striatum. L'optimisation de ces modèles nécessite des données expérimentales, telles que celles que nous obtenons par imagerie cellulaire. Plus ces modèles seront aboutis, plus les résultats des simulations seront proches de la réalité physiologique et permettront de dépasser certaines limites expérimentales. A terme, ces outils de modélisation pourront également être utilisés pour mieux comprendre les situations pathologiques (comme lors d'une neurodégénérescence des neurones dopaminergiques), et mettre en évidence, *in silico*, de nouvelles cibles thérapeutiques.

Enfin, l'ensemble des connaissances acquises sur le rôle des PDE dans le striatum nous a permis de considérer la PDE2A comme une potentielle cible thérapeutique dans le traitement des LID. Ainsi nous avons mis en évidence un mécanisme d'action permettant de réduire les niveaux d'AMPC élevés associés aux LID. Ce mécanisme d'action nécessite désormais d'être tester *in vivo*. Aujourd'hui, aucun activateur de la PDE2A n'est disponible. Toutefois, nous pourrions tirer profit de la PDE2A photo-activable (Gasser et al., 2014), l'exprimer dans les MSNs du striatum et évaluer, *in vivo*, l'effet de son activation sur l'expression des LID. L'activation de la PDE2A apparaît ainsi comme une stratégie thérapeutique prometteuse dans la modération des réponses excessives à la L-DOPA et le développement des LID.

7 – PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

Scientific publication and review

Mota E., **Bompierre S.**, Betolngar D. Castro L.R.V., Vincent P., 2021, Pivotal role phosphodiesterase 10 in the integration of dopamine signals in the mice striatal D1 and D2 medium-sized spiny neurones, British Journal of Pharmacology, DOI: 10.1111/bph.15664

Vincent P., Castro L.R.V., **Bompierre S.**, 2021, Cellular context shapes cyclic nucleotide signaling in neurons through multiple levels of integration, Journal of Neuroscience Methods, DOI: 10.1016/j.jneumeth.2021.109305

Présentations orales

Bompierre S., Castro L.R.V., Vincent P. : Phosphodiesterase 2A : functional role in the striatum and potentially new therapeutic target in Parkinson's disease, Meeting du Club des Ganglions de la Base, 30 janvier 2023 à Marseille (France)

Bompierre S., Mota E., Yapo C., Castro R.L., Vincent P. : the phosphodiesterase 2A (PDE2A) : a new therapeutic target in Parkinson's disease ?, eSymposium nucleotides cycliques, 31 mai 2021, conférence en ligne.

Posters

Bompierre S., Castro L.R.V., Vincent P. : Phosphodiesterase 2A : functional role in the striatum and potentially new therapeutic target in Parkinson's disease, Swebags (Swedish basal ganglia society), 30 novembre 2022, conference en ligne

Bompierre S., Castro L.R.V., Vincent P. : Phosphodiesterase 2A : functional role in the striatum and potentially new therapeutic target in Parkinson's disease, Society for Neuroscience, 12 au 16 novembre 2022 à San Diego (Californie, Etats-Unis)

Bompierre S., Castro L.R.V., Vincent P. : Phosphodiesterase 2A : functional role in the striatum and potentially new therapeutic target in Parkinson's disease, Forum de la FENS (Federation of European Neuroscience Societies), 9 au 13 juillet 2022 à Paris (France)

Bompierre S., Castro L.R.V., Vincent P. : Phosphodiesterase 2A : functional role in the striatum and potentially new therapeutic target in Parkinson's disease, NeuroFrance 2021, 19 au 21 mai 2021, conférence en ligne

Autres

Organisation de séminaires interdisciplinaires à l'Institut de Biologie Paris Seine (IBPS) : Pizz'of Science : un séminaire tous les 2 mois avec trois présentations par des doctorants et post-doctorants

Organisation d'ENCODS 2022 (European Neuroscience Conference by Doctoral Students), évènement satellite de la FENS, 7 et 8 juillet 2022, au Collège de France à Paris (France)

Mission de médiation scientifique « vis ma vie de chercheur » pendant la deuxième et troisième année de doctorat.

8 – BIBLIOGRAPHIE

- Abercrombie, E.D., Bonatz, A.E., Zigmond, M.J., 1990. Effects of L-dopa on extracellular dopamine in striatum of normal and 6-hydroxydopamine-treated rats. *Brain Res* 525, 36–44. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91318-b](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91318-b)
- Acin-Perez, R., Russwurm, M., Günnewig, K., Gertz, M., Zoidl, G., Ramos, L., Buck, J., Levin, L.R., Rassow, J., Manfredi, G., Steegborn, C., 2011. A Phosphodiesterase 2A Isoform Localized to Mitochondria Regulates Respiration. *J. Biol. Chem.* 286, 30423–30432. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.266379>
- Agid, Y., Javoy, F., Glowinski, J., 1973. Hyperactivity of Remaining Dopaminergic Neurones after Partial Destruction of the Nigro-striatal Dopaminergic System in the Rat. *Nature New Biology* 245, 150–151. <https://doi.org/10.1038/newbio245150a0>
- Ahlskog, J.E., Muentner, M.D., 2001. Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov Disord* 16, 448–458. <https://doi.org/10.1002/mds.1090>
- Ahn, J.-H., McAvoy, T., Rakhilin, S.V., Nishi, A., Greengard, P., Nairn, A.C., 2007. Protein kinase A activates protein phosphatase 2A by phosphorylation of the B56delta subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 2979–2984. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611532104>
- Albin, R.L., Young, A.B., Penney, J.B., 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosciences* 12, 366–375. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(89\)90074-X](https://doi.org/10.1016/0166-2236(89)90074-X)
- Alcacer, C., Andreoli, L., Sebastianutto, I., Jakobsson, J., Fieblinger, T., Cenci, M.A., 2017. Chemogenetic stimulation of striatal projection neurons modulates responses to Parkinson’s disease therapy. *Journal of Clinical Investigation* 127, 720–734. <https://doi.org/10.1172/JCI90132>
- Alcacer, C., Santini, E., Valjent, E., Gaven, F., Girault, J.-A., Herve, D., 2012. G olf Mutation Allows Parsing the Role of cAMP-Dependent and Extracellular Signal-Regulated Kinase-Dependent Signaling in L-3,4-Dihydroxyphenylalanine-Induced Dyskinesia. *Journal of Neuroscience* 32, 5900–5910. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0837-12.2012>
- Aldrin-Kirk, P., Heuer, A., Rylander Ottosson, D., Davidsson, M., Mattsson, B., Björklund, T., 2018. Chemogenetic modulation of cholinergic interneurons reveals their regulating role on the direct and indirect output pathways from the striatum. *Neurobiol Dis* 109, 148–162. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.10.010>
- Alexander, G.E., Crutcher, M.D., 1990. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 13, 266–271. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(90\)90107-l](https://doi.org/10.1016/0166-2236(90)90107-l)
- Alloway, K.D., Rebec, G.V., 1984. Apomorphine-induced inhibition of neostriatal activity is enhanced by lesions induced by 6-hydroxydopamine but not by long-term administration of amphetamine. *Neuropharmacology* 23, 1033–1039. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(84\)90125-4](https://doi.org/10.1016/0028-3908(84)90125-4)
- Amemori, K., Gibb, L.G., Graybiel, A.M., 2011. Shifting Responsibly: The Importance of Striatal Modularity to Reinforcement Learning in Uncertain Environments. *Front Hum Neurosci* 5, 47. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2011.00047>

- Andén, N.E., Magnusson, T., Rosengren, E., 1964. On the presence of dihydroxyphenylalanine decarboxylase in nerves. *Experientia* 20, 328–329. <https://doi.org/10.1007/BF02171078>
- Andersen, P.H., Gingrich, J.A., Bates, M.D., Deary, A., Falardeau, P., Senogles, S.E., Caron, M.G., 1990. Dopamine receptor subtypes: beyond the D1/D2 classification. *Trends Pharmacol Sci* 11, 231–236. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(90\)90249-8](https://doi.org/10.1016/0165-6147(90)90249-8)
- Andersson, M., Hilbertson, A., Cenci, M.A., 1999. Striatal fosB Expression Is Causally Linked with L-DOPA-Induced Abnormal Involuntary Movements and the Associated Upregulation of Striatal Prodorphin mRNA in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Neurobiology of Disease* 6, 461–474. <https://doi.org/10.1006/nbdi.1999.0259>
- Anzalone, A., Lizardi-Ortiz, J.E., Ramos, M., Mei, C.D., Hopf, F., Iaccarino, C., Halbout, B., Jacobsen, J., Kinoshita, C., Welter, M., Caron, M., Bonci, A., Sulzer, D., Borrelli, E., 2012. Dual Control of Dopamine Synthesis and Release by Presynaptic and Postsynaptic Dopamine D2 Receptors. *The Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0918-12.2012>
- Aosaki, T., Kimura, M., Graybiel, A.M., 1995. Temporal and spatial characteristics of tonically active neurons of the primate's striatum. *Journal of Neurophysiology* 73, 1234–1252. <https://doi.org/10.1152/jn.1995.73.3.1234>
- Aosaki, T., Kiuchi, K., Kawaguchi, Y., 1998. Dopamine D1-like receptor activation excites rat striatal large aspiny neurons in vitro. *J Neurosci* 18, 5180–5190. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-14-05180.1998>
- Aosaki, T., Miura, M., Suzuki, T., Nishimura, K., Masuda, M., 2010. Acetylcholine–dopamine balance hypothesis in the striatum: An update. *Geriatrics & Gerontology International* 10, S148–S157. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0594.2010.00588.x>
- Aosaki, T., Tsubokawa, H., Ishida, A., Watanabe, K., Graybiel, A.M., Kimura, M., 1994. Responses of tonically active neurons in the primate's striatum undergo systematic changes during behavioral sensorimotor conditioning. *J Neurosci* 14, 3969–3984.
- Apicella, P., 2002. Tonically active neurons in the primate striatum and their role in the processing of information about motivationally relevant events. *Eur J Neurosci* 16, 2017–2026. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02262.x>
- Aragona, B.J., Cleaveland, N.A., Stuber, G.D., Day, J.J., Carelli, R.M., Wightman, R.M., 2008. Preferential enhancement of dopamine transmission within the nucleus accumbens shell by cocaine is attributable to a direct increase in phasic dopamine release events. *J Neurosci* 28, 8821–8831. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2225-08.2008>
- Arakawa, K., Yuge, N., Maehara, S., 2020. Ameliorative effects of a phosphodiesterase 10A inhibitor, MR1916 on L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats. *Pharmacol. Rep* 72, 443–448. <https://doi.org/10.1007/s43440-020-00060-y>
- Arbuthnott, G.W., Wickens, J., 2007. Space, time and dopamine. *Trends in Neurosciences* 30, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.12.003>
- Ariano, M.A., Lewicki, J.A., Brandwein, H.J., Murad, F., 1982. Immunohistochemical localization of guanylate cyclase within neurons of rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 1316–1320. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.4.1316>

- Armstrong, M.J., Okun, M.S., 2020. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA* 323, 548–560. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.22360>
- Aubert, I., Guigoni, C., Håkansson, K., Li, Q., Dovero, S., Barthe, N., Bioulac, B.H., Gross, C.E., Fisone, G., Bloch, B., Bezard, E., 2005. Increased D₁ dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia: Increased D₁ Signaling in Dyskinesia. *Ann Neurol* 57, 17–26. <https://doi.org/10.1002/ana.20296>
- Augustin, S.M., Beeler, J.A., McGehee, D.S., Zhuang, X., 2014. Cyclic AMP and afferent activity govern bidirectional synaptic plasticity in striatopallidal neurons. *J Neurosci* 34, 6692–6699. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3906-13.2014>
- Bacskai, B.J., Hochner, B., Mahaut-Smith, M., Adams, S.R., Kaang, B.K., Kandel, E.R., Tsien, R.Y., 1993. Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in *Aplysia* sensory neurons. *Science* 260, 222–226. <https://doi.org/10.1126/science.7682336>
- Baillie, G.S., MacKenzie, S.J., McPhee, I., Houslay, M.D., 2000. Sub-family selective actions in the ability of Erk2 MAP kinase to phosphorylate and regulate the activity of PDE4 cyclic AMP-specific phosphodiesterases. *Br J Pharmacol* 131, 811–819. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703636>
- Baillie, G.S., Tejada, G.S., Kelly, M.P., 2019. Therapeutic targeting of 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases: inhibition and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 18, 770–796. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0033-4>
- Balleine, B.W., Dickinson, A., 1998. Goal-directed instrumental action: contingency and incentive learning and their cortical substrates. *Neuropharmacology* 37, 407–419. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(98\)00033-1](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(98)00033-1)
- Balleine, B.W., Liljeholm, M., Ostlund, S.B., 2009. The integrative function of the basal ganglia in instrumental conditioning. *Behavioural Brain Research, Special issue on the role of the basal ganglia in learning and memory* 199, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.10.034>
- Balleine, B.W., O'Doherty, J.P., 2010. Human and rodent homologies in action control: corticostriatal determinants of goal-directed and habitual action. *Neuropsychopharmacology* 35, 48–69. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.131>
- Barath, A.S., Rusheen, A.E., Rojas Cabrera, J.M., Price, J.B., Owen, R.L., Shin, H., Jang, D.P., Blaha, C.D., Lee, K.H., Oh, Y., 2020. Hypoxia-Associated Changes in Striatal Tonic Dopamine Release: Real-Time in vivo Measurements With a Novel Voltammetry Technique. *Front. Neurosci.* 14, 869. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00869>
- Barbeau, A., 1962. The pathogenesis of Parkinson's disease: a new hypothesis. *Can Med Assoc J* 87, 802–807.
- Bastide, M.F., Meissner, W.G., Picconi, B., Fasano, S., Fernagut, P.-O., Feyder, M., Francardo, V., Alcacer, C., Ding, Y., Brambilla, R., Fisone, G., Jon Stoessl, A., Bourdenx, M., Engeln, M., Navailles, S., De Deurwaerdère, P., Ko, W.K.D., Simola, N., Morelli, M., Groc, L., Rodriguez, M.-C., Gurevich, E.V., Quik, M., Morari, M., Mellone, M., Gardoni, F., Tronci, E., Guehl, D., Tison, F., Crossman, A.R., Kang, U.J., Steece-Collier, K., Fox, S., Carta, M., Angela Cenci, M., Bézard, E., 2015. Pathophysiology of L-dopa-induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* 132, 96–168. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.07.002>

- Bateup, H.S., Santini, E., Shen, W., Birnbaum, S., Valjent, E., Surmeier, D.J., Fisone, G., Nestler, E.J., Greengard, P., 2010. Distinct subclasses of medium spiny neurons differentially regulate striatal motor behaviors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 14845–14850. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009874107>
- Bateup, H.S., Svenningsson, P., Kuroiwa, M., Gong, S., Nishi, A., Heintz, N., Greengard, P., 2008. Cell type-specific regulation of DARPP-32 phosphorylation by psychostimulant and antipsychotic drugs. *Nat Neurosci* 11, 932–939. <https://doi.org/10.1038/nn.2153>
- Beard, M.B., Olsen, A.E., Jones, R.E., Erdogan, S., Houslay, M.D., Bolger, G.B., 2000. UCR1 and UCR2 Domains Unique to the cAMP-specific Phosphodiesterase Family Form a Discrete Module via Electrostatic Interactions *. *Journal of Biological Chemistry* 275, 10349–10358. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.14.10349>
- Beaumont, V., Zhong, S., Lin, H., Xu, W., Bradaia, A., Steidl, E., Gleyzes, M., Wadel, K., Buisson, B., Padovan-Neto, F.E., Chakroborty, S., Ward, K.M., Harms, J.F., Beltran, J., Kwan, M., Ghavami, A., Häggkvist, J., Tóth, M., Halldin, C., Varrone, A., Schaab, C., Dybowski, J.N., Elschenbroich, S., Lehtimäki, K., Heikkinen, T., Park, L., Rosinski, J., Mrzljak, L., Lavery, D., West, A.R., Schmidt, C.J., Zaleska, M.M., Munoz-Sanjuan, I., 2016. Phosphodiesterase 10A Inhibition Improves Cortico-Basal Ganglia Function in Huntington's Disease Models. *Neuron* 92, 1220–1237. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.10.064>
- Beavo, J., Francis, S.H., Houslay, M.D., 2007. Cyclic nucleotide phosphodiesterases in health and disease. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton.
- Beavo, J.A., 1995. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 75, 725–748. <https://doi.org/10.1152/physrev.1995.75.4.725>
- Beck, G., Maehara, S., Chang, P.L., Papa, S.M., 2018. A Selective Phosphodiesterase 10A Inhibitor Reduces L-Dopa-Induced Dyskinesias in Parkinsonian Monkeys. *Movement Disorders* 33, 805–814. <https://doi.org/10.1002/mds.27341>
- Beck, G., Singh, A., Zhang, J., Potts, L.F., Woo, J.-M., Park, E.S., Mochizuki, H., Mouradian, M.M., Papa, S.M., 2019. Role of striatal Δ FosB in l-Dopa-induced dyskinesias of parkinsonian nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 116, 18664–18672. <https://doi.org/10.1073/pnas.1907810116>
- Becker, A., Grecksch, G., 2008. Phosphodiesterase inhibitors—Are they potential neuroleptic drugs? *Behavioural Brain Research* 186, 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.08.002>
- Bell, M.I., Richardson, P.J., Lee, K., 2002. Functional and molecular characterization of metabotropic glutamate receptors expressed in rat striatal cholinergic interneurons. *Journal of Neurochemistry* 81, 142–149. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00815.x>
- Bello, E.P., Mateo, Y., Gelman, D.M., Noaín, D., Shin, J.H., Low, M.J., Alvarez, V.A., Lovinger, D.M., Rubinstein, M., 2011. Cocaine supersensitivity and enhanced motivation for reward in mice lacking dopamine D2 autoreceptors. *Nat Neurosci* 14, 1033–1038. <https://doi.org/10.1038/nn.2862>
- Bennett, B.D., Callaway, J.C., Wilson, C.J., 2000. Intrinsic membrane properties underlying spontaneous tonic firing in neostriatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 20, 8493–8503. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-22-08493.2000>

- Bennett, B.D., Wilson, C.J., 1999. Spontaneous activity of neostriatal cholinergic interneurons in vitro. *J Neurosci* 19, 5586–5596.
- Benoit-Marand, M., Jaber, M., Gonon, F., 2000. Release and elimination of dopamine in vivo in mice lacking the dopamine transporter: functional consequences. *Eur J Neurosci* 12, 2985–2992. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00155.x>
- Berendse, H.W., Groenewegen, H.J., 1990. Organization of the thalamostriatal projections in the rat, with special emphasis on the ventral striatum. *Journal of Comparative Neurology* 299, 187–228. <https://doi.org/10.1002/cne.902990206>
- Beresford, I.J., Davenport, A.P., Sirinathsinghji, D.J., Hall, M.D., Hill, R.G., Hughes, J., 1988. Experimental hemiparkinsonism in the rat following chronic unilateral infusion of MPP+ into the nigrostriatal dopamine pathway--II. Differential localization of dopamine and cholecystokinin receptors. *Neuroscience* 27, 129–143. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(88\)90224-2](https://doi.org/10.1016/0306-4522(88)90224-2)
- Bergson, C., Mrzljak, L., Smiley, J.F., Pappy, M., Levenson, R., Goldman-Rakic, P.S., 1995. Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain. *J Neurosci* 15, 7821–7836. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-12-07821.1995>
- Bergstrom, B.P., Garris, P.A., 2003. 'Passive stabilization' of striatal extracellular dopamine across the lesion spectrum encompassing the presymptomatic phase of Parkinson's disease: a voltammetric study in the 6-OHDA-lesioned rat: Neuroadaptation in the 6-OHDA-lesioned rat. *Journal of Neurochemistry* 87, 1224–1236. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02104.x>
- Berke, J.D., 2018. What does dopamine mean? *Nat Neurosci* 21, 787–793. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0152-y>
- Bernácer, J., Prensa, L., Giménez-Amaya, J.M., 2007. Cholinergic interneurons are differentially distributed in the human striatum. *PLoS One* 2, e1174. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001174>
- Bernard, V., Bolam, J.P., 1998. Subcellular and subsynaptic distribution of the NR1 subunit of the NMDA receptor in the neostriatum and globus pallidus of the rat: co-localization at synapses with the GluR2/3 subunit of the AMPA receptor. *Eur J Neurosci* 10, 3721–3736. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00380.x>
- Bernard, V., Somogyi, P., Bolam, J.P., 1997. Cellular, subcellular, and subsynaptic distribution of AMPA-type glutamate receptor subunits in the neostriatum of the rat. *J Neurosci* 17, 819–833.
- Berridge, K.C., Robinson, T.E., 1998. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Brain Res Rev* 28, 309–369. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(98\)00019-8](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(98)00019-8)
- Bertran-Gonzalez, J., Bosch, C., Maroteaux, M., Matamalas, M., Herve, D., Valjent, E., Girault, J.-A., 2008. Opposing Patterns of Signaling Activation in Dopamine D1 and D2 Receptor-Expressing Striatal Neurons in Response to Cocaine and Haloperidol. *Journal of Neuroscience* 28, 5671–5685. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1039-08.2008>
- Betolngar, D.B., Mota, É., Fabritius, A., Nielsen, J., Hougaard, C., Christoffersen, C.T., Yang, J., Kehler, J., Griesbeck, O., Castro, L.R.V., Vincent, P., 2019. Phosphodiesterase 1 Bridges Glutamate Inputs with NO- and Dopamine-Induced Cyclic Nucleotide Signals in the Striatum. *Cerebral Cortex* 29, 5022–5036. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhz041>

- Bezard, E., Dovero, S., Prunier, C., Ravenscroft, P., Chalon, S., Guilloteau, D., Crossman, A.R., Bioulac, B., Brotchie, J.M., Gross, C.E., 2001. Relationship between the Appearance of Symptoms and the Level of Nigrostriatal Degeneration in a Progressive 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Lesioned Macaque Model of Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* 21, 6853–6861. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-17-06853.2001>
- Bezard, E., Gross, C.E., 1998. Compensatory mechanisms in experimental and human parkinsonism: towards a dynamic approach. *Prog Neurobiol* 55, 93–116. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(98\)00006-9](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(98)00006-9)
- Bezard, E., Jaber, M., Gonon, F., Boireau, A., Bloch, B., Gross, C.E., 2000. Adaptive changes in the nigrostriatal pathway in response to increased 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurodegeneration in the mouse. *Eur J Neurosci* 12, 2892–2900. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00180.x>
- Bezard, E., Przedborski, S., 2011. A tale on animal models of Parkinson's disease. *Movement Disorders* 26, 993–1002. <https://doi.org/10.1002/mds.23696>
- Bibb, J.A., Snyder, G.L., Nishi, A., Yan, Z., Meijer, L., Fienberg, A.A., Tsai, L.H., Kwon, Y.T., Girault, J.A., Czernik, A.J., Haganir, R.L., Hemmings, H.C., Nairn, A.C., Greengard, P., 1999. Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. *Nature* 402, 669–671. <https://doi.org/10.1038/45251>
- Björklund, A., Dunnett, S.B., 2007. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends in Neurosciences* 30, 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.006>
- Blesa, J., Przedborski, S., 2014. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Frontiers in Neuroanatomy* 8.
- Blomeley, C.P., Cains, S., Bracci, E., 2015. Dual Nitrergic/Cholinergic Control of Short-Term Plasticity of Corticostriatal Inputs to Striatal Projection Neurons. *Front. Cell Neurosci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00453>
- Böckelmann, R., Wolf, G., Ransmayr, G., Riederer, P., 1994. NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase containing neurons in normal and Parkinson's disease putamen. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 7, 115–121. <https://doi.org/10.1007/BF02260966>
- Boess, F.G., Hendrix, M., van der Staay, F.-J., Erb, C., Schreiber, R., van Staveren, W., de Vente, J., Prickaerts, J., Blokland, A., Koenig, G., 2004. Inhibition of phosphodiesterase 2 increases neuronal cGMP, synaptic plasticity and memory performance. *Neuropharmacology* 47, 1081–1092. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.07.040>
- Bolam, J.P., Clarke, D.J., Smith, A.D., Somogyi, P., 1983. A type of aspiny neuron in the rat neostriatum accumulates [3H]γ-aminobutyric acid: Combination of golgi-staining, autoradiography, and electron microscopy. *Journal of Comparative Neurology* 213, 121–134. <https://doi.org/10.1002/cne.902130202>
- Bolam, J.P., Hanley, J.J., Booth, P.A.C., Bevan, M.D., 2000. Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anatomy* 196, 527–542. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2000.19640527.x>
- Bolam, J.P., Powell, J.F., Wu, J.Y., Smith, A.D., 1985. Glutamate decarboxylase-immunoreactive structures in the rat neostriatum: a correlated light and electron microscopic study including a combination of Golgi impregnation with

- immunocytochemistry. *J Comp Neurol* 237, 1–20. <https://doi.org/10.1002/cne.902370102>
- Bolam, J.P., Wainer, B.H., Smith, A.D., 1984. Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum. A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi-impregnation and electron microscopy. *Neuroscience* 12, 711–718. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(84\)90165-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(84)90165-9)
- Bolger, G., Michaeli, T., Martins, T., St John, T., Steiner, B., Rodgers, L., Riggs, M., Wigler, M., Ferguson, K., 1993. A family of human phosphodiesterases homologous to the dunce learning and memory gene product of *Drosophila melanogaster* are potential targets for antidepressant drugs. *Mol Cell Biol* 13, 6558–6571. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.10.6558-6571.1993>
- Bolger, G.B., 2006. Phosphodiesterase Isoforms—An Annotated List, in: Beavo, J.A., Francis, S.H., Houslay, M.D. (Eds.), *Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases in Health and Disease*. CRC Press, pp. 19–31. <https://doi.org/10.1201/9781420020847-2>
- Bolger, G.B., 1994. Molecular biology of the cyclic AMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterases: A diverse family of regulatory enzymes. *Cellular Signalling* 6, 851–859. [https://doi.org/10.1016/0898-6568\(94\)90018-3](https://doi.org/10.1016/0898-6568(94)90018-3)
- Bolger, G.B., Rodgers, L., Riggs, M., 1994. Differential CNS expression of alternative mRNA isoforms of the mammalian genes encoding cAMP-specific phosphodiesterases. *Gene* 149, 237–244. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90155-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90155-4)
- Bollen, M., Peti, W., Ragusa, M.J., Beullens, M., 2010. The extended PP1 toolkit: designed to create specificity. *Trends Biochem Sci* 35, 450–458. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.03.002>
- Bonnavion, P., Varin, C., Fakhfour, G., De Groote, A., Cornil, A., Isingrini, E., Rainer, Q., Xu, K., Tzavara, E., Vigneault, E., Dumas, S., de Kerchove d'Exaerde, A., Giros, B., 2022. Unexpected inhibition of motor function by dopamine activation of D1/D2 co-expressing striatal neurons (preprint). *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1101/2022.04.05.487163>
- Bonsi, P., Cuomo, D., Ding, J., Sciamanna, G., Ulrich, S., Anne, T., Bernardi, G., Surmeier, D., Pisani, A., 2007. Endogenous Serotonin Excites Striatal Cholinergic Interneurons via the Activation of 5-HT_{2C}, 5-HT₆, and 5-HT₇ Serotonin Receptors: Implications for Extrapyramidal Side Effects of Serotonin Reuptake Inhibitors. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 32, 1840–54. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301294>
- Bordia, T., Perez, X.A., Heiss, J., Zhang, D., Quik, M., 2016. Optogenetic activation of striatal cholinergic interneurons regulates L-dopa-induced dyskinesias. *Neurobiol Dis* 91, 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.02.019>
- Borroto-Escuela, D.O., Romero-Fernandez, W., Tarakanov, A.O., Ciruela, F., Agnati, L.F., Fuxe, K., 2011. On the Existence of a Possible A_{2A}–D₂– β -Arrestin2 Complex: A_{2A} Agonist Modulation of D₂ Agonist-Induced β -Arrestin2 Recruitment. *Journal of Molecular Biology* 406, 687–699. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.01.022>
- Boyce, S., Kelly, E., Reavill, C., Jenner, P., Marsden, C.D., 1984. Repeated administration of N-methyl-4-phenyl 1,2,5,6-tetrahydropyridine to rats is not toxic to striatal

- dopamine neurones. *Biochem Pharmacol* 33, 1747–1752. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(84\)90344-7](https://doi.org/10.1016/0006-2952(84)90344-7)
- Brandon, E.P., Logue, S.F., Adams, M.R., Qi, M., Sullivan, S.P., Matsumoto, A.M., Dorsa, D.M., Wehner, J.M., McKnight, G.S., Idzerda, R.L., 1998. Defective motor behavior and neural gene expression in RIIbeta-protein kinase A mutant mice. *J Neurosci* 18, 3639–3649. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-10-03639.1998>
- Bredt, D.S., Hwang, P.M., Snyder, S.H., 1990. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347, 768–770. <https://doi.org/10.1038/347768a0>
- Brimblecombe, K.R., Cragg, S.J., 2017. The Striosome and Matrix Compartments of the Striatum: A Path through the Labyrinth from Neurochemistry toward Function. *ACS Chem. Neurosci.* 8, 235–242. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.6b00333>
- Brog, J.S., Salyapongse, A., Deutch, A.Y., Zahm, D.S., 1993. The patterns of afferent innervation of the core and shell in the “accumbens” part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *J Comp Neurol* 338, 255–278. <https://doi.org/10.1002/cne.903380209>
- Bunney, B.S., Grace, A.A., 1978. Acute and chronic haloperidol treatment: Comparison of effects on nigral dopaminergic cell activity. *Life Sciences* 23, 1715–1727. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(78\)90471-X](https://doi.org/10.1016/0024-3205(78)90471-X)
- Butcher, L.L., Hodge, G.K., 1976. Postnatal development of acetylcholinesterase in the caudate-putamen nucleus and substantia nigra of rats. *Brain Res* 106, 223–240. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(76\)91022-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(76)91022-2)
- Caillé, I., Dumartin, B., Bloch, B., 1996. Ultrastructural localization of D1 dopamine receptor immunoreactivity in rat striatonigral neurons and its relation with dopaminergic innervation. *Brain Res* 730, 17–31. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00424-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00424-6)
- Calabresi, P., Centonze, D., Gubellini, P., Bernardi, G., 1999a. Activation of M1-like muscarinic receptors is required for the induction of corticostriatal LTP. *Neuropharmacology* 38, 323–326. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(98\)00199-3](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(98)00199-3)
- Calabresi, Paolo, Centonze, D., Pisani, A., Bernardi, G., 1999. Metabotropic Glutamate Receptors and Cell-Type-Specific Vulnerability in the Striatum: Implication for Ischemia and Huntington’s Disease. *Experimental Neurology* 158, 97–108. <https://doi.org/10.1006/exnr.1999.7092>
- Calabresi, P., Gubellini, P., Centonze, D., Picconi, B., Bernardi, G., Chergui, K., Svenningsson, P., Fienberg, A.A., Greengard, P., 2000. Dopamine and cAMP-Regulated Phosphoprotein 32 kDa Controls Both Striatal Long-Term Depression and Long-Term Potentiation, Opposing Forms of Synaptic Plasticity. *J. Neurosci.* 20, 8443–8451. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-22-08443.2000>
- Calabresi, P., Gubellini, P., Centonze, D., Sancesario, G., Morello, M., Giorgi, M., Pisani, A., Bernardi, G., 1999b. A critical role of the nitric oxide/cGMP pathway in corticostriatal long-term depression. *J Neurosci* 19, 2489–2499.
- Calabresi, P., Maj, R., Pisani, A., Mercuri, N.B., Bernardi, G., 1992a. Long-term synaptic depression in the striatum: physiological and pharmacological characterization.

- J. Neurosci. 12, 4224–4233. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-11-04224.1992>
- Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Di Filippo, M., 2007. Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 30, 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.001>
- Calabresi, P., Pisani, A., Mercuri, N.B., Bernardi, G., 1992b. Long-term Potentiation in the Striatum is Unmasked by Removing the Voltage-dependent Magnesium Block of NMDA Receptor Channels. *European Journal of Neuroscience* 4, 929–935. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1992.tb00119.x>
- Cardinal, R.N., Parkinson, J.A., Hall, J., Everitt, B.J., 2002. Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 26, 321–352. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(02\)00007-6](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(02)00007-6)
- Carta, M., Carlsson, T., Kirik, D., Bjorklund, A., 2007. Dopamine released from 5-HT terminals is the cause of L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats. *Brain* 130, 1819–1833. <https://doi.org/10.1093/brain/awm082>
- Carta, M., Lindgren, H.S., Lundblad, M., Stancampiano, R., Fadda, F., Cenci, M.A., 2006. Role of striatal L-DOPA in the production of dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Journal of Neurochemistry* 96, 1718–1727. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03696.x>
- Castro, L.R.V., Brito, M., Guiot, E., Polito, M., Korn, C.W., Hervé, D., Girault, J.-A., Paupardin-Tritsch, D., Vincent, P., 2013. Striatal neurones have a specific ability to respond to phasic dopamine release. *J Physiol* 591, 3197–3214. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.252197>
- Castro, L.R.V., Gervasi, N., Guiot, E., Cavellini, L., Nikolaev, V.O., Paupardin-Tritsch, D., Vincent, P., 2010. Type 4 Phosphodiesterase Plays Different Integrating Roles in Different Cellular Domains in Pyramidal Cortical Neurons. *Journal of Neuroscience* 30, 6143–6151. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5851-09.2010>
- Cavas, M., Navarro, J.F., 2002. Coadministration of L-NOARG and tiapride: effects on catalepsy in male mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26, 69–73. [https://doi.org/10.1016/s0278-5846\(01\)00231-7](https://doi.org/10.1016/s0278-5846(01)00231-7)
- Cenci, M.A., 2014. Presynaptic Mechanisms of L-DOPA-Induced Dyskinesia: The Findings, the Debate, and the Therapeutic Implications. *Front. Neurol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fneur.2014.00242>
- Cenci, M.A., 2007. Dopamine dysregulation of movement control in L-DOPA-induced dyskinesia. *Trends Neurosci* 30, 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.005>
- Cenci, M.A., Crossman, A.R., 2018. Animal models of L -dopa-induced dyskinesia in Parkinson’s disease: Animal Models of Dyskinesia in PD. *Mov Disord.* 33, 889–899. <https://doi.org/10.1002/mds.27337>
- Cenci, M.A., Lee, C.S., Björklund, A., 1998. L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA. *Eur J Neurosci* 10, 2694–2706.
- Cenci, M.A., Lundblad, M., 2007. Ratings of L-DOPA-Induced Dyskinesia in the Unilateral 6-OHDA Lesion Model of Parkinson’s Disease in Rats and Mice. *Current Protocols in Neuroscience* 41. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0925s41>

- Cenci, M.A., Sgambato, V., 2021. Toxin-Based Rodent Models of Parkinson's, in: *Neuromethods*. pp. 3–19. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0912-5_1
- Cenci, M.A., Skovgård, K., Odin, P., 2022. Non-dopaminergic approaches to the treatment of motor complications in Parkinson's disease. *Neuropharmacology* 210, 109027. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2022.109027>
- Cenci, M.A., Tranberg, A., Andersson, M., Hilbertson, A., 1999. Changes in the regional and compartmental distribution of FosB- and JunB-like immunoreactivity induced in the dopamine-denervated rat striatum by acute or chronic L-dopa treatment. *Neuroscience* 94, 515–527. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(99\)00294-8](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(99)00294-8)
- Centonze, D., Bracci, E., Pisani, A., Gubellini, P., Bernardi, G., Calabresi, P., 2002. Activation of dopamine D1-like receptors excites LTS interneurons of the striatum. *Eur J Neurosci* 15, 2049–2052. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02052.x>
- Centonze, D., Grande, C., Saulle, E., Martín, A.B., Gubellini, P., Pavón, N., Pisani, A., Bernardi, G., Moratalla, R., Calabresi, P., 2003a. Distinct Roles of D1 and D5 Dopamine Receptors in Motor Activity and Striatal Synaptic Plasticity. *J. Neurosci.* 23, 8506–8512. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-24-08506.2003>
- Centonze, D., Gubellini, P., Pisani, A., Bernardi, G., Calabresi, P., 2003b. Dopamine, Acetylcholine and Nitric Oxide Systems Interact to Induce Corticostriatal Synaptic Plasticity. *Reviews in the Neurosciences* 14. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.2003.14.3.207>
- Centonze, D., Pisani, A., Bonsi, P., Giacomini, P., Bernardi, G., Calabresi, P., 2001. Stimulation of nitric oxide-cGMP pathway excites striatal cholinergic interneurons via protein kinase G activation. *J Neurosci* 21, 1393–1400.
- Chalimoniuk, M., Langfort, J., 2007. The effect of subchronic, intermittent L-DOPA treatment on neuronal nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase expression and activity in the striatum and midbrain of normal and MPTP-treated mice. *Neurochem Int* 50, 821–833. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.02.002>
- Chalimoniuk, M., Langfort, J., Lukacova, N., Marsala, J., 2004. Upregulation of guanylyl cyclase expression and activity in striatum of MPTP-induced parkinsonism in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 324, 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.028>
- Chalimoniuk, M., Stepień, A., 2004. Influence of the therapy with pergolide mesylate plus L-DOPA and with L-DOPA alone on serum cGMP level in PD patients. *Pol J Pharmacol* 56, 647–650.
- Chan, C.S., Guzman, J.N., Ilijic, E., Mercer, J.N., Rick, C., Tkatch, T., Meredith, G.E., Surmeier, D.J., 2007. “Rejuvenation” protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature* 447, 1081–1086. <https://doi.org/10.1038/nature05865>
- Chan, P., DeLanney, L.E., Irwin, I., Langston, J.W., Di Monte, D., 1991. Rapid ATP Loss Caused by 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine in Mouse Brain. *Journal of Neurochemistry* 57, 348–351. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb02134.x>

- Chang, H.T., 1988. Dopamine-acetylcholine interaction in the rat striatum: a dual-labeling immunocytochemical study. *Brain Res Bull* 21, 295–304. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(88\)90244-4](https://doi.org/10.1016/0361-9230(88)90244-4)
- Charych, E., Brandon, N., 2014. Molecular And Cellular Understanding of PDE10A: A Dual-Substrate Phosphodiesterase with Therapeutic Potential to Modulate Basal Ganglia Function, in: *Cyclic-Nucleotide Phosphodiesterases in the Central Nervous System: From Biology to Drug Discovery*. pp. 247–268. <https://doi.org/10.1002/9781118836507.ch10>
- Charych, E.I., Jiang, L.-X., Lo, F., Sullivan, K., Brandon, N.J., 2010. Interplay of Palmitoylation and Phosphorylation in the Trafficking and Localization of Phosphodiesterase 10A: Implications for the Treatment of Schizophrenia. *J. Neurosci.* 30, 9027–9037. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1635-10.2010>
- Chase, T.N., Oh, J.D., Konitsiotis, S., 2000. Antiparkinsonian and antidyskinetic activity of drugs targeting central glutamatergic mechanisms. *J Neurol* 247 Suppl 2, II36-42. <https://doi.org/10.1007/pl00007759>
- Chen, M.T., Morales, M., Woodward, D.J., Hoffer, B.J., Janak, P.H., 2001. In vivo extracellular recording of striatal neurons in the awake rat following unilateral 6-hydroxydopamine lesions. *Exp Neurol* 171, 72–83. <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7730>
- Chen, W., de Hemptinne, C., Miller, A.M., Leibbrand, M., Little, S.J., Lim, D.A., Larson, P.S., Starr, P.A., 2020. Prefrontal-Subthalamic Hyperdirect Pathway Modulates Movement Inhibition in Humans. *Neuron* 106, 579-588.e3. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.02.012>
- Chen, W., Levine, H., Rappel, W.-J., 2009. Compartmentalization of second messengers in neurons: a mathematical analysis. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 80, 041901. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.80.041901>
- Cheng, P.-L., Song, A.-H., Wong, Y.-H., Wang, S., Zhang, X., Poo, M.-M., 2011. Self-amplifying autocrine actions of BDNF in axon development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 18430–18435. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115907108>
- Chergui, K., Akaoka, H., Charléty, P.J., Saunier, C.F., Buda, M., Chouvet, G., 1994. Subthalamic nucleus modulates burst firing of nigral dopamine neurones via NMDA receptors. *Neuroreport* 5, 1185–1188. <https://doi.org/10.1097/00001756-199406020-00006>
- Cherry, J.A., Davis, R.L., 1999. Cyclic AMP phosphodiesterases are localized in regions of the mouse brain associated with reinforcement, movement, and affect. *J Comp Neurol* 407, 287–301.
- Chesselet, M.F., 1984. Presynaptic regulation of neurotransmitter release in the brain: facts and hypothesis. *Neuroscience* 12, 347–375. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(84\)90058-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(84)90058-7)
- Chesselet, M.F., Graybiel, A.M., 1986. Striatal neurons expressing somatostatin-like immunoreactivity: evidence for a peptidergic interneuronal system in the cat. *Neuroscience* 17, 547–571. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(86\)90030-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(86)90030-8)
- Chiken, S., Nambu, A., 2014. Disrupting neuronal transmission: mechanism of DBS? *Frontiers in Systems Neuroscience* 8.
- Chinta, S.J., Andersen, J.K., 2005. Dopaminergic neurons. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, Cancer and Aging at the Crossroads* 37, 942–946. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.09.009>

- Chiueh, C.C., Markey, S.P., Burns, R.S., Johannessen, J.N., Pert, A., Kopin, I.J., 1984. Neurochemical and behavioral effects of systemic and intranigral administration of N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the rat. *Eur J Pharmacol* 100, 189–194. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(84\)90221-8](https://doi.org/10.1016/0014-2999(84)90221-8)
- Choe, E.S., Parelkar, N.K., Kim, J.Y., Cho, H.W., Kang, H.S., Mao, L., Wang, J.Q., 2004. The protein phosphatase 1/2A inhibitor okadaic acid increases CREB and Elk-1 phosphorylation and c-fos expression in the rat striatum in vivo. *J Neurochem* 89, 383–390. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2003.02334.x>
- Choi, S.J., Ma, T.C., Ding, Y., Cheung, T., Joshi, N., Sulzer, D., Mosharov, E.V., Kang, U.J., 2020. Alterations in the intrinsic properties of striatal cholinergic interneurons after dopamine lesion and chronic L-DOPA. *Elife* 9, e56920. <https://doi.org/10.7554/eLife.56920>
- Choi, Y.-H., EKHOLM, D., KRALL, J., Ahmad Khan, F., Degerman, E., Manganiello, V., Movsesian, M., 2001. Identification of a novel isoform of the cyclic-nucleotide phosphodiesterase PDE3A expressed in vascular smooth-muscle myocytes. *The Biochemical journal* 353, 41–50. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3530041>
- Chuhma, N., Mingote, S., Moore, H., Rayport, S., 2014. Dopamine neurons control striatal cholinergic neurons via regionally heterogeneous dopamine and glutamate signaling. *Neuron* 81, 901–912. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.027>
- Clarke, C.E., Boyce, S., Sambrook, M.A., Crossman, A.R., 1987. Timing of levodopa therapy: evidence from MPTP-treated primates. *Lancet* 1, 625. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(87\)90260-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(87)90260-1)
- Colwell, C.S., Levine, M.S., 1995. Excitatory synaptic transmission in neostriatal neurons: regulation by cyclic AMP-dependent mechanisms. *J Neurosci* 15, 1704–1713. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-03-01704.1995>
- Conn, P.J., Battaglia, G., Marino, M.J., Nicoletti, F., 2005. Metabotropic glutamate receptors in the basal ganglia motor circuit. *Nat Rev Neurosci* 6, 787–798. <https://doi.org/10.1038/nrn1763>
- Conti, M., Nemoz, G., Sette, C., Vicini, E., 1995. Recent progress in understanding the hormonal regulation of phosphodiesterases. *Endocr Rev* 16, 370–389. <https://doi.org/10.1210/edrv-16-3-370>
- Corvol, J.-C., 2004. Persistent Increase in Olfactory Type G-Protein Subunit Levels May Underlie D1 Receptor Functional Hypersensitivity in Parkinson Disease. *Journal of Neuroscience* 24, 7007–7014. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0676-04.2004>
- Corvol, J.C., Studler, J.M., Schonn, J.S., Girault, J.A., Hervé, D., 2001. Galpha(olf) is necessary for coupling D1 and A2a receptors to adenylyl cyclase in the striatum. *J Neurochem* 76, 1585–1588. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00201.x>
- Corvol, J.-C., Valjent, E., Pascoli, V., Robin, A., Stipanovich, A., Luedtke, R.R., Belluscio, L., Girault, J.-A., Hervé, D., 2007. Quantitative changes in Galphaolf protein levels, but not D1 receptor, alter specifically acute responses to psychostimulants. *Neuropsychopharmacology* 32, 1109–1121. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301230>

- Coudé, D., Parent, A., Parent, M., 2018. Single-axon tracing of the corticosubthalamic hyperdirect pathway in primates. *Brain Struct Funct* 223, 3959–3973. <https://doi.org/10.1007/s00429-018-1726-x>
- Cragg, S.J., 2003. Variable Dopamine Release Probability and Short-Term Plasticity between Functional Domains of the Primate Striatum. *J. Neurosci.* 23, 4378–4385. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-10-04378.2003>
- Cragg, S.J., Rice, M.E., 2004. DANCING past the DAT at a DA synapse. *Trends Neurosci* 27, 270–277. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.03.011>
- Craven, K.B., Zagotta, W.N., 2006. CNG and HCN channels: two peas, one pod. *Annu Rev Physiol* 68, 375–401. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.134728>
- Crittenden, J.R., Graybiel, A.M., 2011. Basal Ganglia Disorders Associated with Imbalances in the Striatal Striosome and Matrix Compartments. *Front. Neuroanat.* 5. <https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00059>
- Crossman, A.R., 1987. Primate models of dyskinesia: the experimental approach to the study of basal ganglia-related involuntary movement disorders. *Neuroscience* 21, 1–40. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(87\)90322-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(87)90322-8)
- Crossman, A.R., Mitchell, I.J., Sambrook, M.A., 1985. Regional brain uptake of 2-deoxyglucose in N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)—induced parkinsonism in the macaque monkey. *Neuropharmacology* 24, 587–591. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(85\)90070-X](https://doi.org/10.1016/0028-3908(85)90070-X)
- Cui, G., Jun, S.B., Jin, X., Pham, M.D., Vogel, S.S., Lovinger, D.M., Costa, R.M., 2013. Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature* 494, 238–242. <https://doi.org/10.1038/nature11846>
- da Conceição, F.S.L., Ngo-Abdalla, S., Houzel, J.-C., Rehen, S.K., 2010. Murine Model for Parkinson's Disease: from 6-OH Dopamine Lesion to Behavioral Test. *JoVE* 1376. <https://doi.org/10.3791/1376>
- Dahlstroem, A., Fuxe, K., 1964. EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF MONOAMINE-CONTAINING NEURONS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. I. DEMONSTRATION OF MONOAMINES IN THE CELL BODIES OF BRAIN STEM NEURONS. *Acta Physiol Scand Suppl SUPPL 232*:1-55.
- Darmopil, S., Martín, A.B., De Diego, I.R., Ares, S., Moratalla, R., 2009. Genetic Inactivation of Dopamine D1 but Not D2 Receptors Inhibits L-DOPA-Induced Dyskinesia and Histone Activation. *Biological Psychiatry* 66, 603–613. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.04.025>
- Day, J.J., Roitman, M.F., Wightman, R.M., Carelli, R.M., 2007. Associative learning mediates dynamic shifts in dopamine signaling in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci* 10, 1020–1028. <https://doi.org/10.1038/nn1923>
- Day, M., Wang, Z., Ding, J., An, X., Ingham, C.A., Shering, A.F., Wokosin, D., Ilijic, E., Sun, Z., Sampson, A.R., Mugnaini, E., Deutch, A.Y., Sesack, S.R., Arbuthnott, G.W., Surmeier, D.J., 2006. Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nat Neurosci* 9, 251–259. <https://doi.org/10.1038/nn1632>
- de la Fuente-Fernández, R., Schulzer, M., Mak, E., Calne, D.B., Stoessl, A.J., 2004a. Presynaptic mechanisms of motor fluctuations in Parkinson's disease: a probabilistic model. *Brain* 127, 888–899. <https://doi.org/10.1093/brain/awh102>

- de la Fuente-Fernández, R., Sossi, V., Huang, Z., Furtado, S., Lu, J.-Q., Calne, D.B., Ruth, T.J., Stoessl, A.J., 2004b. Levodopa-induced changes in synaptic dopamine levels increase with progression of Parkinson's disease: implications for dyskinesias. *Brain* 127, 2747–2754. <https://doi.org/10.1093/brain/awh290>
- de Vente, J., Steinbusch, H.W., 1992. On the stimulation of soluble and particulate guanylate cyclase in the rat brain and the involvement of nitric oxide as studied by cGMP immunocytochemistry. *Acta Histochem* 92, 13–38. [https://doi.org/10.1016/S0065-1281\(11\)80138-8](https://doi.org/10.1016/S0065-1281(11)80138-8)
- Deffains, M., Bergman, H., 2015. Striatal cholinergic interneurons and cortico-striatal synaptic plasticity in health and disease. *Mov Disord* 30, 1014–1025. <https://doi.org/10.1002/mds.26300>
- Degerman, E., Belfrage, P., Manganiello, V.C., 1997. Structure, Localization, and Regulation of cGMP-inhibited Phosphodiesterase (PDE3). *Journal of Biological Chemistry* 272, 6823–6826. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.11.6823>
- Dekundy, A., Lundblad, M., Danysz, W., Cenci, M.A., 2007. Modulation of L-DOPA-induced abnormal involuntary movements by clinically tested compounds: Further validation of the rat dyskinesia model. *Behavioural Brain Research* 179, 76–89. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.01.013>
- Del Bel, E.A., da Silva, C.A., Guimarães, F.S., 1998. Catalepsy induced by nitric oxide synthase inhibitors. *General Pharmacology: The Vascular System* 30, 245–248. [https://doi.org/10.1016/S0306-3623\(97\)00075-X](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(97)00075-X)
- Del Bel, E.A., da Silva, C.A., Guimarães, F.S., Bermúdez-Echeverry, M., 2004. Catalepsy induced by intra-striatal administration of nitric oxide synthase inhibitors in rats. *Eur J Pharmacol* 485, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2003.11.071>
- Del Bel, E.A., Guimarães, F.S., Bermúdez-Echeverry, M., Gomes, M.Z., Schiaveto-de-souza, A., Padovan-Neto, F.E., Tumas, V., Barion-Cavalcanti, A.P., Lazzarini, M., Nucci-da-Silva, L.P., de Paula-Souza, D., 2005. Role of nitric oxide on motor behavior. *Cell Mol Neurobiol* 25, 371–392. <https://doi.org/10.1007/s10571-005-3065-8>
- DeLong, M.R., 1990. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci* 13, 281–285. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(90\)90110-v](https://doi.org/10.1016/0166-2236(90)90110-v)
- DeMartinis, N., Lopez, R.N., Pickering, E.H., Schmidt, C.J., Gertsik, L., Walling, D.P., Ogden, A., 2019. A Proof-of-Concept Study Evaluating the Phosphodiesterase 10A Inhibitor PF-02545920 in the Adjunctive Treatment of Suboptimally Controlled Symptoms of Schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol* 39, 318–328. <https://doi.org/10.1097/JCP.0000000000001047>
- Deng, P., Zhang, Y., Xu, Z.C., 2007. Involvement of Ih in Dopamine Modulation of Tonic Firing in Striatal Cholinergic Interneurons. *Journal of Neuroscience* 27, 3148–3156. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5535-06.2007>
- Dentresangle, C., Le Cavorsin, M., Savasta, M., Leviel, V., 2001. Increased extracellular DA and normal evoked DA release in the rat striatum after a partial lesion of the substantia nigra. *Brain Research* 893, 178–185. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)03311-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)03311-4)
- Depry, C., Allen, M.D., Zhang, J., 2011. Visualization of PKA activity in plasma membrane microdomains. *Mol. BioSyst.* 7, 52–58. <https://doi.org/10.1039/C0MB00079E>
- Descarries, L., Watkins, K.C., Garcia, S., Bosler, O., Doucet, G., 1996. Dual character, asynaptic and synaptic, of the dopamine innervation in adult rat neostriatum: a

- quantitative autoradiographic and immunocytochemical analysis. *J Comp Neurol* 375, 167–186. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19961111\)375:2<167::AID-CNE1>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19961111)375:2<167::AID-CNE1>3.0.CO;2-0)
- Deutsch, S.I., Rosse, R.B., Paul, S.M., Tomasino, V., Koetzner, L., Morn, C.B., Mastropaolo, J., 1996. 7-Nitroindazole and methylene blue, inhibitors of neuronal nitric oxide synthase and NO-stimulated guanylate cyclase, block MK-801-elicited behaviors in mice. *Neuropsychopharmacology* 15, 37–43. [https://doi.org/10.1016/0893-133X\(95\)00153-5](https://doi.org/10.1016/0893-133X(95)00153-5)
- Di Benedetto, G., Zoccarato, A., Lissandron, V., Terrin, A., Li, X., Houslay, M.D., Baillie, G.S., Zaccolo, M., 2008. Protein Kinase A Type I and Type II Define Distinct Intracellular Signaling Compartments. *Circulation Research* 103, 836–844. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.174813>
- Di Giovanni, G., Ferraro, G., Sardo, P., Galati, S., Esposito, E., La Grutta, V., 2003. Nitric oxide modulates striatal neuronal activity via soluble guanylyl cyclase: an in vivo microiontophoretic study in rats. *Synapse* 48, 100–107. <https://doi.org/10.1002/syn.10193>
- DiFrancesco, D., Tortora, P., 1991. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 351, 145–147. <https://doi.org/10.1038/351145a0>
- Ding, J., Guzman, J.N., Tkatch, T., Chen, S., Goldberg, J.A., Ebert, P.J., Levitt, P., Wilson, C.J., Hamm, H.E., Surmeier, D.J., 2006. RGS4-dependent attenuation of M4 autoreceptor function in striatal cholinergic interneurons following dopamine depletion. *Nat Neurosci* 9, 832–842. <https://doi.org/10.1038/nn1700>
- Ding, J.B., Guzman, J.N., Peterson, J.D., Goldberg, J.A., Surmeier, D.J., 2010. Thalamic Gating of Corticostriatal Signaling by Cholinergic Interneurons. *Neuron* 67, 294–307. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.06.017>
- Ding, J.-D., Burette, A., Nedvetsky, P.I., Schmidt, H.H.H.W., Weinberg, R.J., 2004. Distribution of soluble guanylyl cyclase in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 472, 437–448. <https://doi.org/10.1002/cne.20054>
- Ding, Y., Won, L., Britt, J.P., Lim, S.A.O., McGehee, D.S., Kang, U.J., 2011. Enhanced striatal cholinergic neuronal activity mediates L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 840–845. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006511108>
- Domek-Łopacińska, K., Strosznajder, J.B., 2008. The effect of selective inhibition of cyclic GMP hydrolyzing phosphodiesterases 2 and 5 on learning and memory processes and nitric oxide synthase activity in brain during aging. *Brain Research* 1216, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.02.108>
- Dostmann, W.R., Taylor, S.S., 1991. Identifying the molecular switches that determine whether (Rp)-cAMPS functions as an antagonist or an agonist in the activation of cAMP-dependent protein kinase I. *Biochemistry* 30, 8710–8716. <https://doi.org/10.1021/bi00099a032>
- Doucet, G., Descarries, L., Garcia, S., 1986. Quantification of the dopamine innervation in adult rat neostriatum. *Neuroscience* 19, 427–445. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(86\)90272-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(86)90272-1)
- Doummar, D., Dentel, C., Lyautey, R., Metreau, J., Keren, B., Drouot, N., Malherbe, L., Boullieret, V., Courraud, J., Valenti-Hirsch, M.P., Minotti, L., Dozieres-Puyravel, B., Bär, S., Scholly, J., Schaefer, E., Nava, C., Wirth, T., Nasser, H., de Salins, M.,

- de Saint Martin, A., Warde, M.T.A., Kahane, P., Hirsch, E., Anheim, M., Friant, S., Chelly, J., Mignot, C., Rudolf, G., 2020. Biallelic PDE2A variants: a new cause of syndromic paroxysmal dyskinesia. *Eur J Hum Genet* 28, 1403–1413. <https://doi.org/10.1038/s41431-020-0641-9>
- Drago, J., Padungchaichot, P., Wong, J.Y., Lawrence, A.J., McManus, J.F., Sumarsono, S.H., Natoli, A.L., Lakso, M., Wreford, N., Westphal, H., Kola, I., Finkelstein, D.I., 1998. Targeted expression of a toxin gene to D1 dopamine receptor neurons by cre-mediated site-specific recombination. *J Neurosci* 18, 9845–9857. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-23-09845.1998>
- Dupre, K.B., Eskow, K.L., Steiniger, A., Klioueva, A., Negron, G.E., Lormand, L., Park, J.Y., Bishop, C., 2008. Effects of coincident 5-HT1A receptor stimulation and NMDA receptor antagonism on L-DOPA-induced dyskinesia and rotational behaviors in the hemi-parkinsonian rat. *Psychopharmacology (Berl)* 199, 99–108. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1135-6>
- Durieux, P.F., Bearzatto, B., Guiducci, S., Buch, T., Waisman, A., Zoli, M., Schiffmann, S.N., de Kerchove d'Exaerde, A., 2009. D2R striatopallidal neurons inhibit both locomotor and drug reward processes. *Nat Neurosci* 12, 393–395. <https://doi.org/10.1038/nn.2286>
- Durieux, P.F., Schiffmann, S.N., de Kerchove d'Exaerde, A., 2012. Differential regulation of motor control and response to dopaminergic drugs by D1R and D2R neurons in distinct dorsal striatum subregions. *EMBO J* 31, 640–653. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.400>
- Ehrengruber, M.U., Lundstrom, K., Schweitzer, C., Heuss, C., Schlesinger, S., Gahwiler, B.H., 1999. Recombinant Semliki Forest virus and Sindbis virus efficiently infect neurons in hippocampal slice cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 7041–7046. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.12.7041>
- El-Husseini, A.E., Williams, J., Reiner, P.B., Pelech, S., Vincent, S.R., 1999. Localization of the cGMP-dependent protein kinases in relation to nitric oxide synthase in the brain. *J Chem Neuroanat* 17, 45–55. [https://doi.org/10.1016/s0891-0618\(99\)00023-x](https://doi.org/10.1016/s0891-0618(99)00023-x)
- El-Husseini, A.E.-D., Bladen, C., Vincent, S.R., 2002. Molecular Characterization of a Type II Cyclic GMP-Dependent Protein Kinase Expressed in the Rat Brain. *Journal of Neurochemistry* 64, 2814–2817. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.64062814.x>
- English, D.F., Ibanez-Sandoval, O., Stark, E., Tecuapetla, F., Buzsáki, G., Deisseroth, K., Tepper, J.M., Koos, T., 2011. GABAergic circuits mediate the reinforcement-related signals of striatal cholinergic interneurons. *Nat Neurosci* 15, 123–130. <https://doi.org/10.1038/nn.2984>
- Enjalbert, A., Bockaert, J., 1983. Pharmacological characterization of the D2 dopamine receptor negatively coupled with adenylate cyclase in rat anterior pituitary. *Mol Pharmacol* 23, 576–584.
- Enterría-Morales, D., del Rey, N.L.-G., Blesa, J., López-López, I., Gallet, S., Prévot, V., López-Barneo, J., d'Anglemont de Tassigny, X., 2020. Molecular targets for endogenous glial cell line-derived neurotrophic factor modulation in striatal parvalbumin interneurons. *Brain Communications* 2, fcaa105. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcaa105>

- Eve, D.J., Nisbet, A.P., Kingsbury, A.E., Hewson, E.L., Daniel, S.E., Lees, A.J., Marsden, C.D., Foster, O.J.F., 1998. Basal ganglia neuronal nitric oxide synthase mRNA expression in Parkinson's disease. *Molecular Brain Research* 63, 62–71. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(98\)00259-9](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(98)00259-9)
- Fearnley, J.M., Lees, A.J., 1991. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114 (Pt 5), 2283–2301. <https://doi.org/10.1093/brain/114.5.2283>
- Ferré, S., Bonaventura, J., Zhu, W., Hatcher-Solis, C., Taura, J., Quiroz, C., Cai, N.-S., Moreno, E., Casadó-Anguera, V., Kravitz, A.V., Thompson, K.R., Tomasi, D.G., Navarro, G., Cordero, A., Pardo, L., Lluís, C., Dessauer, C.W., Volkow, N.D., Casadó, V., Ciruela, F., Logothetis, D.E., Zwillig, D., 2018. Essential Control of the Function of the Striatopallidal Neuron by Pre-coupled Complexes of Adenosine A2A-Dopamine D2 Receptor Heterotetramers and Adenylyl Cyclase. *Front Pharmacol* 9, 243. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00243>
- Feyder, M., Södersten, E., Santini, E., Vialou, V., LaPlant, Q., Watts, E.L., Spigolon, G., Hansen, K., Caboche, J., Nestler, E.J., Fisone, G., 2016. A Role for Mitogen- and Stress-Activated Kinase 1 in L-DOPA –Induced Dyskinesia and Δ FosB Expression. *Biological Psychiatry* 79, 362–371. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.07.019>
- Fieblinger, T., Graves, S.M., Sebel, L.E., Alcacer, C., Plotkin, J.L., Gertler, T.S., Chan, C.S., Heiman, M., Greengard, P., Cenci, M.A., Surmeier, D.J., 2014. Cell type-specific plasticity of striatal projection neurons in parkinsonism and L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat Commun* 5, 5316. <https://doi.org/10.1038/ncomms6316>
- Fieblinger, T., Zanetti, L., Sebastianutto, I., Breger, L.S., Quintino, L., Lockowandt, M., Lundberg, C., Cenci, M.A., 2018. Striatonigral neurons divide into two distinct morphological-physiological phenotypes after chronic L-DOPA treatment in parkinsonian rats. *Sci Rep* 8, 10068. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28273-5>
- Fienberg, A.A., Hiroi, N., Mermelstein, P.G., Song, W., Snyder, G.L., Nishi, A., Cherman, A., O'Callaghan, J.P., Miller, D.B., Cole, D.G., Corbett, R., Haile, C.N., Cooper, D.C., Onn, S.P., Grace, A.A., Ouimet, C.C., White, F.J., Hyman, S.E., Surmeier, D.J., Girault, J., Nestler, E.J., Greengard, P., 1998. DARPP-32: regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. *Science* 281, 838–842. <https://doi.org/10.1126/science.281.5378.838>
- Fino, 2010. Spike-timing dependent plasticity in the striatum. *Front.Syna.Neurosci.* <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2010.00006>
- Fino, E., Glowinski, J., Venance, L., 2005. Bidirectional activity-dependent plasticity at corticostriatal synapses. *J Neurosci* 25, 11279–11287. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4476-05.2005>
- Fino, E., Vandecasteele, M., Perez, S., Saudou, F., Venance, L., 2018. Region-specific and state-dependent action of striatal GABAergic interneurons. *Nat Commun* 9, 3339. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05847-5>
- Florio, E., Serra, M., Lewis, R.G., Kramár, E., Freidberg, M., Wood, M., Morelli, M., Borrelli, E., 2022. D2R signaling in striatal spiny neurons modulates L-DOPA induced dyskinesia. *iScience* 25, 105263. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105263>

- Fonnum, F., Grofová, I., Rinvik, E., Storm-Mathisen, J., Walberg, F., 1974. Origin and distribution of glutamate decarboxylase in substantia nigra of the cat. *Brain Research* 71, 77–92. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(74\)90192-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(74)90192-9)
- Ford, C.P., 2014. The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission. *Neuroscience* 282, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.01.025>
- Francardo, V., Recchia, A., Popovic, N., Andersson, D., Nissbrandt, H., Cenci, M.A., 2011. Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease* 42, 327–340. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.01.024>
- Fredduzzi, S., Moratalla, R., Monopoli, A., Cuellar, B., Xu, K., Ongini, E., Impagnatiello, F., Schwarzschild, M.A., Chen, J.-F., 2002. Persistent Behavioral Sensitization to Chronic L-DOPA Requires A2A Adenosine Receptors. *J. Neurosci.* 22, 1054–1062. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-03-01054.2002>
- Freund, T.F., Powell, J.F., Smith, A.D., 1984. Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neuroscience* 13, 1189–1215. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(84\)90294-x](https://doi.org/10.1016/0306-4522(84)90294-x)
- Fujiyama, F., Sohn, J., Nakano, T., Furuta, T., Nakamura, K.C., Matsuda, W., Kaneko, T., 2011. Exclusive and common targets of neostriatofugal projections of rat striosome neurons: a single neuron-tracing study using a viral vector. *European Journal of Neuroscience* 33, 668–677. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07564.x>
- Gagnon, D., Petryszyn, S., Sanchez, M.G., Bories, C., Beaulieu, J.M., De Koninck, Y., Parent, A., Parent, M., 2017. Striatal Neurons Expressing D1 and D2 Receptors are Morphologically Distinct and Differently Affected by Dopamine Denervation in Mice. *Sci Rep* 7, 41432. <https://doi.org/10.1038/srep41432>
- Galati, S., D'angelo, V., Scarnati, E., Stanzione, P., Martorana, A., Procopio, T., Sancesario, G., Stefani, A., 2008. In vivo electrophysiology of dopamine-denervated striatum: focus on the nitric oxide/cGMP signaling pathway. *Synapse* 62, 409–420. <https://doi.org/10.1002/syn.20510>
- Garris, P.A., Ciolkowski, E.L., Pastore, P., Wightman, R.M., 1994. Efflux of dopamine from the synaptic cleft in the nucleus accumbens of the rat brain. *J Neurosci* 14, 6084–6093.
- Garris, P.A., Walker, Q.D., Wightman, R.M., 1997. Dopamine release and uptake rates both decrease in the partially denervated striatum in proportion to the loss of dopamine terminals. *Brain Research* 753, 225–234. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00003-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00003-6)
- Garthwaite, J., 2008. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci* 27, 2783–2802. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06285.x>
- Garthwaite, J., Boulton, C.L., 1995. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 57, 683–706. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.57.030195.003343>
- Gasser, C., Taiber, S., Yeh, C.-M., Wittig, C.H., Hegemann, P., Ryu, S., Wunder, F., Möglich, A., 2014. Engineering of a red-light-activated human cAMP/cGMP-

- specific phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 8803–8808. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321600111>
- Georgopoulos, A.P., DeLong, M.R., Crutcher, M.D., 1983. Relations between parameters of step-tracking movements and single cell discharge in the globus pallidus and subthalamic nucleus of the behaving monkey. *J. Neurosci.* 3, 1586–1598. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.03-08-01586.1983>
- Gerfen, C.R., 2003. D1 Dopamine Receptor Supersensitivity in the Dopamine-Depleted Striatum Animal Model of Parkinson’s Disease. *Neuroscientist* 9, 455–462. <https://doi.org/10.1177/1073858403255839>
- Gerfen, C.R., 1992. The Neostriatal Mosaic: Multiple Levels of Compartmental Organization in the Basal Ganglia. *Annual Review of Neuroscience* 15, 285–320. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.15.030192.001441>
- Gerfen, C.R., 1985. The neostriatal mosaic. I. compartmental organization of projections from the striatum to the substantia nigra in the rat. *J. Comp. Neurol.* 236, 454–476. <https://doi.org/10.1002/cne.902360404>
- Gerfen, C.R., 1984. The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature* 311, 461–464. <https://doi.org/10.1038/311461a0>
- Gerfen, C.R., Engber, T.M., Mahan, L.C., Susel, Z., Chase, T.N., Monsma, F.J., Sibley, D.R., 1990. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250, 1429–1432. <https://doi.org/10.1126/science.2147780>
- Gerfen, C.R., McGinty, J.F., Young, W.S., 1991. Dopamine differentially regulates dynorphin, substance P, and enkephalin expression in striatal neurons: in situ hybridization histochemical analysis. *J Neurosci* 11, 1016–1031. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11-04-01016.1991>
- German, D.C., Manaye, K.F., 1993. Midbrain dopaminergic neurons (nuclei A8, A9, and A10): three-dimensional reconstruction in the rat. *J Comp Neurol* 331, 297–309. <https://doi.org/10.1002/cne.903310302>
- Gertler, T.S., Chan, C.S., Surmeier, D.J., 2008. Dichotomous Anatomical Properties of Adult Striatal Medium Spiny Neurons. *Journal of Neuroscience* 28, 10814–10824. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2660-08.2008>
- Gervasi, N., Hepp, R., Tricoire, L., Zhang, J., Lambolez, B., Paupardin-Tritsch, D., Vincent, P., 2007. Dynamics of Protein Kinase A Signaling at the Membrane, in the Cytosol, and in the Nucleus of Neurons in Mouse Brain Slices. *Journal of Neuroscience* 27, 2744–2750. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5352-06.2007>
- Gervasi, N., Tchénio, P., Preat, T., 2010. PKA Dynamics in a Drosophila Learning Center: Coincidence Detection by Rutabaga Adenylyl Cyclase and Spatial Regulation by Dunce Phosphodiesterase. *Neuron* 65, 516–529. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.01.014>
- Gingrich, J.A., Caron, M.G., 1993. Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu Rev Neurosci* 16, 299–321. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.16.030193.001503>
- Giorgi, M., D’Angelo, V., Esposito, Z., Nuccetelli, V., Sorge, R., Martorana, A., Stefani, A., Bernardi, G., Sancesario, G., 2008. Lowered cAMP and cGMP signalling in the brain during levodopa-induced dyskinesias in hemiparkinsonian rats: new

- aspects in the pathogenetic mechanisms. *European Journal of Neuroscience* 28, 941–950. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06387.x>
- Giorgi, M., Melchiorri, G., Nuccetelli, V., D'Angelo, V., Martorana, A., Sorge, R., Castelli, V., Bernardi, G., Sancesario, G., 2011. PDE10A and PDE10A-dependent cAMP catabolism are dysregulated oppositely in striatum and nucleus accumbens after lesion of midbrain dopamine neurons in rat: A key step in parkinsonism physiopathology. *Neurobiology of Disease* 43, 293–303. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.04.006>
- Girasole, A.E., Lum, M.Y., Nathaniel, D., Bair-Marshall, C.J., Guenther, C.J., Luo, L., Kreitzer, A.C., Nelson, A.B., 2018. A Subpopulation of Striatal Neurons Mediates Levodopa-Induced Dyskinesia. *Neuron* 97, 787-795.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.01.017>
- Girault, J.-A., 2012. Signaling in striatal neurons: the phosphoproteins of reward, addiction, and dyskinesia. *Prog Mol Biol Transl Sci* 106, 33–62. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396456-4.00006-7>
- Girault, J.-A., Greengard, P., 2004. The neurobiology of dopamine signaling. *Arch Neurol* 61, 641–644. <https://doi.org/10.1001/archneur.61.5.641>
- Girault, J.-A., Nairn, A.C., 2021. Chapter Four - DARPP-32 40 years later, in: Zorn, S.H. (Ed.), *Advances in Pharmacology, A Tribute to Paul Greengard (1925-2019)*. Academic Press, pp. 67–87. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2020.09.004>
- Giros, B., Sokoloff, P., Martres, M.P., Riou, J.F., Emorine, L.J., Schwartz, J.C., 1989. Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. *Nature* 342, 923–926. <https://doi.org/10.1038/342923a0>
- Gittis, A.H., Kreitzer, A.C., 2012. Striatal microcircuitry and movement disorders. *Trends in Neurosciences* 35, 557–564. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.06.008>
- Gittis, A.H., Nelson, A.B., Thwin, M.T., Palop, J.J., Kreitzer, A.C., 2010. Distinct Roles of GABAergic Interneurons in the Regulation of Striatal Output Pathways. *Journal of Neuroscience* 30, 2223–2234. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4870-09.2010>
- Glatt, C.E., Snyder, S.H., 1993. Cloning and expression of an adenylyl cyclase localized to the corpus striatum. *Nature* 361, 536–538. <https://doi.org/10.1038/361536a0>
- Gloerich, M., Bos, J.L., 2010. Epac: Defining a New Mechanism for cAMP Action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50, 355–375. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105714>
- Goldberg, J.A., Teagarden, M.A., Foehring, R.C., Wilson, C.J., 2009. Nonequilibrium calcium dynamics regulate the autonomous firing pattern of rat striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 29, 8396–8407. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5582-08.2009>
- Goldberg, J.A., Wilson, C.J., 2005. Control of spontaneous firing patterns by the selective coupling of calcium currents to calcium-activated potassium currents in striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 25, 10230–10238. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2734-05.2005>
- Gomez, L., Breitenbucher, J.G., 2013. PDE2 inhibition: Potential for the treatment of cognitive disorders. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 23, 6522–6527. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.10.014>
- Gonon, F., Burie, J.B., Jaber, M., Benoit-Marand, M., Dumartin, B., Bloch, B., 2000. Geometry and kinetics of dopaminergic transmission in the rat striatum and in

- mice lacking the dopamine transporter, in: *Progress in Brain Research*. Elsevier, pp. 291–302. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(00\)25018-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(00)25018-8)
- Grace, A., Bunney, B., 1984. The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *J Neurosci* 4, 2877–2890. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.04-11-02877.1984>
- Grace, A.A., Bunney, B.S., 1984. The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *J. Neurosci.* 4, 2866–2876. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.04-11-02866.1984>
- Grace, A.A., Bunney, B.S., 1983. Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--1. Identification and characterization. *Neuroscience* 10, 301–315. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(83\)90135-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(83)90135-5)
- Grauer, S.M., Pulito, V.L., Navarra, R.L., Kelly, M.P., Kelley, C., Graf, R., Langen, B., Logue, S., Brennan, J., Jiang, L., Charych, E., Egerland, U., Liu, F., Marquis, K.L., Malamas, M., Hage, T., Comery, T.A., Brandon, N.J., 2009. Phosphodiesterase 10A Inhibitor Activity in Preclinical Models of the Positive, Cognitive, and Negative Symptoms of Schizophrenia. *J Pharmacol Exp Ther* 331, 574–590. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.155994>
- Graves, S.M., Surmeier, D.J., 2019. Delayed Spine Pruning of Direct Pathway Spiny Projection Neurons in a Mouse Model of Parkinson’s Disease. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 32. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00032>
- Graybiel, A.M., 2008. Habits, rituals, and the evaluative brain. *Annu Rev Neurosci* 31, 359–387. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112851>
- Graybiel, A.M., Ragsdale, C.W., 1978. Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkeys, and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase staining. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 5723–5726.
- Graybiel, A.M., Ragsdale, C.W., Yoneoka, E.S., Elde, R.P., 1981. An immunohistochemical study of enkephalins and other neuropeptides in the striatum of the cat with evidence that the opiate peptides are arranged to form mosaic patterns in register with the striosomal compartments visible by acetylcholinesterase staining. *Neuroscience* 6, 377–397. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(81\)90131-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(81)90131-7)
- Grillner, S., Robertson, B., Stephenson-Jones, M., 2013. The evolutionary origin of the vertebrate basal ganglia and its role in action selection. *J Physiol* 591, 5425–5431. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.246660>
- Gritton, H.J., Howe, W.M., Romano, M.F., DiFelicantonio, A.G., Kramer, M.A., Saligrama, V., Bucklin, M.E., Zemel, D., Han, X., 2019. Unique contributions of parvalbumin and cholinergic interneurons in organizing striatal networks during movement. *Nat Neurosci* 22, 586–597. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0341-3>
- Gross-Langenhoff, M., Hofbauer, K., Weber, J., Schultz, A., Schultz, J.E., 2006. cAMP Is a Ligand for the Tandem GAF Domain of Human Phosphodiesterase 10 and cGMP for the Tandem GAF Domain of Phosphodiesterase 11*. *Journal of Biological Chemistry* 281, 2841–2846. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511468200>
- Groves, P.M., Garcia-Munoz, M., Linder, J.C., Manley, M.S., Martone, M.E., Young, S.J., 1995. Elements of the intrinsic organization and information processing in the neostriatum, in: *Models of Information Processing in the Basal Ganglia, Computational Neuroscience*. The MIT Press, Cambridge, MA, US, pp. 51–96.

- Groves, P.M., Linder, J.C., Young, S.J., 1994. 5-hydroxydopamine-labeled dopaminergic axons: three-dimensional reconstructions of axons, synapses and postsynaptic targets in rat neostriatum. *Neuroscience* 58, 593–604. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90084-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90084-1)
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y., 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260, 3440–3450.
- Guevara-Guzman, R., Emson, P.C., Kendrick, K.M., 1994. Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP. *J Neurochem* 62, 807–810. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.62020807.x>
- Guigoni, C., Dovero, S., Aubert, I., Li, Q., Bioulac, B.H., Bloch, B., Gurevich, E.V., Gross, C.E., Bezard, E., 2005. Levodopa-induced dyskinesia in MPTP-treated macaques is not dependent on the extent and pattern of nigrostriatal lesioning. *Eur J Neurosci* 22, 283–287. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04196.x>
- Guimarães, R.P., Ribeiro, D.L., Dos Santos, K.B., Talarico, C.H.Z., Godoy, L.D., Padovan-Neto, F.E., 2022. Phosphodiesterase 10A Inhibition Modulates the Corticostriatal Activity and L-DOPA-Induced Dyskinesia. *Pharmaceuticals (Basel)* 15, 947. <https://doi.org/10.3390/ph15080947>
- Guitart, X., Moreno, E., Rea, W., Sánchez-Soto, M., Cai, N.-S., Quiroz, C., Kumar, V., Bourque, L., Cortés, A., Canela, E.I., Bishop, C., Newman, A.H., Casadó, V., Ferré, S., 2019. Biased G Protein-Independent Signaling of Dopamine D1-D3 Receptor Heteromers in the Nucleus Accumbens. *Mol Neurobiol* 56, 6756–6769. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1564-8>
- Guitart, X., Navarro, G., Moreno, E., Yano, H., Cai, N.-S., Sánchez-Soto, M., Kumar-Barodia, S., Naidu, Y.T., Mallol, J., Cortés, A., Lluís, C., Canela, E.I., Casadó, V., McCormick, P.J., Ferré, S., 2014. Functional Selectivity of Allosteric Interactions within G Protein–Coupled Receptor Oligomers: The Dopamine D1-D3 Receptor Heterotetramer. *Mol Pharmacol* 86, 417–429. <https://doi.org/10.1124/mol.114.093096>
- Guo, Q., Wang, D., He, X., Feng, Q., Lin, R., Xu, F., Fu, L., Luo, M., 2015. Whole-brain mapping of inputs to projection neurons and cholinergic interneurons in the dorsal striatum. *PLoS One* 10, e0123381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123381>
- Guridi, J., González-Redondo, R., Obeso, J.A., 2012. Clinical Features, Pathophysiology, and Treatment of Levodopa-Induced Dyskinesias in Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease* 2012, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2012/943159>
- Gustafson, E.L., Ehrlich, M.E., Trivedi, P., Greengard, P., 1992. Developmental regulation of phosphoprotein gene expression in the caudate-putamen of rat: an in situ hybridization study. *Neuroscience* 51, 65–75. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90471-d](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90471-d)
- Handa, N., Mizohata, E., Kishishita, S., Toyama, M., Morita, S., Uchikubo-Kamo, T., Akasaka, R., Omori, K., Kotera, J., Terada, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S., 2008. Crystal Structure of the GAF-B Domain from Human Phosphodiesterase 10A Complexed with Its Ligand, cAMP*. *Journal of Biological Chemistry* 283, 19657–19664. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800595200>
- Harrison, S.A., Reifsnnyder, D., Gallis, B., Cadd, G., Beavo, J., 1986. Isolation and characterization of bovine cardiac muscle cGMP-inhibited phosphodiesterase: a receptor for new cardiotoxic drugs. *Molecular pharmacology*.

- Hart, A.S., Rutledge, R.B., Glimcher, P.W., Phillips, P.E.M., 2014. Phasic dopamine release in the rat nucleus accumbens symmetrically encodes a reward prediction error term. *J Neurosci* 34, 698–704. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2489-13.2014>
- Hasbi, A., Fan, T., Alijaniam, M., Nguyen, T., Perreault, M.L., O'Dowd, B.F., George, S.R., 2009. Calcium signaling cascade links dopamine D1–D2 receptor heteromer to striatal BDNF production and neuronal growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 21377–21382. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903676106>
- Hasbi, A., Madras, B.K., Bergman, J., Kohut, S., Lin, Z., Withey, S.L., George, S.R., 2020. Δ -Tetrahydrocannabinol Increases Dopamine D1-D2 Receptor Heteromer and Elicits Phenotypic Reprogramming in Adult Primate Striatal Neurons. *iScience* 23, 100794. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.100794>
- Hauser, A.S., Attwood, M.M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H.B., Gloriam, D.E., 2017. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov* 16, 829–842. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.178>
- Haushalter, K.J., Casteel, D.E., Raffener, A., Stefan, E., Patel, H.H., Taylor, S.S., 2018. Phosphorylation of protein kinase A (PKA) regulatory subunit R1 α by protein kinase G (PKG) primes PKA for catalytic activity in cells. *J Biol Chem* 293, 4411–4421. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.809988>
- Hayashi, Y., Shi, S.H., Esteban, J.A., Piccini, A., Poncer, J.C., Malinow, R., 2000. Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* 287, 2262–2267. <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2262>
- Hemmings, H.C., Greengard, P., Tung, H.Y.L., Cohen, P., 1984. DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature* 310, 503–505. <https://doi.org/10.1038/310503a0>
- Henry, B., Duty, S., Fox, S.H., Crossman, A.R., Brotchie, J.M., 2003. Increased striatal preproenkephalin B expression is associated with dyskinesia in Parkinson's disease. *Exp Neurol* 183, 458–468. [https://doi.org/10.1016/s0014-4886\(03\)00064-5](https://doi.org/10.1016/s0014-4886(03)00064-5)
- Herberg, F.W., Maleszka, A., Eide, T., Vossebein, L., Tasken, K., 2000. Analysis of A-kinase anchoring protein (AKAP) interaction with protein kinase A (PKA) regulatory subunits: PKA isoform specificity in AKAP binding. *J Mol Biol* 298, 329–339. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3662>
- Herget, S., Lohse, M.J., Nikolaev, V.O., 2008. Real-time monitoring of phosphodiesterase inhibition in intact cells. *Cell Signal* 20, 1423–1431. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.03.011>
- Herkenham, M., Pert, C.B., 1981. Mosaic distribution of opiate receptors, parafascicular projections and acetylcholinesterase in rat striatum. *Nature* 291, 415–418. <https://doi.org/10.1038/291415a0>
- Hernández-Flores, T., Hernández-González, O., Pérez-Ramírez, M.B., Lara-González, E., Arias-García, M.A., Duhne, M., Pérez-Burgos, A., Prieto, G.A., Figueroa, A., Galarraga, E., Bargas, J., 2015. Modulation of direct pathway striatal projection neurons by muscarinic M4-type receptors. *Neuropharmacology* 89, 232–244. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.09.028>
- Hersch, S.M., Ciliax, B.J., Gutekunst, C.A., Rees, H.D., Heilman, C.J., Yung, K.K., Bolam, J.P., Ince, E., Yi, H., Levey, A.I., 1995. Electron microscopic analysis of D1 and D2

- dopamine receptor proteins in the dorsal striatum and their synaptic relationships with motor corticostriatal afferents. *J Neurosci* 15, 5222–5237.
- Hersch, S.M., Gutekunst, C.A., Rees, H.D., Heilman, C.J., Levey, A.I., 1994. Distribution of m1-m4 muscarinic receptor proteins in the rat striatum: light and electron microscopic immunocytochemistry using subtype-specific antibodies. *J. Neurosci.* 14, 3351–3363. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-05-03351.1994>
- Hervé, D., Lévi-Strauss, M., Marey-Semper, I., Verney, C., Tassin, J.P., Glowinski, J., Girault, J.A., 1993. G(olf) and Gs in rat basal ganglia: possible involvement of G(olf) in the coupling of dopamine D1 receptor with adenylyl cyclase. *J Neurosci* 13, 2237–2248. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-05-02237.1993>
- Herve, D., Trovero, F., Blanc, G., Thierry, A.M., Glowinski, J., Tassin, J.P., 1989. Nondopaminergic prefrontocortical efferent fibers modulate D1 receptor denervation supersensitivity in specific regions of the rat striatum. *J. Neurosci.* 9, 3699–3708. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-11-03699.1989>
- Hiroi, N., Fienberg, A.A., Haile, C.N., Alburges, M., Hanson, G.R., Greengard, P., Nestler, E.J., 1999. Neuronal and behavioural abnormalities in striatal function in DARPP-32-mutant mice. *Eur J Neurosci* 11, 1114–1118. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00570.x>
- Hollerman, J.R., Grace, A.A., 1990. The effects of dopamine-depleting brain lesions on the electrophysiological activity of rat substantia nigra dopamine neurons. *Brain Res* 533, 203–212. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91341-d](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91341-d)
- Hong, J.Y., Oh, J.S., Lee, I., Sunwoo, M.K., Ham, J.H., Lee, J.E., Sohn, Y.H., Kim, J.S., Lee, P.H., 2014. Presynaptic dopamine depletion predicts levodopa-induced dyskinesia in de novo Parkinson disease. *Neurology* 82, 1597–1604. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000385>
- Hoque, K.E., Indorkar, R.P., Sammut, S., West, A.R., 2010. Impact of dopamine-glutamate interactions on striatal neuronal nitric oxide synthase activity. *Psychopharmacology (Berl)* 207, 571–581. <https://doi.org/10.1007/s00213-009-1687-0>
- Houslay, M.D., Adams, D.R., 2003. PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochemical Journal* 370, 1–18. <https://doi.org/10.1042/bj20021698>
- Howard, C.D., Keefe, K.A., Garris, P.A., Daberkow, D.P., 2011. Methamphetamine neurotoxicity decreases phasic, but not tonic, dopaminergic signaling in the rat striatum. *J Neurochem* 118, 668–676. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07342.x>
- Howard, C.D., Pastuzyn, E.D., Barker-Haliski, M.L., Garris, P.A., Keefe, K.A., 2013. Phasic-like stimulation of the medial forebrain bundle augments striatal gene expression despite methamphetamine-induced partial dopamine denervation. *J Neurochem* 125, 555–565. <https://doi.org/10.1111/jnc.12234>
- Howe, A., Surmeier, D., 1995. Muscarinic receptors modulate N-, P-, and L-type Ca²⁺ currents in rat striatal neurons through parallel pathways. *J. Neurosci.* 15, 458–469. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-01-00458.1995>
- Hu, E., Demmou, L., Cauli, B., Gallopin, T., Geoffroy, H., Harris-Warrick, R.M., Paupardin-Tritsch, D., Lambollez, B., Vincent, P., Hepp, R., 2011. VIP, CRF, and PACAP Act at

- Distinct Receptors to Elicit Different cAMP/PKA Dynamics in the Neocortex. *Cerebral Cortex* 21, 708–718. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhq143>
- Hung, S.-H., Zhang, W., Pixley, R.A., Jameson, B.A., Huang, Y.C., Colman, R.F., Colman, R.W., 2006. New Insights from the Structure-Function Analysis of the Catalytic Region of Human Platelet Phosphodiesterase 3A: A ROLE FOR THE UNIQUE 44-AMINO ACID INSERT *. *Journal of Biological Chemistry* 281, 29236–29244. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606558200>
- Hurley, M.J., Mash, D.C., Jenner, P., 2001. Dopamine D(1) receptor expression in human basal ganglia and changes in Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 87, 271–279. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(01\)00022-5](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(01)00022-5)
- Hyland, B.I., Reynolds, J.N.J., Hay, J., Perk, C.G., Miller, R., 2002. Firing modes of midbrain dopamine cells in the freely moving rat. *Neuroscience* 114, 475–492. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00267-1](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00267-1)
- Ince, E., Ciliax, B.J., Levey, A.I., 1997. Differential expression of D1 and D2 dopamine and m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in identified striatonigral neurons. *Synapse* 27, 357–366. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(199712\)27:4<357::AID-SYN9>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(199712)27:4<357::AID-SYN9>3.0.CO;2-B)
- Ingham, C.A., Hood, S.H., Arbuthnott, G.W., 1989. Spine density on neostriatal neurones changes with 6-hydroxydopamine lesions and with age. *Brain Res* 503, 334–338. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)91686-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)91686-7)
- Itokawa, K., Ohkuma, A., Araki, N., Tamura, N., Shimazu, K., 2006. Effect of L-DOPA on nitric oxide production in striatum of freely mobile mice. *Neurosci Lett* 402, 142–144. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.03.064>
- Jacobowitz, D.M., Winsky, L., 1991. Immunocytochemical localization of calretinin in the forebrain of the rat. *J Comp Neurol* 304, 198–218. <https://doi.org/10.1002/cne.903040205>
- Jäger, R., Russwurm, C., Schwede, F., Genieser, H.-G., Koesling, D., Russwurm, M., 2012. Activation of PDE10 and PDE11 Phosphodiesterases*. *Journal of Biological Chemistry* 287, 1210–1219. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.263806>
- Jäger, R., Schwede, F., Genieser, H.-G., Koesling, D., Russwurm, M., 2010. Activation of PDE2 and PDE5 by specific GAF ligands: delayed activation of PDE5: GAF ligands of PDE2 and PDE5. *British Journal of Pharmacology* 161, 1645–1660. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00977.x>
- Jagmag, S.A., Tripathi, N., Shukla, S.D., Maiti, S., Khurana, S., 2016. Evaluation of Models of Parkinson's Disease. *Frontiers in Neuroscience* 9.
- James Surmeier, D., Bargas, J., Kitai, S.T., 1989. Two types of A-current differing in voltage-dependence are expressed by neurons of the rat neostriatum. *Neuroscience Letters* 103, 331–337. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(89\)90122-5](https://doi.org/10.1016/0304-3940(89)90122-5)
- Jewett, D.C., Butelman, E.R., Woods, J.H., 1996. Nitric oxide synthase inhibitors produce phencyclidine-like behavioral effects in pigeons. *Brain Res* 715, 25–31. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01328-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01328-8)
- Jiang, H., Shabb, J.B., Corbin, J.D., 1992. Cross-activation: overriding cAMP/cGMP selectivities of protein kinases in tissues. *Biochem Cell Biol* 70, 1283–1289. <https://doi.org/10.1139/o92-175>
- Jin, X., Costa, R.M., 2010. Start/stop signals emerge in nigrostriatal circuits during sequence learning. *Nature* 466, 457–462. <https://doi.org/10.1038/nature09263>

- Jones, S.R., Gainetdinov, R.R., Jaber, M., Giros, B., Wightman, R.M., Caron, M.G., 1998. Profound neuronal plasticity in response to inactivation of the dopamine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 4029–4034. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.4029>
- Jones-Tabah, J., Mohammad, H., Hadj-Youssef, S., Kim, L.E.H., Martin, R.D., Benaliouad, F., Tanny, J.C., Clarke, P.B.S., Hébert, T.E., 2020. Dopamine D1 receptor signalling in dyskinetic Parkinsonian rats revealed by fiber photometry using FRET-based biosensors. *Sci Rep* 10, 14426. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71121-8>
- Joshua, M., Adler, A., Mitelman, R., Vaadia, E., Bergman, H., 2008. Midbrain dopaminergic neurons and striatal cholinergic interneurons encode the difference between reward and aversive events at different epochs of probabilistic classical conditioning trials. *J Neurosci* 28, 11673–11684. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3839-08.2008>
- Jurevicius, J., Fischmeister, R., 1996. cAMP compartmentation is responsible for a local activation of cardiac Ca²⁺ channels by beta-adrenergic agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 295–299. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.1.295>
- Kalanithi, P.S.A., Zheng, W., Kataoka, Y., DiFiglia, M., Grantz, H., Saper, C.B., Schwartz, M.L., Leckman, J.F., Vaccarino, F.M., 2005. Altered parvalbumin-positive neuron distribution in basal ganglia of individuals with Tourette syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13307–13312. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502624102>
- Katzenschlager, R., Hughes, A., Evans, A., Manson, A.J., Hoffman, M., Swinn, L., Watt, H., Bhatia, K., Quinn, N., Lees, A.J., 2005. Continuous subcutaneous apomorphine therapy improves dyskinesias in Parkinson's disease: a prospective study using single-dose challenges. *Mov Disord* 20, 151–157. <https://doi.org/10.1002/mds.20276>
- Katzenschlager, R., Sampaio, C., Costa, J., Lees, A., 2003. Anticholinergics for symptomatic management of Parkinson's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2002, CD003735. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003735>
- Kaufman, D.M., Milstein, M.J., 2013. Neurotransmitters and Drug Abuse, in: Kaufman's Clinical Neurology for Psychiatrists. Elsevier, pp. 501–525. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7234-3748-2.00021-9>
- Kaupp, U.B., Seifert, R., 2001. Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu Rev Physiol* 63, 235–257. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.63.1.235>
- Kawagoe, K.T., Garris, P.A., Wiedemann, D.J., Wightman, R.M., 1992. Regulation of transient dopamine concentration gradients in the microenvironment surrounding nerve terminals in the rat striatum. *Neuroscience* 51, 55–64. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90470-M](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90470-M)
- Kawaguchi, Y., 1993. Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J. Neurosci.* 13, 4908–4923. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-11-04908.1993>
- Kawaguchi, Y., 1992. Large aspiny cells in the matrix of the rat neostriatum in vitro: physiological identification, relation to the compartments and excitatory postsynaptic currents. *J Neurophysiol* 67, 1669–1682. <https://doi.org/10.1152/jn.1992.67.6.1669>
- Kawaguchi, Y., Wilson, C.J., Augood, S.J., Emson, P.C., 1995. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization 9.

- Kawaguchi, Y., Wilson, C.J., Emson, P.C., 1989. Intracellular recording of identified neostriatal patch and matrix spiny cells in a slice preparation preserving cortical inputs. *J Neurophysiol* 62, 1052–1068. <https://doi.org/10.1152/jn.1989.62.5.1052>
- Kawasaki, H., Springett, G.M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D.E., Graybiel, A.M., 1998. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* 282, 2275–2279. <https://doi.org/10.1126/science.282.5397.2275>
- Ke, H., Wang, H., 2007. Crystal Structures of Phosphodiesterases and Implications on Substrate Specificity and Inhibitor Selectivity. *CTMC* 7, 391–403. <https://doi.org/10.2174/156802607779941242>
- Kebabian, J.W., Calne, D.B., 1979. Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277, 93–96. <https://doi.org/10.1038/277093a0>
- Kebabian, J.W., Greengard, P., 1971. Dopamine-sensitive adenyl cyclase: possible role in synaptic transmission. *Science* 174, 1346–1349. <https://doi.org/10.1126/science.174.4016.1346>
- Kelly, M.P., Adamowicz, W., Bove, S., Hartman, A.J., Mariga, A., Pathak, G., Reinhart, V., Romegialli, A., Kleiman, R.J., 2014. Select 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases exhibit altered expression in the aged rodent brain. *Cellular Signalling* 26, 383–397. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.10.007>
- Kemp, J.M., Powell, T.P., 1971a. The structure of the caudate nucleus of the cat: light and electron microscopy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 262, 383–401. <https://doi.org/10.1098/rstb.1971.0102>
- Kemp, J.M., Powell, T.P., 1971b. The termination of fibres from the cerebral cortex and thalamus upon dendritic spines in the caudate nucleus: a study with the Golgi method. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 262, 429–439. <https://doi.org/10.1098/rstb.1971.0105>
- Keravis, T., Lugnier, C., 2012. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. *Br J Pharmacol* 165, 1288–1305. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01729.x>
- Kerr, J. n. d., Wickens, J.R., 2001. Dopamine D-1/D-5 Receptor Activation Is Required for Long-Term Potentiation in the Rat Neostriatum In Vitro. *Journal of Neurophysiology* 85, 117–124. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.85.1.117>
- Ketzef, M., Spigolon, G., Johansson, Y., Bonito-Oliva, A., Fisone, G., Silberberg, G., 2017. Dopamine Depletion Impairs Bilateral Sensory Processing in the Striatum in a Pathway-Dependent Manner. *Neuron* 94, 855–865.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.05.004>
- Kheirbek, M.A., Britt, J.P., Beeler, J.A., Ishikawa, Y., McGehee, D.S., Zhuang, X., 2009. Adenylyl Cyclase Type 5 Contributes to Corticostriatal Plasticity and Striatum-Dependent Learning. *Journal of Neuroscience* 29, 12115–12124. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3343-09.2009>
- Kim, D.S., Szczycka, M.S., Palmiter, R.D., 2000. Dopamine-deficient mice are hypersensitive to dopamine receptor agonists. *J Neurosci* 20, 4405–4413. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-12-04405.2000>
- Kim, J., Barath, A.S., Rusheen, A.E., Rojas Cabrera, J.M., Price, J.B., Shin, H., Goyal, A., Yuen, J.W., Jondal, D.E., Blaha, C.D., Lee, K.H., Jang, D.P., Oh, Y., 2021. Automatic

- and Reliable Quantification of Tonic Dopamine Concentrations In Vivo Using a Novel Probabilistic Inference Method. *ACS Omega* 6, 6607–6613. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c05217>
- Kirik, D., Rosenblad, C., Björklund, A., 1998. Characterization of Behavioral and Neurodegenerative Changes Following Partial Lesions of the Nigrostriatal Dopamine System Induced by Intrastratial 6-Hydroxydopamine in the Rat. *Experimental Neurology* 152, 259–277. <https://doi.org/10.1006/exnr.1998.6848>
- Kirstein, M., Rivet-Bastide, M., Hatem, S., Bénardeau, A., Mercadier, J.J., Fischmeister, R., 1995. Nitric oxide regulates the calcium current in isolated human atrial myocytes. *J. Clin. Invest.* 95, 794–802. <https://doi.org/10.1172/JCI117729>
- Kita, H., Kitai, S.T., 1988. Glutamate decarboxylase immunoreactive neurons in rat neostriatum: their morphological types and populations. *Brain Res* 447, 346–352. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)91138-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)91138-9)
- Kita, T., Kita, H., Kitai, S.T., 1984. Passive electrical membrane properties of rat neostriatal neurons in an in vitro slice preparation. *Brain Research* 300, 129–139. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)91347-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)91347-7)
- Klarenbeek, J., Goedhart, J., van Batenburg, A., Groenewald, D., Jalink, K., 2015. Fourth-generation epac-based FRET sensors for cAMP feature exceptional brightness, photostability and dynamic range: characterization of dedicated sensors for FLIM, for ratiometry and with high affinity. *PLoS One* 10, e0122513. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122513>
- Klein, M.O., Battagello, D.S., Cardoso, A.R., Hauser, D.N., Bittencourt, J.C., Correa, R.G., 2019. Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cell Mol Neurobiol* 39, 31–59. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0632-3>
- Kölliker, A., 1889. *Handbuch der Gewebelehre des Menschen*. Bd. II. Kengelman, Leipzig.
- Kosillo, P., Zhang, Y.-F., Threlfell, S., Cragg, S.J., 2016. Cortical Control of Striatal Dopamine Transmission via Striatal Cholinergic Interneurons. *Cereb. Cortex* 26, 4160–4169. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhw252>
- Kotera, J., Fujishige, K., Yuasa, K., Omori, K., 1999. Characterization and Phosphorylation of PDE10A2, a Novel Alternative Splice Variant of Human Phosphodiesterase That Hydrolyzes cAMP and cGMP. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 261, 551–557. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1013>
- Kotera, J., Sasaki, T., Kobayashi, T., Fujishige, K., Yamashita, Y., Omori, K., 2004. Subcellular localization of cyclic nucleotide phosphodiesterase type 10A variants, and alteration of the localization by cAMP-dependent protein kinase-dependent phosphorylation. *J Biol Chem* 279, 4366–4375. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308471200>
- Kravitz, A.V., Freeze, B.S., Parker, P.R.L., Kay, K., Thwin, M.T., Deisseroth, K., Kreitzer, A.C., 2010. Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466, 622–626. <https://doi.org/10.1038/nature09159>
- Krebs, M.O., Desce, J.M., Kemel, M.L., Gauchy, C., Godeheu, G., Cheramy, A., Glowinski, J., 1991. Glutamatergic control of dopamine release in the rat striatum: evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate receptors on dopaminergic nerve terminals. *J Neurochem* 56, 81–85. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb02565.x>

- Kreitzer, A.C., 2009. Physiology and Pharmacology of Striatal Neurons. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 127–147. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135422>
- Kreitzer, A.C., Malenka, R.C., 2007. Endocannabinoid-mediated rescue of striatal LTD and motor deficits in Parkinson's disease models. *Nature* 445, 643–647. <https://doi.org/10.1038/nature05506>
- Kreitzer, A.C., Malenka, R.C., 2005. Dopamine Modulation of State-Dependent Endocannabinoid Release and Long-Term Depression in the Striatum. *J Neurosci* 25, 10537–10545. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2959-05.2005>
- Kress, G.J., Yamawaki, N., Wokosin, D.L., Wickersham, I.R., Shepherd, G.M.G., Surmeier, D.J., 2013. Convergent cortical innervation of striatal projection neurons. *Nat Neurosci* 16, 665–667. <https://doi.org/10.1038/nn.3397>
- Krzaścik, P., Kostowski, W., 1997. Nitric oxide donors antagonize N-nitro-L-arginine and haloperidol catalepsy: potential implication for the treatment of Parkinsonism. *Pol J Pharmacol* 49, 263–266.
- Kubota, Y., Inagaki, S., Shimada, S., Kito, S., Eckenstein, F., Tohyama, M., 1987. Neostriatal cholinergic neurons receive direct synaptic inputs from dopaminergic axons. *Brain Res* 413, 179–184. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)90167-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)90167-3)
- Kubota, Y., Mikawa, S., Kawaguchi, Y., 1993. Neostriatal GABAergic interneurons contain NOS, calretinin or parvalbumin. *Neuroreport* 5, 205–208. <https://doi.org/10.1097/00001756-199312000-00004>
- Lakics, V., Karran, E.H., Boess, F.G., 2010. Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. *Neuropharmacology* 59, 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.05.004>
- Langston, J.W., 2017. The MPTP Story. *J Parkinsons Dis* 7, S11–S19. <https://doi.org/10.3233/JPD-179006>
- Lapper, S.R., Bolam, J.P., 1992. Input from the frontal cortex and the parafascicular nucleus to cholinergic interneurons in the dorsal striatum of the rat. *Neuroscience* 51, 533–545. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90293-b](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90293-b)
- Lau, J.K.-C., Cheng, Y.-K., 2012. An update view on the substrate recognition mechanism of phosphodiesterases: a computational study of PDE10 and PDE4 bound with cyclic nucleotides. *Biopolymers* 97, 910–922. <https://doi.org/10.1002/bip.22104>
- Laverne, G., Pesce, J., Reynders, A., Combrisson, E., Gascon, E., Melon, C., Kerkerian-Le Goff, L., Maurice, N., Beurrier, C., 2022. Cholinergic interneuron inhibition potentiates corticostriatal transmission in direct medium spiny neurons and rescues motor learning in parkinsonism. *Cell Rep* 40, 111034. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111034>
- Le Moine, C., Tison, F., Bloch, B., 1990. D2 dopamine receptor gene expression by cholinergic neurons in the rat striatum. *Neuroscience Letters* 117, 248–252. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(90\)90671-U](https://doi.org/10.1016/0304-3940(90)90671-U)
- Lebel, M., Chagniel, L., Bureau, G., Cyr, M., 2010. Striatal inhibition of PKA prevents levodopa-induced behavioural and molecular changes in the hemiparkinsonian rat. *Neurobiology of Disease* 38, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.12.027>
- Lee, K., 2021. Epac: new emerging cAMP-binding protein. *BMB Rep.* 54, 149–156. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2021.54.3.233>
- Lee, S.P., So, C.H., Rashid, A.J., Varghese, G., Cheng, R., Lança, A.J., O'Dowd, B.F., George, S.R., 2004. Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel

- phospholipase C-mediated calcium signal. *J Biol Chem* 279, 35671–35678. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401923200>
- Lerner, T.N., Kreitzer, A.C., 2012. RGS4 is required for dopaminergic control of striatal LTD and susceptibility to parkinsonian motor deficits. *Neuron* 73, 347–359. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.015>
- Levey, A.I., Kitt, C.A., Simonds, W.F., Price, D.L., Brann, M.R., 1991. Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *J Neurosci* 11, 3218–3226. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11-10-03218.1991>
- Li, L., Gervasi, N., Girault, J.-A., 2015. Dendritic geometry shapes neuronal cAMP signalling to the nucleus. *Nat Commun* 6, 6319. <https://doi.org/10.1038/ncomms7319>
- Liang, L., DeLong, M.R., Papa, S.M., 2008. Inversion of dopamine responses in striatal medium spiny neurons and involuntary movements. *J Neurosci* 28, 7537–7547. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1176-08.2008>
- Lieberman, O.J., McGuirt, A.F., Mosharov, E.V., Pigulevskiy, I., Hobson, B.D., Choi, S., Frier, M.D., Santini, E., Borgkvist, A., Sulzer, D., 2018. Dopamine Triggers the Maturation of Striatal Spiny Projection Neuron Excitability during a Critical Period. *Neuron* 99, 540–554.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.06.044>
- Lillrank, S.M., Lipska, B.K., Weinberger, D.R., Fredholm, B.B., Fuxe, K., Ferré, S., 1999. Adenosine and dopamine receptor antagonist binding in the rat ventral and dorsal striatum: lack of changes after a neonatal bilateral lesion of the ventral hippocampus. *Neurochemistry International* 34, 235–244. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(99\)00008-X](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(99)00008-X)
- Lim, J., Pahlke, G., Conti, M., 1999. Activation of the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D3 by phosphorylation. Identification and function of an inhibitory domain. *J Biol Chem* 274, 19677–19685. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.28.19677>
- Lin, D.T.S., Fretier, P., Jiang, C., Vincent, S.R., 2010. Nitric oxide signaling via cGMP-stimulated phosphodiesterase in striatal neurons. *Synapse* 64, 460–466. <https://doi.org/10.1002/syn.20750>
- Lin, J.Y., Chung, K.K.H., de Castro, D., Funk, G.D., Lipski, J., 2004. Effects of muscarinic acetylcholine receptor activation on membrane currents and intracellular messengers in medium spiny neurones of the rat striatum. *Eur J Neurosci* 20, 1219–1230. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03576.x>
- Lindgren, H.S., Andersson, D.R., Lagerkvist, S., Nissbrandt, H., Cenci, M.A., 2010. L-DOPA-induced dopamine efflux in the striatum and the substantia nigra in a rat model of Parkinson's disease: temporal and quantitative relationship to the expression of dyskinesia. *J Neurochem* 112, 1465–1476. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06556.x>
- Lindvall, O., Björklund, A., 1979. Dopaminergic innervation of the globus pallidus by collaterals from the nigrostriatal pathway. *Brain Research* 172, 169–173. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90907-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90907-7)
- Liu, C., Goel, P., Kaeser, P.S., 2021. Spatial and temporal scales of dopamine transmission. *Nat Rev Neurosci* 22, 345–358. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00455-7>

- Liu, C., Kershberg, L., Wang, J., Schneeberger, S., Kaeser, P.S., 2018. Dopamine Secretion Is Mediated by Sparse Active Zone-like Release Sites. *Cell* 172, 706-718.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.008>
- Liu, F., Ma, X.H., Ule, J., Bibb, J.A., Nishi, A., DeMaggio, A.J., Yan, Z., Nairn, A.C., Greengard, P., 2001. Regulation of cyclin-dependent kinase 5 and casein kinase 1 by metabotropic glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11062–11068. <https://doi.org/10.1073/pnas.191353898>
- Liu, F., Virshup, D.M., Nairn, A.C., Greengard, P., 2002. Mechanism of regulation of casein kinase I activity by group I metabotropic glutamate receptors. *J Biol Chem* 277, 45393–45399. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204499200>
- Lohse, C., Bock, A., Maiellaro, I., Hannawacker, A., Schad, L.R., Lohse, M.J., Bauer, W.R., 2017. Experimental and mathematical analysis of cAMP nanodomains. *PLoS ONE* 12, e0174856. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174856>
- Lorenc-Koci, E., Czarnecka, A., 2013. Role of nitric oxide in the regulation of motor function. An overview of behavioral, biochemical and histological studies in animal models. *Pharmacol Rep* 65, 1043–1055. [https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(13\)71464-6](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(13)71464-6)
- Lorenz, R., Bertinetti, D., Herberg, F.W., 2015. cAMP-Dependent Protein Kinase and cGMP-Dependent Protein Kinase as Cyclic Nucleotide Effectors, in: Seifert, R. (Ed.), *Non-Canonical Cyclic Nucleotides, Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 105–122. https://doi.org/10.1007/164_2015_36
- Luczak, V., Blackwell, K.T., Abel, T., Girault, J.-A., Gervasi, N., 2017. Dendritic diameter influences the rate and magnitude of hippocampal cAMP and PKA transients during β -adrenergic receptor activation. *Neurobiology of Learning and Memory* 138, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.08.006>
- Lundblad, M., Andersson, M., Winkler, C., Kirik, D., Wierup, N., Cenci, M.A., 2002. Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience* 15, 120–132. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01843.x>
- Lundblad, M., Picconi, B., Lindgren, H., Cenci, M.A., 2004. A model of l-DOPA-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned mice: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiology of Disease* 16, 110–123. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.01.007>
- Lundblad, M., Usiello, A., Carta, M., Håkansson, K., Fisone, G., Cenci, M.A., 2005. Pharmacological validation of a mouse model of l-DOPA-induced dyskinesia. *Experimental Neurology* 194, 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.02.002>
- Lundblad, M., Vaudano, E., Cenci, M.A., 2003. Cellular and behavioural effects of the adenosine A2a receptor antagonist KW-6002 in a rat model of l-DOPA-induced dyskinesia. *J Neurochem* 84, 1398–1410. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01632.x>
- Lynd-Balta, E., Haber, S.N., 1994. The organization of midbrain projections to the striatum in the primate: Sensorimotor-related striatum versus ventral striatum. *Neuroscience* 59, 625–640. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90182-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90182-1)

- Ma, L., Day-Cooney, J., Benavides, O.J., Muniak, M.A., Qin, M., Ding, J.B., Mao, T., Zhong, H., 2022. Locomotion activates PKA through dopamine and adenosine in striatal neurons. *Nature* 611, 762–768. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05407-4>
- Mallet, N., Ballion, B., Le Moine, C., Gonon, F., 2006. Cortical inputs and GABA interneurons imbalance projection neurons in the striatum of parkinsonian rats. *J Neurosci* 26, 3875–3884. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4439-05.2006>
- Manganiello, V.C., Murata, T., Taira, M., Belfrage, P., Degerman, E., 1995. Diversity in Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Isoenzyme Families. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 322, 1–13. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1429>
- Manson, A., Stirpe, P., Schrag, A., 2012. Levodopa-induced-dyskinesias clinical features, incidence, risk factors, management and impact on quality of life. *J Parkinsons Dis* 2, 189–198. <https://doi.org/10.3233/JPD-2012-120103>
- Mao, L., Wang, J.Q., 2003. Group I metabotropic glutamate receptor-mediated calcium signalling and immediate early gene expression in cultured rat striatal neurons. *Eur J Neurosci* 17, 741–750. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02495.x>
- Mao, L., Wang, J.Q., 2001. Selective activation of group I metabotropic glutamate receptors upregulates preprodynorphin, substance P, and preproenkephalin mRNA expression in rat dorsal striatum. *Synapse* 39, 82–94. [https://doi.org/10.1002/1098-2396\(20010101\)39:1<82::AID-SYN11>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1098-2396(20010101)39:1<82::AID-SYN11>3.0.CO;2-B)
- Marcoz, P., Prigent, A.F., Lagarde, M., Nemoz, G., 1993. Modulation of rat thymocyte proliferative response through the inhibition of different cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms by means of selective inhibitors and cGMP-elevating agents. *Mol Pharmacol* 44, 1027–1035.
- Mariani, L.-L., Longueville, S., Girault, J.-A., Hervé, D., Gervasi, N., 2019. Differential enhancement of ERK, PKA and Ca²⁺ signaling in direct and indirect striatal neurons of Parkinsonian mice. *Neurobiology of Disease* 130, 104506. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104506>
- Marin, P., Lafon-Cazal, M., Bockaert, J., 1992. A Nitric Oxide Synthase Activity Selectively Stimulated by NMDA Receptors Depends on Protein Kinase C Activation in Mouse Striatal Neurons. *European Journal of Neuroscience* 4, 425–432. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1992.tb00892.x>
- Marras, R.A., Martins, A.P., Del Bel, E.A., Guimarães, F.S., 1995. L-NOARG, an inhibitor of nitric oxide synthase, induces catalepsy in mice. *Neuroreport* 7, 158–160.
- Marsden, C.D., 1990. Parkinson's disease. *Lancet* 335, 948–952. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)91006-v](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)91006-v)
- Martinez, S.E., Wu, A.Y., Glavas, N.A., Tang, X.-B., Turley, S., Hol, W.G.J., Beavo, J.A., 2002. The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 13260–13265. <https://doi.org/10.1073/pnas.192374899>
- Martins, T.J., Mumby, M.C., Beavo, J.A., 1982. Purification and characterization of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine tissues. *J Biol Chem* 257, 1973–1979.
- Matamales, M., Bertran-Gonzalez, J., Salomon, L., Degos, B., Deniau, J.-M., Valjent, E., Hervé, D., Girault, J.-A., 2009. Striatal medium-sized spiny neurons: identification by nuclear staining and study of neuronal subpopulations in BAC transgenic mice. *PLoS One* 4, e4770. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004770>

- Matell, M.S., Meck, W.H., 2004. Cortico-striatal circuits and interval timing: coincidence detection of oscillatory processes. *Cognitive Brain Research, Neuroimaging of Interval Timing* 21, 139–170. <https://doi.org/10.1016/j.cogbrainres.2004.06.012>
- Matsuda, W., Furuta, T., Nakamura, K.C., Hioki, H., Fujiyama, F., Arai, R., Kaneko, T., 2009. Single Nigrostriatal Dopaminergic Neurons Form Widely Spread and Highly Dense Axonal Arborizations in the Neostriatum. *J Neurosci* 29, 444–453. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4029-08.2009>
- Matsuoka, I., Giuli, G., Poyard, M., Stengel, D., Parma, J., Guellaen, G., Hanoune, J., 1992. Localization of adenylyl and guanylyl cyclase in rat brain by in situ hybridization: comparison with calmodulin mRNA distribution. *J Neurosci* 12, 3350–3360.
- Matsuoka, I., Suzuki, Y., Defer, N., Nakanishi, H., Hanoune, J., 1997. Differential expression of type I, II, and V adenylyl cyclase gene in the postnatal developing rat brain. *J Neurochem* 68, 498–506. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.68020498.x>
- Matthiesen, K., Nielsen, J., 2009. Binding of cyclic nucleotides to phosphodiesterase 10A and 11A GAF domains does not stimulate catalytic activity. *Biochemical Journal* 423, 401–409. <https://doi.org/10.1042/BJ20090982>
- Maurice, D., H., 2005. Cyclic nucleotide phosphodiesterase-mediated integration of cGMP and cAMP signaling in cells of the cardiovascular system. *Front Biosci* 10, 1221. <https://doi.org/10.2741/1614>
- Maurice, D., Haslam, R., 1990. Molecular basis of the synergistic inhibition of platelet function by nitrovasodilators and activators of adenylate cyclase: inhibition of cyclic AMP breakdown by cyclic GMP. *Molecular pharmacology*.
- Maurice, N., Liberge, M., Jaouen, F., Ztaou, S., Hanini, M., Camon, J., Deisseroth, K., Amalric, M., Kerkerian-Le Goff, L., Beurrier, C., 2015. Striatal Cholinergic Interneurons Control Motor Behavior and Basal Ganglia Function in Experimental Parkinsonism. *Cell Reports* 13, 657–666. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.034>
- Maurice, N., Mercer, J., Chan, C.S., Hernandez-Lopez, S., Held, J., Tkatch, T., Surmeier, D.J., 2004. D2 Dopamine Receptor-Mediated Modulation of Voltage-Dependent Na⁺ Channels Reduces Autonomous Activity in Striatal Cholinergic Interneurons. *J. Neurosci.* 24, 10289–10301. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2155-04.2004>
- Maurin, T., Lebrigand, K., Castagnola, S., Paquet, A., Jarjat, M., Popa, A., Grossi, M., Rage, F., Bardoni, B., 2018. HITS-CLIP in various brain areas reveals new targets and new modalities of RNA binding by fragile X mental retardation protein. *Nucleic Acids Research* 46, 6344–6355. <https://doi.org/10.1093/nar/gky267>
- McKinley, J.W., Shi, Z., Kawikova, I., Hur, M., Bamford, I.J., Sudarsana Devi, S.P., Vahedipour, A., Darvas, M., Bamford, N.S., 2019. Dopamine Deficiency Reduces Striatal Cholinergic Interneuron Function in Models of Parkinson’s Disease. *Neuron* 103, 1056–1072.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.06.013>
- McNeill, T.H., Brown, S.A., Rafols, J.A., Shoulson, I., 1988. Atrophy of medium spiny I striatal dendrites in advanced Parkinson’s disease. *Brain Res* 455, 148–152. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90124-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90124-2)
- Mehel, H., Emons, J., Vettel, C., Wittköpper, K., Seppelt, D., Dewenter, M., Lutz, S., Sossalla, S., Maier, L.S., Lechêne, P., Leroy, J., Lefebvre, F., Varin, A.,

- Eschenhagen, T., Nattel, S., Dobrev, D., Zimmermann, W.-H., Nikolaev, V.O., Vandecasteele, G., Fischmeister, R., El-Armouche, A., 2013. Phosphodiesterase-2 Is Up-Regulated in Human Failing Hearts and Blunts β -Adrenergic Responses in Cardiomyocytes. *Journal of the American College of Cardiology* 62, 1596–1606. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.057>
- Mela, F., Marti, M., Dekundy, A., Danysz, W., Morari, M., Cenci, M.A., 2007. Antagonism of metabotropic glutamate receptor type 5 attenuates L-DOPA-induced dyskinesia and its molecular and neurochemical correlates in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurochem* 101, 483–497. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04456.x>
- Menniti, F.S., Chappie, T.A., Humphrey, J.M., Schmidt, C.J., 2007. Phosphodiesterase 10A inhibitors: a novel approach to the treatment of the symptoms of schizophrenia. *Curr Opin Investig Drugs* 8, 54–59.
- Méry, P.F., Pavoine, C., Belhassen, L., Pecker, F., Fischmeister, R., 1993. Nitric oxide regulates cardiac Ca²⁺ current. Involvement of cGMP-inhibited and cGMP-stimulated phosphodiesterases through guanylyl cyclase activation. *J Biol Chem* 268, 26286–26295.
- Mika, D., Bobin, P., Lindner, M., Boet, A., Hodzic, A., Lefebvre, F., Lechène, P., Sadoune, M., Samuel, J.-L., Algalarrondo, V., Rucker-Martin, C., Lambert, V., Fischmeister, R., Vandecasteele, G., Leroy, J., 2019. Synergic PDE3 and PDE4 control intracellular cAMP and cardiac excitation-contraction coupling in a porcine model. *J Mol Cell Cardiol* 133, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.05.025>
- Mikami, S., Kawasaki, M., Ikeda, S., Negoro, N., Nakamura, S., Nomura, I., Ashizawa, T., Kokubo, H., Hoffman, I.D., Zou, H., Oki, H., Uchiyama, N., Hiura, Y., Miyamoto, M., Itou, Y., Nakashima, M., Iwashita, H., Taniguchi, T., 2017a. Discovery of a Novel Series of Pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine-Based Phosphodiesterase 2A Inhibitors Structurally Different from *N*-((1*S*)-1-(3-Fluoro-4-(trifluoromethoxy)phenyl)-2-methoxyethyl)-7-methoxy-2-oxo-2,3-dihydropyrido[2,3-*b*]pyrazine-4(1*H*)-carboxamide (TAK-915), for the Treatment of Cognitive Disorders. *Chem. Pharm. Bull.* 65, 1058–1077. <https://doi.org/10.1248/cpb.c17-00564>
- Mikami, S., Sasaki, S., Asano, Y., Ujikawa, O., Fukumoto, S., Nakashima, K., Oki, H., Kamiguchi, N., Imada, H., Iwashita, H., Taniguchi, T., 2017b. Discovery of an Orally Bioavailable, Brain-Penetrating, in Vivo Active Phosphodiesterase 2A Inhibitor Lead Series for the Treatment of Cognitive Disorders. *J Med Chem* 60, 7658–7676. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00709>
- Miller, B.R., Walker, A.G., Shah, A.S., Barton, S.J., Rebec, G.V., 2008. Dysregulated Information Processing by Medium Spiny Neurons in Striatum of Freely Behaving Mouse Models of Huntington's Disease. *J Neurophysiol* 100, 2205–2216. <https://doi.org/10.1152/jn.90606.2008>
- Misganaw, D., 2021. Heteromerization of dopaminergic receptors in the brain: Pharmacological implications. *Pharmacol Res* 170, 105600. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105600>
- Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., Caron, M.G., 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78, 189–225. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.189>

- Mongillo, M., McSorley, T., Evellin, S., Sood, A., Lissandron, V., Terrin, A., Huston, E., Hannawacker, A., Lohse, M.J., Pozzan, T., Houslay, M.D., Zaccolo, M., 2004. Fluorescence Resonance Energy Transfer–Based Analysis of cAMP Dynamics in Live Neonatal Rat Cardiac Myocytes Reveals Distinct Functions of Compartmentalized Phosphodiesterases. *Circulation Research* 95, 67–75. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000134629.84732.11>
- Moorhead, G.B.G., Trinkle-Mulcahy, L., Ulke-Lemée, A., 2007. Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 234–244. <https://doi.org/10.1038/nrm2126>
- Morales, M., Margolis, E.B., 2017. Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 18, 73–85. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.165>
- Moratalla, R., Xu, M., Tonegawa, S., Graybiel, A.M., 1996. Cellular responses to psychomotor stimulant and neuroleptic drugs are abnormal in mice lacking the D1 dopamine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14928–14933. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14928>
- Morigaki, R., Okita, S., Goto, S., 2017. Dopamine-Induced Changes in Gaolf Protein Levels in Striatonigral and Striatopallidal Medium Spiny Neurons Underlie the Genesis of L-DOPA-Induced Dyskinesia in Parkinsonian Mice. *Front. Cell. Neurosci.* 11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00026>
- Morris, G., Arkadir, D., Nevet, A., Vaadia, E., Bergman, H., 2004. Coincident but distinct messages of midbrain dopamine and striatal tonically active neurons. *Neuron* 43, 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.06.012>
- Mota, É., Bompierre, S., Betolngar, D., Castro, L.R.V., Vincent, P., 2021. Pivotal role of phosphodiesterase 10A in the integration of dopamine signals in mice striatal D1 and D2 medium-sized spiny neurones. *Br J Pharmacol* bph.15664. <https://doi.org/10.1111/bph.15664>
- Mota, E., Bompierre, S., Castro, L.R.V., Vincent, P., 2021. Phosphodiesterase 2A, 4 and 10A contribution in the integration of dopamine signals in mice striatal D1 and D2 medium-sized spiny neurones. <https://doi.org/10.25493/5G5V-HBC>
- Murashima, S., Tanaka, T., Hockman, S., Manganiello, V., 1990. Characterization of particulate cyclic nucleotide phosphodiesterases from bovine brain: purification of a distinct cGMP-stimulated isoenzyme. *Biochemistry* 29, 5285–5292. <https://doi.org/10.1021/bi00474a010>
- Murray, A.J., Tucker, S.J., Shewan, D.A., 2009. cAMP-Dependent Axon Guidance Is Distinctly Regulated by Epac and Protein Kinase A. *J Neurosci* 29, 15434–15444. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3071-09.2009>
- Nair, A.G., Bhalla, U.S., Hellgren Kotaleski, J., 2016. Role of DARPP-32 and ARPP-21 in the Emergence of Temporal Constraints on Striatal Calcium and Dopamine Integration. *PLoS Comput Biol* 12, e1005080. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005080>
- Nair, A.G., Castro, L.R.V., El Khoury, M., Gorgievski, V., Giros, B., Tzavara, E.T., Hellgren-Kotaleski, J., Vincent, P., 2019. The high efficacy of muscarinic M4 receptor in D1 medium spiny neurons reverses striatal hyperdopaminergia. *Neuropharmacology* 146, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.11.029>

- Nair, A.G., Gutierrez-Arenas, O., Eriksson, O., Vincent, P., Hellgren Kotaleski, J., 2015. Sensing Positive versus Negative Reward Signals through Adenylyl Cyclase-Coupled GPCRs in Direct and Indirect Pathway Striatal Medium Spiny Neurons. *J Neurosci* 35, 14017–14030. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0730-15.2015>
- Nakashima, M., Suzuki, N., Shiraishi, E., Iwashita, H., 2019. TAK-915, a phosphodiesterase 2A inhibitor, ameliorates the cognitive impairment associated with aging in rodent models. *Behav Brain Res* 376, 112192. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112192>
- Nambu, A., 2008. Seven problems on the basal ganglia. *Current Opinion in Neurobiology* 18, 595–604. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.11.001>
- Nambu, A., Takada, M., Inase, M., Tokuno, H., 1996. Dual somatotopical representations in the primate subthalamic nucleus: evidence for ordered but reversed body-map transformations from the primary motor cortex and the supplementary motor area. *J. Neurosci.* 16, 2671–2683. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-08-02671.1996>
- Nambu, A., Tokuno, H., Takada, M., 2002. Functional significance of the cortico–subthalamo–pallidal ‘hyperdirect’ pathway. *Neuroscience Research* 43, 111–117. [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(02\)00027-5](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(02)00027-5)
- Navntoft, C.A., Dreyer, J.K., 2016. How compensation breaks down in Parkinson’s disease: Insights from modeling of denervated striatum. *Mov Disord* 31, 280–289. <https://doi.org/10.1002/mds.26579>
- Nelson, A.B., Kreitzer, A.C., 2014. Reassessing models of basal ganglia function and dysfunction. *Annu Rev Neurosci* 37, 117–135. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071013-013916>
- Neves, S.R., Tsokas, P., Sarkar, A., Grace, E.A., Rangamani, P., Taubenfeld, S.M., Alberini, C.M., Schaff, J.C., Blitzer, R.D., Moraru, I.I., Iyengar, R., 2008. Cell Shape and Negative Links in Regulatory Motifs Together Control Spatial Information Flow in Signaling Networks. *Cell* 133, 666–680. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.025>
- Neves-Zaph, S.R., 2017. Phosphodiesterase Diversity and Signal Processing Within cAMP Signaling Networks, in: Zhang, H.-T., Xu, Y., O’Donnell, J.M. (Eds.), *Phosphodiesterases: CNS Functions and Diseases*, *Advances in Neurobiology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 3–14. https://doi.org/10.1007/978-3-319-58811-7_1
- Nicolini, F., Foltynie, T., Reis Marques, T., Muhlert, N., Tziortzi, A.C., Searle, G.E., Natesan, S., Kapur, S., Rabiner, E.A., Gunn, R.N., Piccini, P., Politis, M., 2015. Loss of phosphodiesterase 10A expression is associated with progression and severity in Parkinson’s disease. *Brain* 138, 3003–3015. <https://doi.org/10.1093/brain/awv219>
- Nicol, X., Muzerelle, A., Bachy, I., Ravary, A., Gaspar, P., 2005. Spatiotemporal localization of the calcium-stimulated adenylyl cyclases, AC1 and AC8, during mouse brain development. *J Comp Neurol* 486, 281–294. <https://doi.org/10.1002/cne.20528>
- Nikolaev, V.O., Bünemann, M., Hein, L., Hannawacker, A., Lohse, M.J., 2004. Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem* 279, 37215–37218. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400302200>

- Nirenberg, M.J., Chan, J., Liu, Y., Edwards, R.H., Pickel, V.M., 1996. Ultrastructural localization of the vesicular monoamine transporter-2 in midbrain dopaminergic neurons: potential sites for somatodendritic storage and release of dopamine. *J Neurosci* 16, 4135–4145. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-13-04135.1996>
- Nisenbaum, E.S., Wilson, C.J., 1995. Potassium currents responsible for inward and outward rectification in rat neostriatal spiny projection neurons. *J Neurosci* 15, 4449–4463.
- Nishi, A., Bibb, J.A., Matsuyama, S., Hamada, M., Higashi, H., Nairn, A.C., Greengard, P., 2002. Regulation of DARPP-32 dephosphorylation at PKA- and Cdk5-sites by NMDA and AMPA receptors: distinct roles of calcineurin and protein phosphatase-2A. *Journal of Neurochemistry* 81, 832–841. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00876.x>
- Nishi, A., Kuroiwa, M., Miller, D.B., O'Callaghan, J.P., Bateup, H.S., Shuto, T., Sotogaku, N., Fukuda, T., Heintz, N., Greengard, P., Snyder, G.L., 2008. Distinct Roles of PDE4 and PDE10A in the Regulation of cAMP/PKA Signaling in the Striatum. *J. Neurosci.* 28, 10460–10471. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2518-08.2008>
- Nishi, A., Snyder, G.L., Greengard, P., 1997. Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine. *J Neurosci* 17, 8147–8155. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-21-08147.1997>
- Nishi, A., Snyder, G.L., Nairn, A.C., Greengard, P., 1999. Role of calcineurin and protein phosphatase-2A in the regulation of DARPP-32 dephosphorylation in neostriatal neurons. *J Neurochem* 72, 2015–2021. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0722015.x>
- Nishijima, H., Suzuki, S., Kon, T., Funamizu, Y., Ueno, T., Haga, R., Suzuki, Chihiro, Arai, A., Kimura, T., Suzuki, Chieko, Meguro, R., Miki, Y., Yamada, J., Migita, K., Ichinohe, N., Ueno, S., Baba, M., Tomiyama, M., 2014. Morphologic changes of dendritic spines of striatal neurons in the levodopa-induced dyskinesia model. *Movement Disorders* 29, 336–343. <https://doi.org/10.1002/mds.25826>
- Niznik, H.B., Van Tol, H.H., 1992. Dopamine receptor genes: new tools for molecular psychiatry. *J Psychiatry Neurosci* 17, 158–180.
- Notomi, T., Shigemoto, R., 2004. Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain. *J Comp Neurol* 471, 241–276. <https://doi.org/10.1002/cne.11039>
- Obeso, J.A., Lanciego, J.L., 2011. Past, Present, and Future of the Pathophysiological Model of the Basal Ganglia. *Front. Neuroanat.* 5. <https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00039>
- Oh, Y., Heien, M.L., Park, C., Kang, Y.M., Kim, J., Boschen, S.L., Shin, H., Cho, H.U., Blaha, C.D., Bennet, K.E., Lee, H.K., Jung, S.J., Kim, I.Y., Lee, K.H., Jang, D.P., 2018. Tracking tonic dopamine levels in vivo using multiple cyclic square wave voltammetry. *Biosensors and Bioelectronics* 121, 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.08.034>
- Oliveira, R.F., Kim, M., Blackwell, K.T., 2012. Subcellular location of PKA controls striatal plasticity: stochastic simulations in spiny dendrites. *PLoS Comput Biol* 8, e1002383. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002383>
- Ondracek, J.M., Dec, A., Hoque, K.E., Lim, S.A.O., Rasouli, G., Indorkar, R.P., Linardakis, J., Klika, B., Mukherji, S.J., Burnazi, M., Threlfell, S., Sammut, S., West, A.R., 2008.

- Feed-forward excitation of striatal neuron activity by frontal cortical activation of nitric oxide signaling in vivo. *Eur J Neurosci* 27, 1739–1754. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06157.x>
- Ooms, M., Attili, B., Celen, S., Koole, M., Verbruggen, A., Van Laere, K., Bormans, G., 2016. [18F]JNJ42259152 binding to phosphodiesterase 10A, a key regulator of medium spiny neuron excitability, is altered in the presence of cyclic AMP. *Journal of Neurochemistry* 139, 897–906. <https://doi.org/10.1111/jnc.13855>
- Padovan-Neto, Fernando Eduardo, Cavalcanti-Kiwiatkoviski, R., Carolino, R.O.G., Anselmo-Franci, J., Del Bel, E., 2015. Effects of prolonged neuronal nitric oxide synthase inhibition on the development and expression of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-OHDA-lesioned rats. *Neuropharmacology* 89, 87–99. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.08.019>
- Padovan-Neto, F.E., Echeverry, M.B., Tumas, V., Del-Bel, E.A., 2009. Nitric oxide synthase inhibition attenuates L-DOPA-induced dyskinesias in a rodent model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 159, 927–935. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.01.034>
- Padovan-Neto, Fernando E., Sammut, S., Chakroborty, S., Dec, A.M., Threlfell, S., Campbell, P.W., Mudrakola, V., Harms, J.F., Schmidt, C.J., West, A.R., 2015. Facilitation of corticostriatal transmission following pharmacological inhibition of striatal phosphodiesterase 10A: role of nitric oxide-soluble guanylyl cyclase-cGMP signaling pathways. *J Neurosci* 35, 5781–5791. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1238-14.2015>
- Padovan-Neto, F.E., West, A.R., 2017. Regulation of Striatal Neuron Activity by Cyclic Nucleotide Signaling and Phosphodiesterase Inhibition: Implications for the Treatment of Parkinson's Disease. *Adv Neurobiol* 17, 257–283. https://doi.org/10.1007/978-3-319-58811-7_10
- Paes, D., Schepers, M., Rombaut, B., van den Hove, D., Vanmierlo, T., Prickaerts, J., 2021a. The Molecular Biology of Phosphodiesterase 4 Enzymes as Pharmacological Targets: An Interplay of Isoforms, Conformational States, and Inhibitors. *Pharmacol Rev* 73, 1016–1049. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000273>
- Paes, D., Xie, K., Wheeler, D.G., Zook, D., Prickaerts, J., Peters, M., 2021b. Inhibition of PDE2 and PDE4 synergistically improves memory consolidation processes. *Neuropharmacology* 184, 108414. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108414>
- Pandit, J., Forman, M.D., Fennell, K.F., Dillman, K.S., Menniti, F.S., 2009. Mechanism for the allosteric regulation of phosphodiesterase 2A deduced from the X-ray structure of a near full-length construct. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 18225–18230. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907635106>
- Park, D.J., West, A.R., 2009. Regulation of striatal nitric oxide synthesis by local dopamine and glutamate interactions. *Journal of Neurochemistry* 111, 1457–1465. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06416.x>
- Parker, J.G., Marshall, J.D., Ahanonu, B., Wu, Y.-W., Kim, T.H., Grewe, B.F., Zhang, Y., Li, J.Z., Ding, J.B., Ehlers, M.D., Schnitzer, M.J., 2018. Diametric neural ensemble dynamics in parkinsonian and dyskinetic states. *Nature* 557, 177–182. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0090-6>

- Parsons, L.H., Smith, A.D., Justice, J.B., 1991. The in vivo microdialysis recovery of dopamine is altered independently of basal level by 6-hydroxydopamine lesions to the nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience Methods* 40, 139–147. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(91\)90063-6](https://doi.org/10.1016/0165-0270(91)90063-6)
- Patriarchi, T., Cho, J.R., Merten, K., Howe, M.W., Marley, A., Xiong, W.-H., Folk, R.W., Broussard, G.J., Liang, R., Jang, M.J., Zhong, H., Dombeck, D., von Zastrow, M., Nimmerjahn, A., Gradinaru, V., Williams, J.T., Tian, L., 2018. Ultrafast neuronal imaging of dopamine dynamics with designed genetically encoded sensors. *Science* 360, eaat4422. <https://doi.org/10.1126/science.aat4422>
- Pavón, N., Martín, A.B., Mendiola, A., Moratalla, R., 2006. ERK phosphorylation and FosB expression are associated with L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice. *Biol Psychiatry* 59, 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.05.044>
- Pawlak, V., Kerr, J.N.D., 2008. Dopamine Receptor Activation Is Required for Corticostriatal Spike-Timing-Dependent Plasticity. *Journal of Neuroscience* 28, 2435–2446. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4402-07.2008>
- Paz, R.M., Tubert, C., Stahl, A.M., Amarillo, Y., Rela, L., Murer, M.G., 2021. Levodopa Causes Striatal Cholinergic Interneuron Burst-Pause Activity in Parkinsonian Mice. *Mov Disord* 36, 1578–1591. <https://doi.org/10.1002/mds.28516>
- Pekcec, A., Schülert, N., Stierstorfer, B., Deiana, S., Dorner-Ciossek, C., Rosenbrock, H., 2018. Targeting the dopamine D1 receptor or its downstream signalling by inhibiting phosphodiesterase-1 improves cognitive performance. *Br J Pharmacol* 175, 3021–3033. <https://doi.org/10.1111/bph.14350>
- Peng, Q., Zhong, S., Tan, Y., Zeng, W., Wang, J., Cheng, C., Yang, X., Wu, Y., Cao, X., Xu, Y., 2019. The Rodent Models of Dyskinesia and Their Behavioral Assessment. *Front. Neurol.* 10, 1016. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.01016>
- Pereira, D.B., Schmitz, Y., Mészáros, J., Merchant, P., Hu, G., Li, S., Henke, A., Lizardi-Ortiz, J.E., Karpowicz, R.J., Morgenstern, T.J., Sonders, M.S., Kanter, E., Rodriguez, P.C., Mosharov, E.V., Sames, D., Sulzer, D., 2016. Fluorescent false neurotransmitter reveals functionally silent dopamine vesicle clusters in the striatum. *Nat Neurosci* 19, 578–586. <https://doi.org/10.1038/nn.4252>
- Perreault, M.L., Fan, T., Alijaniam, M., O'Dowd, B.F., George, S.R., 2012. Dopamine D1-D2 receptor heteromer in dual phenotype GABA/glutamate-coexpressing striatal medium spiny neurons: regulation of BDNF, GAD67 and VGLUT1/2. *PLoS One* 7, e33348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033348>
- Perreault, M.L., Hasbi, A., Alijaniam, M., Fan, T., Varghese, G., Fletcher, P.J., Seeman, P., O'Dowd, B.F., George, S.R., 2010. The Dopamine D1-D2 Receptor Heteromer Localizes in Dynorphin/Enkephalin Neurons: INCREASED HIGH AFFINITY STATE FOLLOWING AMPHETAMINE AND IN SCHIZOPHRENIA *. *Journal of Biological Chemistry* 285, 36625–36634. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.159954>
- Perreault, M.L., Hasbi, A., O'Dowd, B.F., George, S.R., 2014. Heteromeric dopamine receptor signaling complexes: emerging neurobiology and disease relevance. *Neuropsychopharmacology* 39, 156–168. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.148>
- Perreault, M.L., Hasbi, A., Shen, M.Y.F., Fan, T., Navarro, G., Fletcher, P.J., Franco, R., Lanciego, J.L., George, S.R., 2016. Disruption of a dopamine receptor complex

- amplifies the actions of cocaine. *Eur Neuropsychopharmacol* 26, 1366–1377. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2016.07.008>
- Pert, C.B., Kuhar, M.J., Snyder, S.H., 1976. Opiate receptor: autoradiographic localization in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 3729–3733. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.10.3729>
- Peti, W., Nairn, A.C., Page, R., 2013. Structural basis for protein phosphatase 1 regulation and specificity. *The FEBS Journal* 280, 596–611. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08509.x>
- Picconi, B., Bagetta, V., Ghiglieri, V., Paillè, V., Di Filippo, M., Pendolino, V., Tozzi, A., Giampà, C., Fusco, F.R., Sgobio, C., Calabresi, P., 2011. Inhibition of phosphodiesterases rescues striatal long-term depression and reduces levodopa-induced dyskinesia. *Brain* 134, 375–387. <https://doi.org/10.1093/brain/awq342>
- Pickel, V.M., Beckley, S.C., Joh, T.H., Reis, D.J., 1981. Ultrastructural immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in the neostriatum. *Brain Research* 225, 373–385. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)90843-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)90843-X)
- Pifl, C., Nanoff, C., Schingnitz, G., Schütz, W., Hornykiewicz, O., 1992a. Sensitization of Dopamine-Stimulated Adenylyl Cyclase in the Striatum of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Treated Rhesus Monkeys and Patients with Idiopathic Parkinson's Disease. *J Neurochem* 58, 1997–2004. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb10939.x>
- Pifl, C., Reither, H., Hornykiewicz, O., 1992b. Functional sensitization of striatal dopamine D1 receptors in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat. *Brain Research* 572, 87–93. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90455-l](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90455-l)
- Pisani, A., Bonsi, P., Centonze, D., Bernardi, G., Calabresi, P., 2001a. Functional coexpression of excitatory mGluR1 and mGluR5 on striatal cholinergic interneurons. *Neuropharmacology* 40, 460–463. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(00\)00184-2](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(00)00184-2)
- Pisani, A., Gubellini, P., Bonsi, P., Conquet, F., Picconi, B., Centonze, D., Bernardi, G., Calabresi, P., 2001b. Metabotropic glutamate receptor 5 mediates the potentiation of N-methyl-D-aspartate responses in medium spiny striatal neurons. *Neuroscience* 106, 579–587. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(01\)00297-4](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00297-4)
- Planert, H., Berger, T.K., Silberberg, G., 2013. Membrane properties of striatal direct and indirect pathway neurons in mouse and rat slices and their modulation by dopamine. *PLoS One* 8, e57054. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057054>
- Podzuweit, T., Nennstiel, P., Müller, A., 1995. Isozyme selective inhibition of cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases by erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine. *Cellular Signalling* 7, 733–738. [https://doi.org/10.1016/0898-6568\(95\)00042-N](https://doi.org/10.1016/0898-6568(95)00042-N)
- Polito, M., Guiot, E., Gangarossa, G., Longueville, S., Doulazmi, M., Valjent, E., Hervé, D., Girault, J.-A., Paupardin-Tritsch, D., Castro, L.R.V., Vincent, P., 2015. Selective Effects of PDE10A Inhibitors on Striatopallidal Neurons Require Phosphatase Inhibition by DARPP-32. *eneuro* 2, ENEURO.0060-15.2015. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0060-15.2015>
- Polito, M., Klarenbeek, J., Jalink, K., Paupardin-Tritsch, D., Vincent, P., Castro, L.R.V., 2013. The NO/cGMP pathway inhibits transient cAMP signals through the

- activation of PDE2 in striatal neurons. *Front. Cell. Neurosci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00211>
- Poppe, H., Rybalkin, S.D., Rehmann, H., Hinds, T.R., Tang, X.-B., Christensen, A.E., Schwede, F., Genieser, H.-G., Bos, J.L., Doslakland, S.O., Beavo, J.A., Butt, E., 2008. Cyclic nucleotide analogs as probes of signaling pathways. *Nat Methods* 5, 277–278. <https://doi.org/10.1038/nmeth0408-277>
- Poulin, J.-F., Caronia, G., Hofer, C., Cui, Q., Helm, B., Ramakrishnan, C., Chan, C.S., Dombeck, D.A., Deisseroth, K., Awatramani, R., 2018. Mapping projections of molecularly defined dopamine neuron subtypes using intersectional genetic approaches. *Nat Neurosci* 21, 1260–1271. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0203-4>
- Poulin, J.-F., Gaertner, Z., Moreno-Ramos, O.A., Awatramani, R., 2020. Classification of Midbrain Dopamine Neurons Using Single-Cell Gene Expression Profiling Approaches. *Trends in Neurosciences* 43, 155–169. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.01.004>
- Poulin, J.-F., Zou, J., Drouin-Ouellet, J., Kim, K.-Y.A., Cicchetti, F., Awatramani, R.B., 2014. Defining midbrain dopaminergic neuron diversity by single-cell gene profiling. *Cell Rep* 9, 930–943. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.008>
- Prast, H., Tran, M.H., Fischer, H., Philippu, A., 1998. Nitric oxide-induced release of acetylcholine in the nucleus accumbens: role of cyclic GMP, glutamate, and GABA. *J Neurochem* 71, 266–273. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.71010266.x>
- Rafalovich, I.V., Melendez, A.E., Plotkin, J.L., Tanimura, A., Zhai, S., Surmeier, D.J., 2015. Interneuronal Nitric Oxide Signaling Mediates Post-synaptic Long-Term Depression of Striatal Glutamatergic Synapses. *Cell Rep* 13, 1336–1342. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.015>
- Rangel-Barajas, C., Silva, I., Lopéz-Santiago, L.M., Aceves, J., Erlij, D., Florán, B., 2011. L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian rats is associated with up-regulation of adenylyl cyclase type V/VI and increased GABA release in the substantia nigra reticulata. *Neurobiology of Disease* 41, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.08.018>
- Rashid, A.J., O’Dowd, B.F., Verma, V., George, S.R., 2007a. Neuronal Gq/11-coupled dopamine receptors: an uncharted role for dopamine. *Trends Pharmacol Sci* 28, 551–555. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.10.001>
- Rashid, A.J., So, C.H., Kong, M.M.C., Furtak, T., El-Ghundi, M., Cheng, R., O’Dowd, B.F., George, S.R., 2007b. D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 654–659. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604049104>
- Redgrave, P., Rodriguez, M., Smith, Y., Rodriguez-Oroz, M.C., Lehericy, S., Bergman, H., Agid, Y., DeLong, M.R., Obeso, J.A., 2010. Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson’s disease. *Nat Rev Neurosci* 11, 760–772. <https://doi.org/10.1038/nrn2915>
- Redrobe, J.P., Jørgensen, M., Christoffersen, C., Montezinho, L., Bastlund, J., Carnerup, M., Bundgaard, C., Lerdrup, L., Plath, N., 2014. In vitro and in vivo characterisation of Lu AF64280, a novel, brain penetrant phosphodiesterase (PDE) 2A inhibitor: potential relevance to cognitive deficits in schizophrenia. *Psychopharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3492-7>

- Reinhardt, R.R., Bondy, C.A., 1996. Differential cellular pattern of gene expression for two distinct cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases in developing and mature rat brain. *Neuroscience* 72, 567–578. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00520-x](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00520-x)
- Reneerkens, O.A.H., Rutten, K., Bollen, E., Hage, T., Blokland, A., Steinbusch, H.W.M., Prickaerts, J., 2013. Inhibition of phosphodiesterase type 2 or type 10 reverses object memory deficits induced by scopolamine or MK-801. *Behavioural Brain Research* 236, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.08.019>
- Repaske, D.R., Corbin, J.G., Conti, M., Goy, M.F., 1993. A cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase gene is highly expressed in the limbic system of the rat brain. *Neuroscience* 56, 673–686. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90364-l](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90364-l)
- Reynolds, J.N.J., Avvisati, R., Dodson, P.D., Fisher, S.D., Oswald, M.J., Wickens, J.R., Zhang, Y.-F., 2022. Coincidence of cholinergic pauses, dopaminergic activation and depolarisation of spiny projection neurons drives synaptic plasticity in the striatum. *Nat Commun* 13, 1296. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28950-0>
- Reynolds, J.N.J., Hyland, B.I., Wickens, J.R., 2004. Modulation of an Afterhyperpolarization by the Substantia Nigra Induces Pauses in the Tonic Firing of Striatal Cholinergic Interneurons. *J. Neurosci.* 24, 9870–9877. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3225-04.2004>
- Rice, M.E., Cragg, S.J., 2008. Dopamine spillover after quantal release: rethinking dopamine transmission in the nigrostriatal pathway. *Brain Res Rev* 58, 303–313. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.02.004>
- Rice, M.E., Patel, J.C., Cragg, S.J., 2011. Dopamine release in the basal ganglia. *Neuroscience* 198, 112–137. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.08.066>
- Richards, M., Lomas, O., Jalink, K., Ford, K.L., Vaughan-Jones, R.D., Lefkimiatis, K., Swietach, P., 2016. Intracellular tortuosity underlies slow cAMP diffusion in adult ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 110, 395–407. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvw080>
- Richfield, E.K., Penney, J.B., Young, A.B., 1989. Anatomical and affinity state comparisons between dopamine D1 and D2 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 30, 767–777. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90168-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90168-1)
- Robertson, G.S., Vincent, S.R., Fibiger, H.C., 1990. Striatonigral projection neurons contain D1 dopamine receptor-activated c-fos. *Brain Research* 523, 288–290. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91498-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91498-6)
- Robinson, T.E., Mocsary, Z., Camp, D.M., Whishaw, I.Q., 1994. Time course of recovery of extracellular dopamine following partial damage to the nigrostriatal dopamine system. *J Neurosci* 14, 2687–2696. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-05-02687.1994>
- Rodefer, J.S., Murphy, E.R., Baxter, M.G., 2005. PDE10A inhibition reverses subchronic PCP-induced deficits in attentional set-shifting in rats. *Eur J Neurosci* 21, 1070–1076. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.03937.x>
- Rodefer, J.S., Saland, S.K., Eckrich, S.J., 2012. Selective phosphodiesterase inhibitors improve performance on the ED/ID cognitive task in rats. *Neuropharmacology* 62, 1182–1190. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.08.008>

- Rosin, D.L., Robeva, A., Woodard, R.L., Guyenet, P.G., Linden, J., 1998. Immunohistochemical localization of adenosine A2A receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 401, 163–186.
- Rosman, G.J., Martins, T.J., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., Ferguson, K., Loughney, K., 1997. Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene* 191, 89–95. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00046-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00046-2)
- Rossi, F., Carta, M., Tronci, E., 2021. Assessment of Nonmotor Symptoms in Rodent Models of Parkinson's. pp. 21–36. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0912-5_2
- Russwurm, C., Koesling, D., Russwurm, M., 2015. Phosphodiesterase 10A Is Tethered to a Synaptic Signaling Complex in Striatum. *Journal of Biological Chemistry* 290, 11936–11947. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.595769>
- Russwurm, C., Zoidl, G., Koesling, D., Russwurm, M., 2009. Dual Acylation of PDE2A Splice Variant 3. *Journal of Biological Chemistry* 284, 25782–25790. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.017194>
- Rutten, K., Prickaerts, J., Hendrix, M., van der Staay, F.J., Şik, A., Blokland, A., 2007. Time-dependent involvement of cAMP and cGMP in consolidation of object memory: Studies using selective phosphodiesterase type 2, 4 and 5 inhibitors. *European Journal of Pharmacology* 558, 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.11.041>
- Ryan, M.B., Bair-Marshall, C., Nelson, A.B., 2018. Aberrant Striatal Activity in Parkinsonism and Levodopa-Induced Dyskinesia. *Cell Reports* 23, 3438–3446.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.059>
- Rylander, D., Recchia, A., Mela, F., Dekundy, A., Danysz, W., Cenci, M.A., 2009. Pharmacological Modulation of Glutamate Transmission in a Rat Model of L-DOPA-Induced Dyskinesia: Effects on Motor Behavior and Striatal Nuclear Signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 330, 227–235. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.150425>
- Salpietro, V., Perez-Dueñas, B., Nakashima, K., San Antonio-Arce, V., Manole, A., Efthymiou, S., Vandrovцова, J., Bettencourt, C., Mencacci, N.E., Klein, C., Kelly, M.P., Davies, C.H., Kimura, H., Macaya, A., Houlden, H., 2018. A homozygous *loss-of-function* mutation in *PDE2A* associated to early-onset hereditary chorea: A Homozygous *PDE2A* Mutation Causing Chorea. *Mov Disord.* 33, 482–488. <https://doi.org/10.1002/mds.27286>
- Sammut, S., Dec, A., Mitchell, D., Linardakis, J., Ortiguera, M., West, A.R., 2006. Phasic dopaminergic transmission increases NO efflux in the rat dorsal striatum via a neuronal NOS and a dopamine D(1/5) receptor-dependent mechanism. *Neuropsychopharmacology* 31, 493–505. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300826>
- Sammut, S., Park, D.J., West, A.R., 2007. Frontal cortical afferents facilitate striatal nitric oxide transmission in vivo via a NMDA receptor and neuronal NOS-dependent mechanism. *J Neurochem* 103, 1145–1156. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04811.x>
- Sammut, S., Threlfell, S., West, A.R., 2010. Nitric oxide-soluble guanylyl cyclase signaling regulates corticostriatal transmission and short-term synaptic plasticity of

- striatal projection neurons recorded in vivo. *Neuropharmacology* 58, 624–631. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.11.011>
- Sancesario, G., Giorgi, M., D'Angelo, V., Modica, A., Martorana, A., Morello, M., Bengtson, C.P., Bernardi, G., 2004. Down-regulation of nitrgergic transmission in the rat striatum after chronic nigrostriatal deafferentation. *Eur J Neurosci* 20, 989–1000. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03566.x>
- Sancesario, G., Morrone, L.A., D'Angelo, V., Castelli, V., Ferrazzoli, D., Sica, F., Martorana, A., Sorge, R., Cavaliere, F., Bernardi, G., Giorgi, M., 2014. Levodopa-induced dyskinesias are associated with transient down-regulation of cAMP and cGMP in the caudate-putamen of hemiparkinsonian rats: Reduced synthesis or increased catabolism? *Neurochemistry International* 79, 44–56. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.10.004>
- Sanchez, G., Rodriguez, M.J., Pomata, P., Rela, L., Murer, M.G., 2011. Reduction of an afterhyperpolarization current increases excitability in striatal cholinergic interneurons in rat parkinsonism. *J Neurosci* 31, 6553–6564. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6345-10.2011>
- Sanders, O., Rajagopal, L., 2020. Phosphodiesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease: A Systematic Review of Clinical Trials and Epidemiology with a Mechanistic Rationale. *ADR* 4, 185–215. <https://doi.org/10.3233/ADR-200191>
- Sano, H., Chiken, S., Hikida, T., Kobayashi, K., Nambu, A., 2013. Signals through the Striatopallidal Indirect Pathway Stop Movements by Phasic Excitation in the Substantia Nigra. *Journal of Neuroscience* 33, 7583–7594. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4932-12.2013>
- Sano, H., Nagai, Y., Miyakawa, T., Shigemoto, R., Yokoi, M., 2008. Increased social interaction in mice deficient of the striatal medium spiny neuron-specific phosphodiesterase 10A2. *J Neurochem* 105, 546–556. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05152.x>
- Santini, E., Alcacer, C., Cacciatore, S., Heiman, M., Hervé, D., Greengard, P., Girault, J.-A., Valjent, E., Fisone, G., 2009. L-DOPA activates ERK signaling and phosphorylates histone H3 in the striatonigral medium spiny neurons of hemiparkinsonian mice. *Journal of Neurochemistry* 108, 621–633. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05831.x>
- Santini, E., Valjent, E., Usiello, A., Carta, M., Borgkvist, A., Girault, J.-A., Herve, D., Greengard, P., Fisone, G., 2007. Critical Involvement of cAMP/DARPP-32 and Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase Signaling in L-DOPA-Induced Dyskinesia. *Journal of Neuroscience* 27, 6995–7005. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0852-07.2007>
- Saunders, A., Macosko, E.Z., Wysocki, A., Goldman, M., Krienen, F.M., de Rivera, H., Bien, E., Baum, M., Bortolin, L., Wang, S., Goeva, A., Nemesh, J., Kamitaki, N., Brumbaugh, S., Kulp, D., McCarroll, S.A., 2018. Molecular Diversity and Specializations among the Cells of the Adult Mouse Brain. *Cell* 174, 1015–1030.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.028>
- Savasta, M., Dubois, A., Benavidès, J., Scatton, B., 1988. Different plasticity changes in D1 and D2 receptors in rat striatal subregions following impairment of dopaminergic transmission. *Neurosci Lett* 85, 119–124. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(88\)90440-5](https://doi.org/10.1016/0304-3940(88)90440-5)

- Schiavi, S., Carbone, E., Melancia, F., di Masi, A., Jarjat, M., Brau, F., Cardarelli, S., Giorgi, M., Bardoni, B., Trezza, V., 2022. Phosphodiesterase 2A inhibition corrects the aberrant behavioral traits observed in genetic and environmental preclinical models of Autism Spectrum Disorder. *Transl Psychiatry* 12, 119. <https://doi.org/10.1038/s41398-022-01885-2>
- Schlesinger, I., Sinai, A., Zaaroor, M., 2017. MRI-Guided Focused Ultrasound in Parkinson's Disease: A Review. *Parkinson's Disease* 2017, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2017/8124624>
- Schmidt, C.J., Chapin, D.S., Cianfrogna, J., Corman, M.L., Hajos, M., Harms, J.F., Hoffman, W.E., Lebel, L.A., McCarthy, S.A., Nelson, F.R., Proulx-LaFrance, C., Majchrzak, M.J., Ramirez, A.D., Schmidt, K., Seymour, P.A., Siuciak, J.A., Tingley, F.D., Williams, R.D., Verhoest, P.R., Menniti, F.S., 2008. Preclinical characterization of selective phosphodiesterase 10A inhibitors: a new therapeutic approach to the treatment of schizophrenia. *J Pharmacol Exp Ther* 325, 681–690. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.132910>
- Schmidt, R., Leventhal, D.K., Mallet, N., Chen, F., Berke, J.D., 2013. Canceling actions involves a race between basal ganglia pathways. *Nat Neurosci* 16, 1118–1124. <https://doi.org/10.1038/nn.3456>
- Schober, A., 2004. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res* 318, 215–224. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0938-y>
- Schultz, W., 2007. Behavioral dopamine signals. *Trends Neurosci* 30, 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.007>
- Schultz, W., Dayan, P., Montague, P.R., 1997. A neural substrate of prediction and reward. *Science* 275, 1593–1599. <https://doi.org/10.1126/science.275.5306.1593>
- Schultz, W., Ungerstedt, U., 1978. Short-Term increase and long-term reversion of striatal cell activity after degeneration of the nigrostriatal dopamine system. *Exp Brain Res* 33, 159–171. <https://doi.org/10.1007/BF00238057>
- Sebastianutto, I., Goyet, E., Andreoli, L., Font-Ingles, J., Moreno-Delgado, D., Bouquier, N., Jahannault-Talignani, C., Moutin, E., Di Menna, L., Maslava, N., Pin, J.-P., Fagni, L., Nicoletti, F., Ango, F., Cenci, M.A., Perroy, J., 2020. D1-mGlu5 heteromers mediate noncanonical dopamine signaling in Parkinson's disease. *J Clin Invest* 130, 1168–1184. <https://doi.org/10.1172/JCI126361>
- Sedelis, M., Schwarting, R.K., Huston, J.P., 2001. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 125, 109–125. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(01\)00309-6](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(01)00309-6)
- Seeger, T.F., Bartlett, B., Coskran, T.M., Culp, J.S., James, L.C., Krull, D.L., Lanfear, J., Ryan, A.M., Schmidt, C.J., Strick, C.A., Varghese, A.H., Williams, R.D., Wylie, P.G., Menniti, F.S., 2003. Immunohistochemical localization of PDE10A in the rat brain. *Brain Research* 985, 113–126. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)02754-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02754-9)
- Shakur, Y., Holst, L.S., Landstrom, T.R., Movsesian, M., Degerman, E., Manganiello, V., 2001. Regulation and function of the cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3) gene family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 66, 241–277. [https://doi.org/10.1016/s0079-6603\(00\)66031-2](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(00)66031-2)

- Shen, W., Flajolet, M., Greengard, P., Surmeier, D.J., 2008. Dichotomous Dopaminergic Control of Striatal Synaptic Plasticity. *Science* 321, 848–851. <https://doi.org/10.1126/science.1160575>
- Shen, W., Plotkin, J.L., Francardo, V., Ko, W.K.D., Xie, Z., Li, Q., Fieblinger, T., Wess, J., Neubig, R.R., Lindsley, C.W., Conn, P.J., Greengard, P., Bezard, E., Cenci, M.A., Surmeier, D.J., 2015. M4 Muscarinic Receptor Signaling Ameliorates Striatal Plasticity Deficits in Models of L-DOPA-Induced Dyskinesia. *Neuron* 88, 762–773. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.10.039>
- Shen, W., Tian, X., Day, M., Ulrich, S., Tkatch, T., Nathanson, N.M., Surmeier, D.J., 2007. Cholinergic modulation of Kir2 channels selectively elevates dendritic excitability in striatopallidal neurons. *Nat Neurosci* 10, 1458–1466. <https://doi.org/10.1038/nn1972>
- Shen, W., Zhai, S., Surmeier, D.J., 2022. Striatal synaptic adaptations in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 167, 105686. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105686>
- Shimizu, N., Ohnishi, S., 1973. Demonstration of nigro-neostriatal tract by degeneration silver method. *Exp Brain Res* 17. <https://doi.org/10.1007/BF00235022>
- Shindou, T., Ochi-Shindou, M., Wickens, J.R., 2011. A Ca²⁺ Threshold for Induction of Spike-Timing-Dependent Depression in the Mouse Striatum. *Journal of Neuroscience* 31, 13015–13022. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3206-11.2011>
- Shindou, T., Shindou, M., Watanabe, S., Wickens, J., 2019. A silent eligibility trace enables dopamine-dependent synaptic plasticity for reinforcement learning in the mouse striatum. *European Journal of Neuroscience* 49, 726–736. <https://doi.org/10.1111/ejn.13921>
- Sibley, D.R., Monsma, F.J., 1992. Molecular biology of dopamine receptors. *Trends Pharmacol Sci* 13, 61–69. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(92\)90025-2](https://doi.org/10.1016/0165-6147(92)90025-2)
- Siuciak, J.A., Chapin, D.S., Harms, J.F., Lebel, L.A., McCarthy, S.A., Chambers, L., Shrikhande, A., Wong, S., Menniti, F.S., Schmidt, C.J., 2006. Inhibition of the striatum-enriched phosphodiesterase PDE10A: a novel approach to the treatment of psychosis. *Neuropharmacology* 51, 386–396. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.04.013>
- Siuciak, J.A., McCarthy, S.A., Chapin, D.S., Martin, A.N., Harms, J.F., Schmidt, C.J., 2008. Behavioral characterization of mice deficient in the phosphodiesterase-10A (PDE10A) enzyme on a C57/Bl6N congenic background. *Neuropharmacology* 54, 417–427. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.10.009>
- Slupe, A.M., Merrill, R.A., Strack, S., 2011. Determinants for Substrate Specificity of Protein Phosphatase 2A. *Enzyme Res* 2011, 398751. <https://doi.org/10.4061/2011/398751>
- Smeyne, R.J., Jackson-Lewis, V., 2005. The MPTP model of Parkinson's disease. *Molecular Brain Research, Molecular Mechanisms in Parkinson's Disease* 134, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.09.017>
- Smith, J.B., Klug, J.R., Ross, D.L., Howard, C.D., Hollon, N.G., Ko, V.I., Hoffman, H., Callaway, E.M., Gerfen, C.R., Jin, X., 2016. Genetic-Based Dissection Unveils the Inputs and Outputs of Striatal Patch and Matrix Compartments. *Neuron* 91, 1069–1084. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.07.046>
- Smith, Y., Parent, A., 1986. Neuropeptide Y-immunoreactive neurons in the striatum of cat and monkey: morphological characteristics, intrinsic organization and co-

- localization with somatostatin. *Brain Res* 372, 241–252. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)91131-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)91131-5)
- Smith, Y., Villalba, R.M., Raju, D.V., 2009. Striatal spine plasticity in Parkinson's disease: pathological or not? *Parkinsonism Relat Disord* 15 Suppl 3, S156–161. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(09\)70805-3](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(09)70805-3)
- Snyder, G.L., Prickaerts, J., Wadenberg, M.-L., Zhang, L., Zheng, H., Yao, W., Akkerman, S., Zhu, H., Hendrick, J.P., Vanover, K.E., Davis, R., Li, P., Mates, S., Wennogle, L.P., 2016. Preclinical profile of ITI-214, an inhibitor of phosphodiesterase 1, for enhancement of memory performance in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 233, 3113–3124. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4346-2>
- Solís, O., Espadas, I., Del-Bel, E.A., Moratalla, R., 2015. Nitric oxide synthase inhibition decreases L-DOPA-induced dyskinesia and the expression of striatal molecular markers in Pitx3^{-/-} aphakia mice. *Neurobiology of Disease* 73, 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.09.010>
- Song, R.S., Massenburg, B., Wenderski, W., Jayaraman, V., Thompson, L., Neves, S.R., 2013. ERK regulation of phosphodiesterase 4 enhances dopamine-stimulated AMPA receptor membrane insertion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 15437–15442. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311783110>
- Song, R.S., Tolentino, R., Sobie, E.A., Neves-Zaph, S.R., 2016. Cross-regulation of Phosphodiesterase 1 and Phosphodiesterase 2 Activities Controls Dopamine-mediated Striatal α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid (AMPA) Receptor Trafficking. *J Biol Chem* 291, 23257–23267. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.749747>
- Sonnenburg, W.K., Mullaney, P.J., Beavo, J.A., 1991. Molecular cloning of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase cDNA. Identification and distribution of isozyme variants. *J Biol Chem* 266, 17655–17661.
- Sossi, V., Dinelle, K., Topping, G.J., Holden, J.E., Doudet, D., Schulzer, M., Ruth, T.J., Stoessl, A.J., de la Fuente-Fernandez, R., 2009. Dopamine transporter relation to levodopa-derived synaptic dopamine in a rat model of Parkinson's: an in vivo imaging study. *J Neurochem* 109, 85–92. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05904.x>
- Starr, M.S., Starr, B.S., 1995. Do NMDA receptor-mediated changes in motor behaviour involve nitric oxide? *Eur J Pharmacol* 272, 211–217. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(94\)00644-m](https://doi.org/10.1016/0014-2999(94)00644-m)
- Stephens, B., Mueller, A.J., Shering, A.F., Hood, S.H., Taggart, P., Arbuthnott, G.W., Bell, J.E., Kilford, L., Kingsbury, A.E., Daniel, S.E., Ingham, C.A., 2005. Evidence of a breakdown of corticostriatal connections in Parkinson's disease. *Neuroscience* 132, 741–754. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.01.007>
- Stephenson, D.T., Coskran, T.M., Kelly, M.P., Kleiman, R.J., Morton, D., O'Neill, S.M., Schmidt, C.J., Weinberg, R.J., Menniti, F.S., 2012. The distribution of phosphodiesterase 2A in the rat brain. *Neuroscience* 226, 145–155. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.09.011>
- Stewart, J., Deschamps, S.E., Amir, S., 1994. Inhibition of nitric oxide synthase does not block the development of sensitization to the behavioral activating effects of amphetamine. *Brain Res* 641, 141–144. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91827-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91827-9)

- Stipanovich, A., Valjent, E., Matamales, M., Nishi, A., Ahn, J.-H., Maroteaux, M., Bertran-Gonzalez, J., Bami-Cherrier, K., Enslin, H., Corbillé, A.-G., Filhol, O., Nairn, A.C., Greengard, P., Hervé, D., Girault, J.-A., 2008. A phosphatase cascade by which rewarding stimuli control nucleosomal response. *Nature* 453, 879–884. <https://doi.org/10.1038/nature06994>
- Straub, C., Saulnier, J.L., Bègue, A., Feng, D.D., Huang, K.W., Sabatini, B.L., 2016. Principles of Synaptic Organization of GABAergic Interneurons in the Striatum. *Neuron* 92, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.007>
- Straub, C., Tritsch, N.X., Hagan, N.A., Gu, C., Sabatini, B.L., 2014. Multiphasic Modulation of Cholinergic Interneurons by Nigrostriatal Afferents. *Journal of Neuroscience* 34, 8557–8569. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0589-14.2014>
- Strick, C.A., Schmidt, C., Menniti, F., 2006. Pde10a: A Striatum-Enriched, Dual-Substrate Phosphodiesterase 237–254. <https://doi.org/10.1201/9781420020847.ch12>
- Suarez, L.M., Alberquilla, S., García-Montes, J.R., Moratalla, R., 2018. Differential Synaptic Remodeling by Dopamine in Direct and Indirect Striatal Projection Neurons in *Pitx3*^{-/-} Mice, a Genetic Model of Parkinson's Disease. *J Neurosci* 38, 3619–3630. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3184-17.2018>
- Suárez, L.M., Solís, O., Caramés, J.M., Taravini, I.R., Solís, J.M., Murer, M.G., Moratalla, R., 2014. L-DOPA treatment selectively restores spine density in dopamine receptor D2-expressing projection neurons in dyskinetic mice. *Biol Psychiatry* 75, 711–722. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.05.006>
- Sugiyama, K., Kuroiwa, M., Shuto, T., Ohnishi, Y.N., Kawahara, Y., Miyamoto, Y., Fukuda, T., Nishi, A., 2021. Subregion-Specific Regulation of Dopamine D1 Receptor Signaling in the Striatum: Implication for L-DOPA-Induced Dyskinesia. *J Neurosci* 41, 6388–6414. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0373-21.2021>
- Sulzer, D., Zhang, H., Benoit-Marand, M., Gonon, F., 2010. Chapter 17 - Regulation of Extracellular Dopamine: Release and Reuptake, in: Steiner, H., Tseng, K.Y. (Eds.), *Handbook of Behavioral Neuroscience, Handbook of Basal Ganglia Structure and Function*. Elsevier, pp. 297–319. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374767-9.00017-2>
- Surmeier, D.J., Ding, J., Day, M., Wang, Z., Shen, W., 2007. D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends in Neurosciences* 30, 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.008>
- Surmeier, D.J., Stefani, A., Foehring, R.C., Kitai, S.T., 1991. Developmental regulation of a slowly-inactivating potassium conductance in rat neostriatal neurons. *Neuroscience Letters* 122, 41–46. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(91\)90188-Y](https://doi.org/10.1016/0304-3940(91)90188-Y)
- Svenningsson, P., Tzavara, E.T., Carruthers, R., Rachleff, I., Wattler, S., Nehls, M., McKinzie, D.L., Fienberg, A.A., Nomikos, G.G., Greengard, P., 2003. Diverse psychotomimetics act through a common signaling pathway. *Science* 302, 1412–1415. <https://doi.org/10.1126/science.1089681>
- Tai, L.-H., Lee, A.M., Benavidez, N., Bonci, A., Wilbrecht, L., 2012. Transient stimulation of distinct subpopulations of striatal neurons mimics changes in action value. *Nat Neurosci* 15, 1281–1289. <https://doi.org/10.1038/nn.3188>
- Takagi, H., Shiosaka, S., Tohyama, M., Senba, E., Sakanaka, M., 1980. Ascending components of the medial forebrain bundle from the lower brain stem in the rat,

- with special reference to raphe and catecholamine cell groups. A study by the HRP method. *Brain Res* 193, 315–337. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(80\)90168-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(80)90168-7)
- Takuma, K., Tanaka, T., Takahashi, T., Hiramatsu, N., Ota, Y., Ago, Y., Matsuda, T., 2012. Neuronal nitric oxide synthase inhibition attenuates the development of L-DOPA-induced dyskinesia in hemi-Parkinsonian rats. *European Journal of Pharmacology* 683, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.03.008>
- Tallaksen-Greene, S.J., Kaatz, K.W., Romano, C., Albin, R.L., 1998. Localization of mGluR1a-like immunoreactivity and mGluR5-like immunoreactivity in identified populations of striatal neurons. *Brain Res* 780, 210–217. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(97\)01141-4](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)01141-4)
- Tanaka, H., Kannari, K., Maeda, T., Tomiyama, M., Suda, T., Matsunaga, M., 1999. Role of serotonergic neurons in L-DOPA-derived extracellular dopamine in the striatum of 6-OHDA-lesioned rats: *NeuroReport* 10, 631–634. <https://doi.org/10.1097/00001756-199902250-00034>
- Tarazi, F.I., Campbell, A., Yeghiayan, S.K., Baldessarini, R.J., 1998. Localization of ionotropic glutamate receptors in caudate-putamen and nucleus accumbens septi of rat brain: comparison of NMDA, AMPA, and kainate receptors. *Synapse* 30, 227–235. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(199810\)30:2<227::AID-SYN13>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(199810)30:2<227::AID-SYN13>3.0.CO;2-Z)
- Taskén, K., Aandahl, E.M., 2004. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev* 84, 137–167. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2003>
- Taylor, S.S., Buechler, J.A., Yonemoto, W., 1990. cAMP-DEPENDENT PROTEIN KINASE: FRAMEWORK FOR A DIVERSE FAMILY OF REGULATORY ENZYMES. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 971–1005. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.59.070190.004543>
- Taylor, S.S., Kim, C., Cheng, C.Y., Brown, S.H.J., Wu, J., Kannan, N., 2008. Signaling through cAMP and cAMP-dependent protein kinase: diverse strategies for drug design. *Biochim Biophys Acta* 1784, 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.10.002>
- Tecuapetla, F., Jin, X., Lima, S.Q., Costa, R.M., 2016. Complementary Contributions of Striatal Projection Pathways to Action Initiation and Execution. *Cell* 166, 703–715. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.032>
- Tepper, J.M., Bolam, J.P., 2004. Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Current Opinion in Neurobiology* 14, 685–692. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2004.10.003>
- Tepper, J.M., Sharpe, N.A., Koós, T.Z., Trent, F., 1998. Postnatal development of the rat neostriatum: electrophysiological, light- and electron-microscopic studies. *Dev Neurosci* 20, 125–145. <https://doi.org/10.1159/000017308>
- Tepper, J.M., Trent, F., 1993. In vivo studies of the postnatal development of rat neostriatal neurons. *Prog Brain Res* 99, 35–50. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)61337-0](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)61337-0)
- Testa, C., Standaert, D., Young, A., Penney, J., 1994. Metabotropic glutamate receptor mRNA expression in the basal ganglia of the rat. *J Neurosci* 14, 3005–3018. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-05-03005.1994>
- The synaptic organization of the caudate nucleus, 1971. . *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 262, 403–412. <https://doi.org/10.1098/rstb.1971.0103>

- Thiele, S.L., Warre, R., Nash, J.E., 2012. Development of a Unilaterally-lesioned 6-OHDA Mouse Model of Parkinson's Disease. *JoVE* 3234. <https://doi.org/10.3791/3234>
- Thomas, M.K., Francis, S.H., Corbin, J.D., 1990. Characterization of a purified bovine lung cGMP-binding cGMP phosphodiesterase. *J Biol Chem* 265, 14964–14970.
- Thompson, W.J., 1991. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Pharmacology, biochemistry and function. *Pharmacology & Therapeutics* 51, 13–33. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(91\)90039-O](https://doi.org/10.1016/0163-7258(91)90039-O)
- Threlfell, S., Lalic, T., Platt, N.J., Jennings, K.A., Deisseroth, K., Cragg, S.J., 2012. Striatal dopamine release is triggered by synchronized activity in cholinergic interneurons. *Neuron* 75, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.04.038>
- Threlfell, S., Sammut, S., Menniti, F.S., Schmidt, C.J., West, A.R., 2009. Inhibition of Phosphodiesterase 10A Increases the Responsiveness of Striatal Projection Neurons to Cortical Stimulation. *J Pharmacol Exp Ther* 328, 785–795. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.146332>
- Threlfell, S., West, A.R., 2013. Modulation of striatal neuron activity by cyclic nucleotide signalling and phosphodiesterase inhibition. *Basal Ganglia* 3, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.baga.2013.08.001>
- Tiberi, M., Jarvie, K.R., Silvia, C., Falardeau, P., Gingrich, J.A., Godinot, N., Bertrand, L., Yang-Feng, T.L., Fremeau, R.T., Caron, M.G., 1991. Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1A receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 7491–7495. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.17.7491>
- Tkatch, T., Baranauskas, G., Surmeier, D.J., 2000. Kv4.2 mRNA abundance and A-type K(+) current amplitude are linearly related in basal ganglia and basal forebrain neurons. *J Neurosci* 20, 579–588.
- Trifilieff, P., Rives, M.-L., Urizar, E., Piskorowski, R.A., Vishwasrao, H.D., Castrillon, J., Schmauss, C., Slättman, M., Gullberg, M., Javitch, J.A., 2011. Detection of antigen interactions ex vivo by proximity ligation assay: endogenous dopamine D2-adenosine A2A receptor complexes in the striatum. *BioTechniques* 51, 111–118. <https://doi.org/10.2144/000113719>
- Tseng, K.Y., Caballero, A., Dec, A., Cass, D.K., Simak, N., Sunu, E., Park, M.J., Blume, S.R., Sammut, S., Park, D.J., West, A.R., 2011. Inhibition of striatal soluble guanylyl cyclase-cGMP signaling reverses basal ganglia dysfunction and akinesia in experimental parkinsonism. *PLoS One* 6, e27187. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027187>
- Tseng, K.Y., Kasanetz, F., Kargieman, L., Riquelme, L.A., Murer, M.G., 2001. Cortical Slow Oscillatory Activity Is Reflected in the Membrane Potential and Spike Trains of Striatal Neurons in Rats with Chronic Nigrostriatal Lesions. *J. Neurosci.* 21, 6430–6439. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-16-06430.2001>
- Tu, J.C., Xiao, B., Naisbitt, S., Yuan, J.P., Petralia, R.S., Brakeman, P., Doan, A., Aakalu, V.K., Lanahan, A.A., Sheng, M., Worley, P.F., 1999. Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron* 23, 583–592. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80810-7](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80810-7)
- Tubert, C., Taravini, I.R.E., Flores-Barrera, E., Sánchez, G.M., Prost, M.A., Avale, M.E., Tseng, K.Y., Rela, L., Murer, M.G., 2016. Decrease of a Current Mediated by Kv1.3 Channels Causes Striatal Cholinergic Interneuron Hyperexcitability in

- Experimental Parkinsonism. *Cell Rep* 16, 2749–2762. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.016>
- Ungerstedt, U., 1971. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand Suppl* 367, 69–93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-201x.1971.tb11000.x>
- Ungerstedt, U., 1968. 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *European Journal of Pharmacology* 5, 107–110. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(68\)90164-7](https://doi.org/10.1016/0014-2999(68)90164-7)
- Urakubo, H., Yagishita, S., Kasai, H., Ishii, S., 2020. Signaling models for dopamine-dependent temporal contiguity in striatal synaptic plasticity. *PLoS Comput Biol* 16, e1008078. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008078>
- Usui, H., Inoue, R., Tanabe, O., Nishito, Y., Shimizu, M., Hayashi, H., Kagamiyama, H., Takeda, M., 1998. Activation of protein phosphatase 2A by cAMP-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation of the 74-kDa B' (delta) regulatory subunit in vitro and identification of the phosphorylation sites. *FEBS Lett* 430, 312–316. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00684-x](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00684-x)
- Valjent, E., Bertran-Gonzalez, J., Hervé, D., Fisone, G., Girault, J.-A., 2009. Looking BAC at striatal signaling: cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends in Neurosciences* 32, 538–547. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.06.005>
- Vallone, D., Picetti, R., Borrelli, E., 2000. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev* 24, 125–132. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(99\)00063-9](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(99)00063-9)
- Valtcheva, S., Paillé, V., Dembitskaya, Y., Perez, S., Gangarossa, G., Fino, E., Venance, L., 2017. Developmental control of spike-timing-dependent plasticity by tonic GABAergic signaling in striatum. *Neuropharmacology* 121, 261–277. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.04.012>
- Vandecasteele, G., Verde, I., Rücker-Martin, C., Donzeau-Gouge, P., Fischmeister, R., 2001. Cyclic GMP regulation of the L-type Ca²⁺ channel current in human atrial myocytes. *The Journal of Physiology* 533, 329–340. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0329a.x>
- Verde, I., Vandecasteele, G., Lezoualc'h, F., Fischmeister, R., 1999. Characterization of the cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes involved in the regulation of the L-type Ca²⁺ current in rat ventricular myocytes. *British Journal of Pharmacology* 127, 65–74. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702506>
- Vettel, C., Lindner, M., Dewenter, M., Lorenz, K., Schanbacher, C., Riedel, M., Lämmle, S., Meinecke, S., Mason, F.E., Sossalla, S., Geerts, A., Hoffmann, M., Wunder, F., Brunner, F.J., Wieland, T., Mehel, H., Karam, S., Lechêne, P., Leroy, J., Vandecasteele, G., Wagner, M., Fischmeister, R., El-Armouche, A., 2017. Phosphodiesterase 2 Protects Against Catecholamine-Induced Arrhythmia and Preserves Contractile Function After Myocardial Infarction. *Circ Res* 120, 120–132. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.310069>
- Villalba, R.M., Lee, H., Smith, Y., 2009. Dopaminergic denervation and spine loss in the striatum of MPTP-treated monkeys. *Exp Neurol* 215, 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.09.025>
- Vincent, S.R., 1994. Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 42, 129–160. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(94\)90023-x](https://doi.org/10.1016/0301-0082(94)90023-x)

- Vincent, S.R., Johansson, O., Hökfelt, T., Skirboll, L., Elde, R.P., Terenius, L., Kimmel, J., Goldstein, M., 1983. NADPH-diaphorase: a selective histochemical marker for striatal neurons containing both somatostatin- and avian pancreatic polypeptide (APP)-like immunoreactivities. *J Comp Neurol* 217, 252–263. <https://doi.org/10.1002/cne.902170303>
- Virhammar, J., Nyholm, D., 2017. Levodopa-carbidopa enteral suspension in advanced Parkinson's disease: clinical evidence and experience. *Ther Adv Neurol Disord* 10, 171–187. <https://doi.org/10.1177/1756285616681280>
- Virshup, D.M., Shenolikar, S., 2009. From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Mol Cell* 33, 537–545. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.02.015>
- Voorn, P., Kalsbeek, A., Jorritsma-Byham, B., Groenewegen, H.J., 1988. The pre- and postnatal development of the dopaminergic cell groups in the ventral mesencephalon and the dopaminergic innervation of the striatum of the rat. *Neuroscience* 25, 857–887. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(88\)90041-3](https://doi.org/10.1016/0306-4522(88)90041-3)
- Voorn, P., Vanderschuren, L.J.M.J., Groenewegen, H.J., Robbins, T.W., Pennartz, C.M.A., 2004. Putting a spin on the dorsal–ventral divide of the striatum. *Trends in Neurosciences* 27, 468–474. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.06.006>
- Waelti, P., Dickinson, A., Schultz, W., 2001. Dopamine responses comply with basic assumptions of formal learning theory. *Nature* 412, 43–48. <https://doi.org/10.1038/35083500>
- Walaas, S.I., Aswad, D.W., Greengard, P., 1983. A dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. *Nature* 301, 69–71. <https://doi.org/10.1038/301069a0>
- Walaas, S.I., Greengard, P., 1984. DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. I. Regional and cellular distribution in the rat brain. *J Neurosci* 4, 84–98.
- Walker, R.H., Arbuthnott, G.W., Baughman, R.W., Graybiel, A.M., 1993. Dendritic domains of medium spiny neurons in the primate striatum: relationships to striosomal borders. *J Comp Neurol* 337, 614–628. <https://doi.org/10.1002/cne.903370407>
- Wang, Y., Wang, H.S., Wang, T., Huang, C., Liu, J., 2014. L-DOPA-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease is associated with the fluctuational release of norepinephrine in the sensorimotor striatum. *J Neurosci Res* 92, 1733–1745. <https://doi.org/10.1002/jnr.23439>
- Wang, Z., Kai, L., Day, M., Ronesi, J., Yin, H.H., Ding, J., Tkatch, T., Lovinger, D.M., Surmeier, D.J., 2006. Dopaminergic Control of Corticostriatal Long-Term Synaptic Depression in Medium Spiny Neurons Is Mediated by Cholinergic Interneurons. *Neuron* 50, 443–452. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.04.010>
- Wechsler, J., Choi, Y.-H., Krall, J., Ahmad, F., Manganiello, V.C., Movsesian, M.A., 2002. Isoforms of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE3A in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 277, 38072–38078. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203647200>
- Weiner, D.M., Levey, A.I., Brann, M.R., 1990. Expression of muscarinic acetylcholine and dopamine receptor mRNAs in rat basal ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7050–7054. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.18.7050>

- Weisenhaus, M., Allen, M.L., Yang, L., Lu, Y., Nichols, C.B., Su, T., Hell, J.W., McKnight, G.S., 2010. Mutations in AKAP5 disrupt dendritic signaling complexes and lead to electrophysiological and behavioral phenotypes in mice. *PLoS One* 5, e10325. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010325>
- Wess, J., 1996. Molecular Biology of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Crit Rev Neurobiol* 10, 69–99. <https://doi.org/10.1615/CritRevNeurobiol.v10.i1.40>
- West, A.R., Galloway, M.P., Grace, A.A., 2002. Regulation of striatal dopamine neurotransmission by nitric oxide: effector pathways and signaling mechanisms. *Synapse* 44, 227–245. <https://doi.org/10.1002/syn.10076>
- West, A.R., Grace, A.A., 2004. The nitric oxide-guanylyl cyclase signaling pathway modulates membrane activity States and electrophysiological properties of striatal medium spiny neurons recorded in vivo. *J Neurosci* 24, 1924–1935. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4470-03.2004>
- West, A.R., Tseng, K.Y., 2011. Nitric Oxide–Soluble Guanylyl Cyclase–Cyclic GMP Signaling in the Striatum: New Targets for the Treatment of Parkinson’s Disease? *Front. Syst. Neurosci.* 5. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00055>
- Westin, J.E., Vercammen, L., Strome, E.M., Konradi, C., Cenci, M.A., 2007. Spatiotemporal pattern of striatal ERK1/2 phosphorylation in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia and the role of dopamine D1 receptors. *Biol Psychiatry* 62, 800–810. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.11.032>
- Whalin, M.E., Scammell, J.G., Strada, S.J., Thompson, W.J., 1991. Phosphodiesterase II, the cGMP-activatable cyclic nucleotide phosphodiesterase, regulates cyclic AMP metabolism in PC12 cells. *Mol Pharmacol* 39, 711–717.
- Wickens, J.R., Arbuthnott, G.W., 2005. Chapter IV Structural and functional interactions in the striatum at the receptor level, in: *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Elsevier, pp. 199–236. [https://doi.org/10.1016/S0924-8196\(05\)80008-9](https://doi.org/10.1016/S0924-8196(05)80008-9)
- Wickham, R.J., Solecki, W., Rathbun, L.R., Neugebauer, N.M., Wightman, R.M., Addy, N.A., 2013. Advances in studying phasic dopamine signaling in brain reward mechanisms. *Front Biosci (Elite Ed)* 0, 982–999.
- Wightman, R.M., Zimmerman, J.B., 1990. Control of dopamine extracellular concentration in rat striatum by impulse flow and uptake. *Brain Research Reviews* 15, 135–144. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(90\)90015-G](https://doi.org/10.1016/0165-0173(90)90015-G)
- Willis, G.L., Donnan, G.A., 1987. Histochemical, biochemical and behavioural consequences of MPTP treatment in C-57 black mice. *Brain Res* 402, 269–274. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)90033-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)90033-3)
- Wilson, C., Chang, H., Kitai, S., 1990. Firing patterns and synaptic potentials of identified giant aspiny interneurons in the rat neostriatum. *J. Neurosci.* 10, 508–519. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-02-00508.1990>
- Wilson, C., Kawaguchi, Y., 1996. The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. *J Neurosci* 16, 2397–2410. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-07-02397.1996>
- Wilson, C.J., Groves, P.M., 1980. Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular inject of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 194, 599–615. <https://doi.org/10.1002/cne.901940308>
- Winkler, C., Kirik, D., Björklund, A., Cenci, M.A., 2002. L-DOPA-Induced Dyskinesia in the Intrastratial 6-Hydroxydopamine Model of Parkinson’s Disease: Relation to

- Motor and Cellular Parameters of Nigrostriatal Function. *Neurobiology of Disease* 10, 165–186. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2002.0499>
- Witzig, V.S., Komnig, D., Falkenburger, B.H., 2020. Changes in Striatal Medium Spiny Neuron Morphology Resulting from Dopamine Depletion Are Reversible. *Cells* 9, 2441. <https://doi.org/10.3390/cells9112441>
- Won, L., Ding, Y., Singh, P., Kang, U.J., 2014. Striatal cholinergic cell ablation attenuates L-DOPA induced dyskinesia in Parkinsonian mice. *J Neurosci* 34, 3090–3094. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2888-13.2014>
- Wu, A.Y., Tang, X.-B., Martinez, S.E., Ikeda, K., Beavo, J.A., 2004. Molecular Determinants for Cyclic Nucleotide Binding to the Regulatory Domains of Phosphodiesterase 2A. *J. Biol. Chem.* 279, 37928–37938. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404287200>
- Wykes, V., Bellamy, T.C., Garthwaite, J., 2002. Kinetics of nitric oxide-cyclic GMP signalling in CNS cells and its possible regulation by cyclic GMP: NO-cGMP dynamics in CNS cells. *Journal of Neurochemistry* 83, 37–47. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01106.x>
- Xie, Z., Adamowicz, W.O., Eldred, W.D., Jakowski, A.B., Kleiman, R.J., Morton, D.G., Stephenson, D.T., Strick, C.A., Williams, R.D., Menniti, F.S., 2006. Cellular and subcellular localization of PDE10A, a striatum-enriched phosphodiesterase. *Neuroscience* 139, 597–607. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.12.042>
- Xu, Y., Zhang, H.-T., O'Donnell, J.M., 2011. Phosphodiesterases in the Central Nervous System: Implications in Mood and Cognitive Disorders, in: Francis, S.H., Conti, M., Houslay, M.D. (Eds.), *Phosphodiesterases as Drug Targets, Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 447–485. https://doi.org/10.1007/978-3-642-17969-3_19
- Yagishita, S., Hayashi-Takagi, A., Ellis-Davies, G.C.R., Urakubo, H., Ishii, S., Kasai, H., 2014. A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines. *Science* 345, 1616–1620. <https://doi.org/10.1126/science.1255514>
- Yan, Z., Song, W.J., Surmeier, J., 1997. D2 dopamine receptors reduce N-type Ca²⁺ currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a membrane-delimited, protein-kinase-C-insensitive pathway. *J Neurophysiol* 77, 1003–1015. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.77.2.1003>
- Yan, Z., Surmeier, D.J., 1997. D5 dopamine receptors enhance Zn²⁺-sensitive GABA(A) currents in striatal cholinergic interneurons through a PKA/PP1 cascade. *Neuron* 19, 1115–1126. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80402-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80402-x)
- Yang, L., Gilbert, M.L., Zheng, R., McKnight, G.S., 2014. Selective Expression of a Dominant-Negative Type Iα PKA Regulatory Subunit in Striatal Medium Spiny Neurons Impairs Gene Expression and Leads to Reduced Feeding and Locomotor Activity. *J. Neurosci.* 34, 4896–4904. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3460-13.2014>
- Yang, Q., Paskind, M., Bolger, G., Thompson, W.J., Repaske, D.R., Cutler, L.S., Epstein, P.M., 1994. A Novel Cyclic GMP Stimulated Phosphodiesterase from Rat Brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 205, 1850–1858. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.2886>
- Yapo, C., Nair, A.G., Clement, L., Castro, L.R., Hellgren Kotaleski, J., Vincent, P., 2017. Detection of phasic dopamine by D1 and D2 striatal medium spiny neurons:

- Comparison of D1 and D2 responsiveness to transient dopamine. *J Physiol* 595, 7451–7475. <https://doi.org/10.1113/JP274475>
- Yapo, C., Nair, A.G., Hellgren Kotaleski, J., Vincent, P., Castro, L.R.V., 2018. Switch-like PKA responses in the nucleus of striatal neurons. *Journal of Cell Science* jcs.216556. <https://doi.org/10.1242/jcs.216556>
- Yin, H.H., Knowlton, B.J., 2006. The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat Rev Neurosci* 7, 464–476. <https://doi.org/10.1038/nrn1919>
- Young, W.S., Bonner, T.I., Brann, M.R., 1986. Mesencephalic dopamine neurons regulate the expression of neuropeptide mRNAs in the rat forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 9827–9831. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.24.9827>
- Zaitone, S.A., Abo-Elmatty, D.M., Elshazly, S.M., 2012. Piracetam and vinpocetine ameliorate rotenone-induced Parkinsonism in rats. *Indian J Pharmacol* 44, 774–779. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.103300>
- Zaja-Milatovic, S., Milatovic, D., Schantz, A.M., Zhang, J., Montine, K.S., Samii, A., Deutch, A.Y., Montine, T.J., 2005. Dendritic degeneration in neostriatal medium spiny neurons in Parkinson disease. *Neurology* 64, 545–547. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000150591.33787.A4>
- Zhai, S., Shen, W., Graves, S.M., Surmeier, D.J., 2019. Dopaminergic modulation of striatal function and Parkinson's disease. *J Neural Transm* 126, 411–422. <https://doi.org/10.1007/s00702-019-01997-y>
- Zhang, K.Y.J., Card, G.L., Suzuki, Y., Artis, D.R., Fong, D., Gillette, S., Hsieh, D., Neiman, J., West, B.L., Zhang, C., Milburn, M.V., Kim, S.-H., Schlessinger, J., Bollag, G., 2004. A Glutamine Switch Mechanism for Nucleotide Selectivity by Phosphodiesterases. *Molecular Cell* 15, 279–286. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.07.005>
- Zhang, W., Yamada, M., Gomeza, J., Basile, A.S., Wess, J., 2002. Multiple Muscarinic Acetylcholine Receptor Subtypes Modulate Striatal Dopamine Release, as Studied with M₁–M₅ Muscarinic Receptor Knock-Out Mice. *J. Neurosci.* 22, 6347–6352. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-15-06347.2002>
- Zhao, Z., K, Z., X, L., H, Y., X, M., S, Z., J, Z., L, W., X, W., 2016. Involvement of HCN Channel in Muscarinic Inhibitory Action on Tonic Firing of Dorsolateral Striatal Cholinergic Interneurons. *Frontiers in cellular neuroscience* 10. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00071>
- Zhuang, Y., Krumm, B., Zhang, H., Zhou, X.E., Wang, Y., Huang, X.-P., Liu, Y., Cheng, X., Jiang, Y., Jiang, H., Zhang, C., Yi, W., Roth, B.L., Zhang, Y., Xu, H.E., 2021. Mechanism of dopamine binding and allosteric modulation of the human D1 dopamine receptor. *Cell Res* 31, 593–596. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00482-0>
- Zigmond, M.J., 1997. Do compensatory processes underlie the preclinical phase of neurodegenerative disease? Insights from an animal model of parkinsonism. *Neurobiol Dis* 4, 247–253. <https://doi.org/10.1006/nbdi.1997.0157>
- Zigmond, M.J., Abercrombie, E.D., Berger, T.W., Grace, A.A., Stricker, E.M., 1990. Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications. *Trends in Neurosciences* 13, 290–296. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(90\)90112-N](https://doi.org/10.1016/0166-2236(90)90112-N)

- Zigmond, M.J., Hastings, T.G., Abercrombie, E.D., 1992. Neurochemical responses to 6-hydroxydopamine and L-dopa therapy: implications for Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 648, 71–86. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb24525.x>
- Zoraghi, R., Corbin, J.D., Francis, S.H., 2004. Properties and functions of GAF domains in cyclic nucleotide phosphodiesterases and other proteins. *Mol Pharmacol* 65, 267–278. <https://doi.org/10.1124/mol.65.2.267>
- Ztaou, S., Maurice, N., Camon, J., Guiraudie-Capraz, G., Kerkerian-Le Goff, L., Beurrier, C., Liberge, M., Amalric, M., 2016. Involvement of Striatal Cholinergic Interneurons and M1 and M4 Muscarinic Receptors in Motor Symptoms of Parkinson's Disease. *J Neurosci* 36, 9161–9172. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0873-16.2016>
- Zucca, S., Zucca, A., Nakano, T., Aoki, S., Wickens, J., 2018. Pauses in cholinergic interneuron firing exert an inhibitory control on striatal output in vivo. *Elife* 7, e32510. <https://doi.org/10.7554/eLife.32510>

ABSTRACT FOR NON-BIOLOGIST

The striatum is a brain region involved in the dopamine-mediated initiation of movements. Medium-sized spiny neurons (MSN) are stimulated by dopamine and inhibited by modulatory cholinergic neurons (ChIN). In Parkinson's disease, the decrease of dopamine level is responsible for motor symptoms (tremors, rigidity...). The reference treatment, a precursor of dopamine, compensates the reduction of dopamine level. Unfortunately, after several years of treatment, unwanted side effects called dyskinesia (involuntary movement) develop. Dyskinesia are caused by an overactivation of MSN, and we propose to limit this overactivation by activating an enzyme called phosphodiesterase 2A (PDE2A) which contributes to the extinction of the response to dopamine in MSNs. Indeed, nitric oxide (NO) specifically stimulates PDE2A in MSNs, which counteracts the excessive response to dopamine. Symmetrically, NO indirectly inhibits PDE3 in ChIN, which increases their activity and inhibits MSNs, therefore reinforcing the antidyskinetic effect.

RESUME GRAND PUBLIC

Le striatum est une région cérébrale responsable de la mise en place des mouvements, où l'activité des neurones épineux du striatum (MSN) est stimulée par la dopamine et inhibée par l'activité de neurones modulateurs cholinergiques (ChIN). Dans la maladie de Parkinson, la baisse de la dopamine génère des symptômes moteurs (tremblements, rigidité...). Le traitement de référence, un précurseur de la dopamine, compense le manque de dopamine, mais entraîne sur le long terme des mouvements involontaires (dyskinésies), résultant d'une sur-activation de certains MSN. Pour limiter les dyskinésies, nous proposons d'activer la PDE2A, qui participe à l'extinction de l'effet de la dopamine sur les MSNs. Le monoxyde d'azote (NO) est capable d'activer spécifiquement cette PDE2A dans les MSNs. Le monoxyde d'azote (NO) est capable d'activer spécifiquement cette PDE2A dans les MSNs, et s'oppose ainsi à leur réponse excessive. En même temps, le NO inhibe la PDE3 dans les ChIN, renforçant l'effet anti-dyskinétique.

ABSTRACT

Second messengers are spatially and temporally dynamics which enable the cells to respond to multiple extracellular signaling molecules. In the striatum, cAMP and cGMP are highly involved in the integration of dopaminergic signal and their dynamics depends on their production by adenylyl or guanylyl cyclases, respectively, and their hydrolysis by phosphodiesterases (PDE). During my thesis, I studied the functional implication of PDE in the cAMP/PKA signaling pathway in two different types of neurons: cholinergic interneurons (ChIN) and medium-sized spiny neurons (MSNs). Those neurons express different types of PDE with different biochemical properties, allowing for cross-talks between the cGMP and the cAMP pathways. Biosensor imaging reports in real time the cAMP/PKA signals in living neurons, which allows us to study the role of each PDE in ChIN and MSNs.

First, my work highlighted the functional role of PDE10A, PDE4 and PDE2A in the integration of dopaminergic signaling in D1- and D2-type MSN. PDE10A, exclusively expressed in MSNs, is essential to maintain low basal cAMP and its activity is required to de-activate PKA. Inhibiting PDE10A to restore a functional cAMP/PKA signaling in disorders such as Parkinson's disease or Huntington's disease would thus probably lead to an overactivated PKA signaling pathway consistent with the unwanted side effects reported in previous clinical trials. In contrast, PDE2A and PDE4 moderate the amplitude of dopamine responses, at the level of cAMP and PKA. This suggests that targeting PDE2A or PDE4 could be a strategy to finely tune the amplitude of dopamine responses without altering the temporal response critical for striatal functions.

Second, I studied the role of NO/GMPc signaling on the regulation of cAMP and PKA. An opposite action of NO donor on cAMP levels has been highlighted in D1 MSNs and ChIN. In ChIN, the increase of cGMP by NO donor inhibits, by competition, PDE3A, which increases cAMP levels. On the contrary, the activation of NO/cGMP pathway in D1 MSNs stimulates PDE2A activity, which reduces the amplitude of dopamine response without suppressing it.

We thought that this property of PDE2A could have a therapeutic use. In Parkinson's disease, the progressive loss of dopaminergic neurons is associated with a hypersensitivity of D1 MSNs to dopamine. This adaptation combined with the reference treatment, L-DOPA, lead to an over-activation of cAMP/PKA signaling which are responsible for the development of L-DOPA-induced dyskinesia (LID). In this context, my work highlighted the positive effect of PD2A stimulation by NO donor in the reduction of excessive cAMP level and PKA activity in dyskinetic mice. Therefore, the activation of PDE2A could represent a novel therapeutic strategy to treat LID.

RESUME

La dynamique spatiale et temporelle des seconds messagers permet à une cellule d'intégrer plusieurs signaux extracellulaires et ainsi de constamment s'adapter à son environnement. Dans le striatum, l'AMPc et le GMPc sont deux messagers secondaires hautement impliqués dans l'intégration du signal dopaminergique. La dynamique de ces seconds messagers est dépendante de leur production par les adénylyl ou guanylyl cyclases, respectivement, et de leur hydrolyse par les phosphodiesterases (PDE). Mon travail de thèse consiste à étudier le rôle fonctionnel de ces PDE dans la régulation de la voie AMPc/PKA dans deux types de neurones du striatum : les interneurons cholinergiques (ChIN) et les neurones épineux de taille moyenne (MSNs). Ces neurones expriment différentes familles de PDE, qui possèdent des propriétés biochimiques distinctes. L'imagerie de biosenseurs nous a permis d'étudier en temps réel et dans des neurones morphologiquement intacts, le rôle spécifique de différentes PDE sur la dynamique de la signalisation intracellulaire AMPc/PKA dans ces neurones.

Dans une première partie, nous avons mis en évidence une contribution fonctionnelle spécifique des PDE10A, PDE4 et PDE2A dans l'intégration du signal dopaminergique des MSNs de type D1 et D2. Nous avons montré que la PDE10A, spécifiquement exprimée dans les MSNs, est essentielle au maintien des niveaux de base d'AMPc et est requise pour la désactivation du signal PKA. La stratégie thérapeutique visant à inhiber la PDE10A semble donc délicate à mettre en œuvre car cela risque d'entraîner une hyperactivation de la voie AMPc/PKA dans les neurones MSNs D1 et D2. Cela pourrait expliquer les effets indésirables observés chez les patients traités par des inhibiteurs de la PDE10A conduisant à l'abandon de cette approche. Concernant la PDE2A et PDE4, elles régulent essentiellement l'amplitude de la réponse à la dopamine, aussi bien au niveau de l'AMPc que de la PKA. Ainsi, cibler ces deux PDE pourrait permettre de moduler la réponse à la dopamine tout en conservant le contraste temporel de cette réponse, essentiel au bon fonctionnement du striatum.

Dans un second temps, nous avons étudié l'action de la voie NO/GMPc sur la signalisation AMPc/PKA dans les MSNs D1 et les ChIN, cette action passant notamment par la PDE2A et la PDE3A, respectivement. Ces expériences ont mis en évidence un effet en miroir d'un donneur de NO sur les niveaux d'AMPc dans ces deux types de neurones. Chez les ChIN, l'augmentation des niveaux de GMPc par le NO conduit à l'inhibition de la PDE3A et donc à une augmentation des niveaux d'AMPc. A l'inverse, dans les MSNs D1, l'activation de la voie NO/GMPc augmente l'activité de la PDE2A et réduit l'amplitude de la réponse à la dopamine, sans toutefois la supprimer.

Dans la maladie de Parkinson, la perte progressive des neurones dopaminergiques est associée à une hypersensibilité des MSNs D1 à la dopamine. Cette adaptation combinée au traitement de référence, la L-DOPA, conduit à une sur-activation de la voie AMPc/PKA dans les MSNs D1, responsable des dyskinésies induites par la L-DOPA (LID). Dans ce contexte, les travaux de cette thèse ont mis en évidence que la stimulation de la PDE2A par l'activation de la voie NO/GMPc dans les MSNs D1 réduit efficacement les niveaux très élevés d'AMPc et l'activité de la PKA chez des souris dyskinétiques. Cibler l'activité de la PDE2A pourrait ainsi avoir un intérêt thérapeutique dans le traitement des LID.