



Etude des mécanismes pathogéniques de la maladie de Lesch-Nyhan en relation avec le système dopaminergique chez un organisme modèle, *Drosophila melanogaster*

Céline Petitgas

► To cite this version:

Céline Petitgas. Etude des mécanismes pathogéniques de la maladie de Lesch-Nyhan en relation avec le système dopaminergique chez un organisme modèle, *Drosophila melanogaster*. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Paris sciences et lettres, 2019. Français. ⟨NNT : 2019PSLET049⟩. ⟨tel-03275312⟩

HAL Id: tel-03275312

<https://pastel.hal.science/tel-03275312v1>

Submitted on 1 Jul 2021

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.



HAL Authorization



THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à l'ESPCI Paris

**Étude des mécanismes pathogéniques de la maladie de
Lesch-Nyhan en relation avec le système dopaminergique
chez un organisme modèle, *Drosophila melanogaster***

Soutenue par

Céline PETITGAS

Le 2 décembre 2019

École doctorale n°158

Cerveau, Cognition, Comportement

Spécialité

Neurosciences

Composition du jury :

Alice KUSTER PH, CHU de Nantes	<i>Rapporteur</i>
Thomas RIEMENSBERGER Senior Scientist, Université de Cologne	<i>Rapporteur</i>
Giovanni STEVANIN DR, EPHE - INSERM	<i>Président</i>
David BLUM DR, Université de Lille - INSERM	<i>Examineur</i>
Sandrine MARIE CR, Université Catholique de Louvain	<i>Examineur</i>
Serge BIRMAN DR, ESPCI - CNRS	<i>Directeur de thèse</i>

Remerciements

« *Tout seul on va plus vite, ensemble on va plus loin* » disait un proverbe africain. En effet, ces travaux de thèse n'auraient jamais été réalisés sans la collaboration et le soutien d'un certain nombre de personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à l'aboutissement de ce projet, et que je me dois de remercier chaleureusement.

J'aimerais tout d'abord adresser mes sincères remerciements à mon directeur de thèse, le Dr. Serge Birman, pour avoir accepté de superviser mon travail durant ces quatre années. Ce projet n'aurait jamais vu le jour sans votre implication à la fin de mon Master, et j'en suis pleinement reconnaissante. Vous avez toujours su être disponible et bienveillant à mon égard, et vos nombreux conseils et critiques constructives m'ont été d'une grande aide. Je vous remercie de m'avoir fait découvrir le monde de la drosophile qui m'a beaucoup plu, et m'avoir donné la chance de participer à autant de congrès. Je garderai également de formidables souvenirs de ces retraites d'équipe « sportives » que vous vous démenez à organiser chaque année et qui participent à faire de cette équipe une véritable famille.

J'exprime également ma profonde gratitude à ma co-directrice de thèse, le Dr. Irène Ceballos-Picot. Ce projet est le fruit d'un heureux hasard dont vous êtes l'origine et qui m'a amené à vous rencontrer ; je mesure pleinement la chance que j'ai eue. Je vous remercie de m'avoir poussée à débiter cette thèse, d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir donné les moyens de la mener à terme. Merci de m'avoir transmis toutes ces connaissances sur le métabolisme des purines et la maladie de Lesch-Nyhan, et m'avoir conseillée et guidée tout au long de cette thèse, avec votre constance bonne humeur, votre enthousiasme et votre ténacité. Vous avez toujours su être présente et à l'écoute, même de loin et dans ces conditions particulières de ma fin de thèse, et je vous en remercie sincèrement.

J'adresse mes plus vifs remerciements aux Drs. Sandrine Marie et Laurent Seugnet pour le suivi de ce projet et leur suggestions et conseils judicieux lors de mes comités de suivi de thèse. Je suis également très reconnaissante envers votre disponibilité et votre collaboration pour la réalisation des expériences d'UPLC et de sommeil, et pour avoir accepté d'être examinateurs de ces travaux. Mes remerciements s'adressent aussi aux Drs. Alice Kuster, Thomas Riemensperger et David Blum pour avoir accepté de donner de leur temps en tant que rapporteurs et examinateurs de cette thèse, et au Pr. Giovanni Stevanin pour s'être généreusement engagé à être président de ce jury malgré ses nombreuses occupations.

Je souhaite remercier chaleureusement mes trois formidables stagiaires, Rébecca Fima, Marion Strehaiano et Joana Dagorret, que j'ai eu le plaisir de co-encadrer durant leur stage de L1, M1 ou M2. Votre bonne humeur, votre dynamisme et votre implication dans mon projet m'ont particulièrement touchée, et j'espère vous avoir fait apprécier la drosophile à sa juste valeur.

Mes remerciements vont également à tous les membres, passés ou présents, de l'équipe GCRN, sur qui j'ai toujours pu compter :

Au Dr Baya Chérif-Zahar, merci pour tes encouragements, ta bienveillance et ton aide précieuse dans la réalisation d'une partie de mes travaux. Ta présence dans cette équipe nous est vraiment indispensable.

A mes anciens coéquipiers de thèse, les Drs Alexandra Vaccaro, Raouf Issa, Mathilde Lecompte et Jun Sun, merci pour votre bonne humeur, vos conseils scientifiques avisés, et tous ses beaux moments que nous avons pu partager, au sein du labo comme en dehors. Vous avez grandement participé à cette ambiance fraternelle et chaleureuse de l'équipe, ce qui me semble est primordial dans l'épanouissement professionnel. Je suis réellement heureuse de vous avoir rencontré et d'avoir pu bénéficier de vos compétences respectives. Merci aussi pour avoir pris soin de mes drosophiles en mon absence et pour votre soutien quotidien, même une fois partis du laboratoire.

A mes coéquipières actuelles de l'équipe, Amina Dulac, le Dr. Amélie Hu et Xiaojing Yue, vous avez su faire perdurer cette bonne entente dans l'équipe et je suis heureuse d'avoir pu partager votre quotidien durant une partie de ma thèse. Merci pour votre soutien, vos conseils judicieux et ces franches rigolades, et à bientôt pour partager des sushis ou une glace ! En attendant, je vous souhaite beaucoup de réussite pour la suite et fin de vos projets respectifs.

Aux Drs. André Klarsfeld et Zohra Rahmani, merci pour vos conseils et commentaires avisés lors du début et de la fin de ma thèse, respectivement.

Une pensée pour Kenza, Tristan, Eva, Julia, Anqi, Meriem et Liliana, que j'ai eu le plaisir de rencontrer lors de leur stage dans notre équipe, et Khadija pour les bons moments partagés lors de tes séjours au laboratoire.

Je tiens également à remercier les membres de la cuisine drosophile, sans qui l'avancement de nos projets serait bien plus fastidieux : Audrey Lombi, Alexandre Didelet et Honorine Lucchi, merci pour votre implication et votre aide précieuse.

Je souhaite remercier plus généralement les membres du laboratoire Plasticité du Cerveau, chercheurs, post-doctorants, étudiants, ITA et gestionnaires, avec qui j'ai eu le plaisir d'échanger tout au long de mon doctorat, et plus particulièrement son directeur, le Dr. Thomas Prémat, pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans les meilleures conditions.

J'adresse aussi mes remerciements aux membres du laboratoire Biochimie métabolomique et protéomique de l'Hôpital Necker, pour leur gentillesse lors de mes passages. En particulier, merci à Morgan Ledroit et Lionel Mockel pour m'avoir formée aux techniques de dosage enzymatique et d'HPLC, et pour avoir répondu présents à chaque fois que j'en ai eu besoin, et à Mireille Cammas pour m'avoir laissée utiliser son HPLC à ma convenance. J'exprime également ma gratitude à Patricia Moreau, cadre du service, pour m'avoir toujours facilitée les côtés administratifs et autres

problèmes techniques, et au Pr. Robert Barouki, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Mes sincères remerciements aux associations Lesch-Nyhan Action et Malaury pour avoir permis la réalisation de cette thèse grâce à leur financement de mon salaire sur 3 ans. Je sais combien il est difficile pour une association de lever des fonds, et je mesure la chance que j'ai eu d'être la première doctorante financée par vos actions. J'adresse toute mon affection aux parents et aux enfants que j'ai eu le plaisir de rencontrer durant les assemblées générales ou les courses caritatives pour la maladie, qui ont toujours été un beau moment de partage pour moi. Votre force et votre courage m'ont grandement touchée et je souhaite de tout cœur que ces travaux et les prochains aboutissent à une solution. Je remercie également le LabEx MemoLife pour m'avoir donné la possibilité de finir ma thèse en finançant une quatrième année.

Un merci particulier à Sophie, Marion, Nolwenn, Mélissa, Anthony, Cécile, Louise, Hélène, Maxime, Emmanuelle et Claire, pour leur amitié chère à mes yeux, leur écoute et soutien durant ces quatre années de thèse, et pour toujours être là pour moi malgré la distance.

J'adresse pour finir toute mon affection à mes parents, ma sœur et mon frère pour avoir toujours cru en moi, m'avoir donné la force de réaliser cette thèse et pour leur soutien inconditionnel. Merci également à la famille Laumont pour leur gentillesse, leur présence et leur affection à mon égard, et enfin, merci à Alexis, pour ton amour, ta patience et tes encouragements répétés qui m'ont permis de finir ce doctorat sous les meilleurs auspices.

Table des matières

Remerciements	ii
Table des matières	vi
Liste des abréviations	ix
Liste des figures	xii
Liste des tableaux	xiv
Chapitre I. Introduction générale	1
Préambule.....	3
A. Le système dopaminergique de mammifères	4
1. Historique de la découverte de la dopamine	4
2. Anatomie et fonction du système dopaminergique central.....	5
3. Développement des neurones dopaminergiques.....	9
4. Neurotransmission dopaminergique	10
4.1 Synthèse de la DA	11
4.2 Stockage de la DA	11
4.3 Libération et dégradation de la DA	12
5. Récepteurs dopaminergiques	13
6. Pathologies associées à un dysfonctionnement du système dopaminergique ...	15
B. Le système purinergique de l'Homme	18
1. Le métabolisme des purines et ses fonctions dans l'organisme	18
1.1 Synthèse, recyclage et catabolisme des purines	18
1.2 Fonctions du métabolisme des purines.....	22
1.3 Récepteurs et transporteurs membranaires associés au métabolisme des purines	23
2. Interactions entre les systèmes purinergique et dopaminergique	27
2.1 Interactions entre les récepteurs de l'adénosine et de la dopamine	27
2.2 Modulation du système dopaminergique par les récepteurs purinergiques ..	29
2.3 Purines et maladie de Parkinson	30
3. Maladies associées à des anomalies du métabolisme des purines	32
C. La maladie de Lesch-Nyhan	35
1. Découverte et généralités.....	35
2. Un déficit en HGPRT	36
2.1 Altérations du métabolisme des purines	36
2.2 Epidémiologie et génétique.....	38
3. Présentation clinique de la maladie	40
3.1 Forme classique	40
3.2 Formes variantes	42
4. Pathogenèse des troubles neurocomportementaux	44
4.1 Implication du système dopaminergique	44

4.2 Liens hypothétiques entre HGPRT et système dopaminergique	48
5. Traitements des troubles neurologiques	56
5.1 Pistes thérapeutiques ayant échouées.....	56
5.2 « Traitements » symptomatiques actuels	58
6. Modèles de la MLN.....	59
6.1 Modèles cellulaires	60
6.2 Modèles animaux	62
D. La drosophile comme modèle d'étude	68
1. Historique et généralités	68
2. Outils génétiques	70
2.1 Outils d'édition du génome	70
2.2 Le système UAS-Gal4	71
3. Le système nerveux central de drosophile.....	73
3.1 Organisation et composition	73
3.2 Modèle d'étude de maladies neurodégénératives et neurodéveloppementales	76
4. Le système dopaminergique de drosophile	77
4.1 Anatomie	77
4.2 Neurotransmission	78
4.3 Fonctions	80
5. Le métabolisme des purines chez la drosophile	85
5.1 Synthèse, recyclage et catabolisme des purines	85
5.2 Récepteurs et transporteurs associés au métabolisme des purines.....	88
5.3 Interactions entre systèmes purinergique et dopaminergique chez la drosophile	89
Objectifs de la thèse	91
Chapitre II. Matériels et Méthodes.....	93
1. Culture des drosophiles	95
2. Lignées génétiques utilisées	96
3. Construction de la lignée permettant la surexpression de l'Aprt	98
4. Construction des lignées transgéniques HPRT WT et I42T	99
5. Dosage des activités enzymatiques Aprt et HGPRT.....	101
6. Dissection des cerveaux et marquages immunohistochimiques	102
7. Extraction d'ARN et reverse transcription-PCR	104
8. Détection et quantification de l'adénosine	106
9. Mesure de la longévité	107
10. Détection et quantification des métabolites puriques	107
11. Dosage de l'ATP par bioluminescence.....	108
12. Mesure des capacités locomotrices (<i>SING test</i>).....	109
13. Test de locomotion larvaire.....	109
14. Mesure de l'activité locomotrice spontanée.....	110
15. Mesure et analyse du sommeil	111
16. Test de sensibilité au choc (<i>bang sensitivity</i>)	111

17. Quantification de la dopamine	112
18. Statistiques	113
Chapitre III. Résultats.....	115
Article 1.....	117
Article 2.....	161
Chapitre IV. Discussion et conclusion	219
Discussion	221
1. Rôle de l'Aprt dans l'homéostasie du système dopaminergique chez la drosophile.....	221
1.1 L'expression de l'Aprt et la synthèse de DA sont inversement corrélées chez la drosophile	221
1.2 La régulation du système dopaminergique par l'Aprt est potentiellement médiée par le récepteur de l'adénosine AdoR.....	224
2. Influences de la signalisation dopaminergique et adénosinergique sur l'expression et l'activité de l'Aprt.....	227
3. Conséquences d'une déficience en Aprt sur le plan métabolique et neurocomportemental	230
3.1 Rôle de l'Aprt dans la longévité des drosophiles	230
3.2 Rôle de l'Aprt dans la régulation des taux d'acide urique.....	232
3.3 Rôle de l'Aprt dans la régulation du comportement locomoteur induit par un choc mécanique.....	233
3.4 Rôle de l'Aprt dans la régulation du cycle veille/sommeil	235
3.5 Rôle de l'Aprt et des purines dans la régulation du comportement épileptique	237
4. L'expression neuronale d'une forme pathogène de l'HGPRT humaine entraîne des déficits moteurs et dopaminergiques.....	241
5. Le recyclage des purines chez la drosophile.....	242
Conclusions générales.....	245
Chapitre V. Références bibliographiques	247
Annexes	293
1. Communications orales	295
2. Communications affichées (poster).....	296
3. Formations doctorales	297
4. Liste de publications annexes en tant que co-auteure.....	298

Liste des abréviations

2,8-DHA	2,8-dihydroxyadénine
5-HIAA	Acide 5-hydroxyindoleacétique
5-HT	5-hydroxytryptamine (sérotonine)
5-HTP	5-hydroxytryptophane
5'-Nu	5'-Nucléotidase
6-OHDA	6-hydroxydopamine
aaNAT	Aralkylamine N-acétyltransférase
AC	Adénylate cyclase
ADA	Adénosine désaminase
ADK	Adénosine kinase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ado	Adénosine
ADP	Adénosine diphosphate
ADSL	Adénylosuccinate lyase
ADSS	Adénylosuccinate synthétase
AICAR	Aminoimidazole carboxamide ribonucléotide
AMP	Adénosine monophosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AMPD	Adénosine monophosphate désaminase
APRT	Adénine phosphoribosyltransférase
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNi	ARN interférent
ATIC	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase
ATP	Adénosine triphosphate
ATV	Aire tegmentale ventrale

CNT	<i>Concentrative nucleoside transporter</i>
DA	Dopamine
DAergique	Dopaminergique
DAT	Transporteur de dopamine
DDC	DOPA décarboxylase
EAAT1	<i>Excitatory amino acid transporter 1</i>
ENT	<i>Equilibrative nucleoside transporter</i>
FAICAR	Formamidoimidazole carboxamide ribonucléotide
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GDA	Guanine désaminase
GDP	Guanosine diphosphate
GMP	Guanosine monophosphate
GMPS	Guanosine monophosphate synthase
GPi	Globus pallidus interne
GPe	Globus pallidus externe
GTP	Guanosine tri-phosphate
HGPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase
HVA	Acide homovanillique
IMP	Inosine monophosphate
IMPD	Inosine monophosphate déshydrogénase
KO	Knock-out
L-DOPA	Levodopa
LCR	Liquide céphalo-rachidien
MAO	Monoamine oxydase
MLN	Maladie de Lesch-Nyhan
MPTP	Méthylphényltétrahydropyridine
NADA	N-acétyl dopamine
nDA	Neurones dopaminergiques
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
PNP	Purine nucléoside phosphorylase

PRA	Phosphoribosylamine
PRAT	Phosphoribosylamidotransférase
PRPP	Phosphoribosylpyrophosphate
PRPPS	Phosphoribosylpyrophosphate synthétase
rDA	Récepteur dopaminergique
SAICAR	Succinylaminoimidazole carboxamide riboside
SAM	S-adénosylméthionine
S-AMP	Succinyl-Adénosine monophosphate
SING	<i>Startle-induced negative geotaxis</i>
SN	Substance noire
SNpc	Substance noire <i>pars compacta</i>
SNpr	Substance noire <i>pars reticulata</i>
SNC	Système nerveux central
TH	Tyrosine hydroxylase
UAS	<i>Upstream activating sequence</i>
UDP	Uridine diphosphate
UTP	Uridine triphosphate
VMAT2	Transporteur vésiculaire de monoamine 2
XO	Xanthine oxydase
XMP	Xanthosine monophosphate

Liste des figures

Figure 1 : Distribution des neurones dopaminergiques dans le cerveau adulte de rat....	6
Figure 2 : Distribution des 4 voies dopaminergiques dans le cerveau humain.....	7
Figure 3 : Ganglions de la base et circuits associés	8
Figure 4 : Vue d'ensemble du système de neurotransmission dopaminergique de mammifères.....	10
Figure 5 : Signalisation des récepteurs dopaminergiques.....	14
Figure 6 : Métabolisme des purines de l'Homme	19
Figure 7 : Récepteurs purinergiques	24
Figure 8 : Représentation schématique d'un hétéromère A_2A-D_2	28
Figure 9 : Modulation de la libération de glutamate et de DA par l'adénosine dans le noyau accumbens	29
Figure 10 : Déficit en HGPRT et maladie de Lesch-Nyhan	37
Figure 11 : Localisation des mutations sur le gène <i>HPRT1</i> dans une cohorte française de patients LN.....	40
Figure 12 : Association génotype-phénotype et formes variantes de la MLN.....	43
Figure 13 : Age au diagnostic et types de mutations retrouvées en fonction de la sévérité clinique des symptômes	44
Figure 14 : Tomographie par émission de positons (TEP) sur des cerveaux de patients LN, révélant un dysfonctionnement dopaminergique	47
Figure 15 : Voie de synthèse du BH4 potentiellement perturbée et mise en cause dans la pathogenèse de la MLN	52
Figure 16 : Hypothèse d'une déplétion en adénosine dans la pathogenèse de la MLN	55
Figure 17 : Modèle de chimères souris/rats KO pour l'HGPRT	64
Figure 18 : Chronologie des étapes importantes de la recherche sur la MLN	67
Figure 19 : Le cycle de développement de la drosophile	69
Figure 20 : Analogie entre organes de <i>Drosophila melanogaster</i> et de l'Homme.....	70
Figure 21 : Le système d'expression ciblée UAS-Gal4	72
Figure 22 : Organisation anatomique du système nerveux central de drosophile	73

Figure 23 : Morphologie et organisation des neurones et cellules gliales de drosophile	75
Figure 24 : Organisation anatomique des neurones dopaminergiques dans le cerveau adulte de drosophile.....	78
Figure 25 : Vue d'ensemble du système de neurotransmission dopaminergique de drosophile	79
Figure 26 : Métabolisme des purines chez <i>Drosophila melanogaster</i>	88
Figure 27 : Modèle proposé d'inhibition des neurones dopaminergiques via le récepteur AdoR.....	90
Figure 28 : Niveaux d'expression de l'Aprt dans différents tissus de la drosophile	224

Liste des tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des localisations, mécanismes, fonctions et agonistes/antagonistes sélectifs des différents récepteurs dopaminergiques	15
Tableau 2 : Acteurs dopaminergiques et leurs implications dans des pathologies humaines	17
Tableau 3 : Résumé de la prise en charge et des traitements symptomatiques ou dispositifs mis en place à ce jour pour améliorer les conditions de vie des patients atteints de la MLN	59
Tableau 4 : Récapitulatif des conséquences d'altérations de la signalisation dopaminergique sur l'activité locomotrice spontanée, le sommeil et la réactivité locomotrice	84
Tableau 5 : Liste des lignées de drosophiles utilisées	97
Tableau 6 : Séquences d'oligonucléotides utilisées pour le clonage de l'UAS-Aprt de drosophile	99
Tableau 7 : Séquences d'oligonucléotides utilisées pour le clonage de l'HPRT humaine native et mutée taggées	100
Tableau 8 : Séquences d'oligonucléotides utilisées pour le clonage de l'HPRT humaine native et mutée	101
Tableau 9 : Liste des oligonucléotides utilisés pour les RT-PCR et RT-qPCR	106

Chapitre I. Introduction générale

Préambule

La maladie de Lesch-Nyhan (MLN) est une maladie génétique métabolique très rare (prévalence de 1/235 000 naissances) affectant presque exclusivement les garçons dès leur plus jeune âge. Ce syndrome est dû à des mutations récessives du gène *HPRT1* sur le chromosome X, codant pour une enzyme de la voie de recyclage des purines, l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HGPRT). Le déficit de cette enzyme entraîne un retard du développement de l'enfant avec une hypotonie généralisée. Les patients souffrent d'un handicap moteur important avec des mouvements anormaux (dystonie) ainsi que des troubles du comportement sous forme d'auto-agressivité et d'automutilation compulsive. Après sa découverte dans les années 60, de nombreuses études ont été menées à travers le monde afin de mieux caractériser cette maladie et trouver de potentielles solutions thérapeutiques. Malheureusement à ce jour, les causes exactes des symptômes neurologiques et comportementaux associés à ce déficit en *HPRT* restent incomprises. La plupart des hypothèses avancées montrent une implication des voies dopaminergiques des ganglions de la base qui se développeraient de façon incomplète ou dégénèreraient précocément. Pour autant, tous les traitements, associés ou non à la dopamine, sont pour l'instant restés sans grand effet. De plus, les modèles cellulaires de la MLN utilisés ont montré leurs limites pour faire avancer nos connaissances, et les modèles animaux développés, tous murins, n'ont également pas permis de reproduire toutes les composantes de cette complexe maladie. L'un des enjeux majeurs à ce jour est donc de développer de nouveaux outils et de nouveaux modèles, dans le but de faire progresser notre compréhension des causes exactes des troubles neurocomportementaux de la MLN. **C'est dans ce cadre que s'inscrit mon projet de thèse, qui se propose d'étudier les mécanismes pathogéniques de la MLN en lien avec le système dopaminergique en utilisant les avantages de l'organisme modèle *Drosophila melanogaster*.**

Introduction

L'introduction de cette thèse traitera tout d'abord de l'état de l'art du système dopaminergique puis purinergique des mammifères, et se concentrera ensuite sur la maladie de Lesch-Nyhan chez l'Homme, ainsi que les modèles de cette pathologie utilisés à ce jour. Enfin, la dernière partie présentera le modèle drosophile et les connaissances actuelles des systèmes dopaminergiques et purinergiques chez cet organisme.

A. Le système dopaminergique de mammifères

1. Historique de la découverte de la dopamine

L'historique qui suit de la découverte de la dopamine (DA) et de ses fonctions physiologiques est principalement tiré des récits du biochimiste autrichien Oleh Hornykiewicz (Hornykiewicz, 1986 et Hornykiewicz, 2002b).

La DA fut synthétisée pour la première fois en 1910 par deux chercheurs anglais, George Barger et James Ewens. Au même moment, Henry Dale, neuroscientifique britannique, démontra une activité biologique de cette molécule, la classant comme une substance mimant l'adrénaline. Ce fut également ce même chercheur qui proposa en 1952 de donner le nom de dopamine à ce composé chimique jusqu'alors nommé 3,4-dihydroxyphényléthylamine ou 3-hydroxytyramine. Il aura fallu attendre presque 30 ans après sa découverte pour que de nouvelles connaissances apparaissent. En 1938, le pharmacologiste allemand Peter Holtz mis en évidence l'enzyme DOPA décarboxylase (DDC, aussi appelée acide L-aminé aromatique décarboxylase - AADC) dans un tissu rénal de mammifères et montra qu'elle induit la production de DA à partir de Levodopa (L-DOPA ou L-3,4-di-hydroxyphénylalanine). Cette découverte cruciale permit un an plus tard à Hermann Blaschko, biochimiste allemand, de proposer le premier rôle physiologique de la DA dans la voie de biosynthèse des catécholamines, en tant qu'intermédiaire dans la formation de la noradrénaline et de l'adrénaline.

De nouvelles découvertes dans les années 50 montrant la présence de petites quantités de DA dans des tissus périphériques, notamment le cœur et la glande médullo-surrénale, donnèrent à Blaschko l'idée que celle-ci pourrait avoir un rôle plus important que celui seul d'intermédiaire métabolique. C'est alors que ce dernier proposa au Dr. Hornykiewicz de collaborer pour étudier la possibilité que la DA ait son propre rôle physiologique dans le corps. Ils se basèrent notamment sur une étude de Peter Holtz de 1942 où celui-ci trouva chez le lapin et le cochon d'inde que la DA avait un effet opposé à celui de l'adrénaline sur la pression artérielle, suggérant des rôles différents de ces deux catécholamines. Bien que Holtz rejetât cette possibilité, les travaux d'Hornykiewicz démontrèrent que la DA pouvait avoir ses propres fonctions, indépendamment de l'adrénaline et de la noradrénaline. Tout s'accéléra alors : en 1957, Kathleen Montagu, puis un an plus tard Arvid Carlsson, observèrent la présence de DA dans le cerveau de mammifères. En 1959, Bertler et Rosengren en Suède et Sano au Japon publièrent simultanément leurs travaux montrant la présence de DA dans le striatum de cerveaux canins et humains, région où la noradrénaline est presque totalement absente. Ils en conclurent alors que la DA aurait un rôle important dans la fonction du striatum, constituant majeur des ganglions de la base et centre du contrôle moteur extrapyramidal.

De nombreuses études durant le demi-siècle suivant ont permis d'approfondir nos connaissances du système dopaminergique (DAergique) de mammifères, notamment sa distribution dans le cerveau, ses voies de synthèse et de dégradation, ses récepteurs, ses rôles neurophysiologiques et son implication dans des pathologies humaines. Celles-ci seront exposées ci-après.

2. Anatomie et fonction du système dopaminergique central

Les neurones dopaminergiques (nDA) représentent environ 1% de la population totale de neurones dans le cerveau. Ils sont localisés dans 9 groupes cellulaires distincts distribués dans le diencéphale, le mésencéphale, le bulbe olfactif et la rétine (Figure 1).

Introduction

Environ 75% des nDA (400 000 à 600 000 chez l'Homme) proviennent du mésencéphale ventral et donnent naissance à trois aires distinctes nommées A8 (aire rétro-rubrale), A9 (substance noire, SN) et A10 (aire tegmentale ventrale, ATV) (Hegarty *et al.*, 2013).

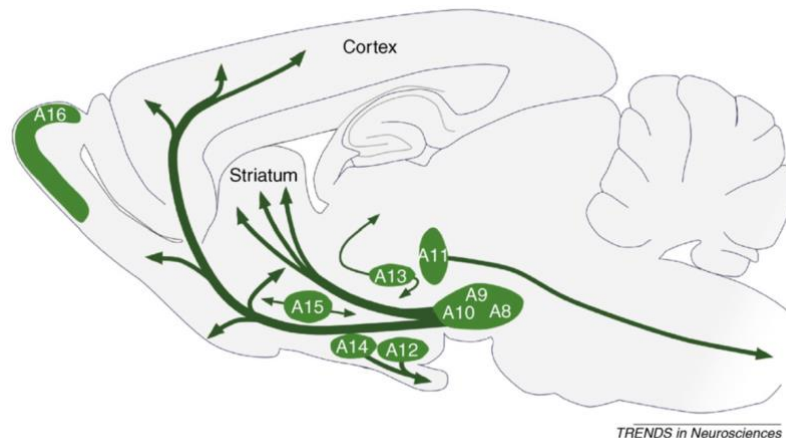


Figure 1 : Distribution des neurones dopaminergiques dans le cerveau adulte de rat

Les nDA du cerveau adulte de mammifères sont localisés dans 9 aires distinctes (A8 à A16), allant du mésencéphale au bulbe olfactif. Les flèches représentent les principales projections DAergiques. (Björklund & Dunnett, 2007).

Les neurones de ces trois aires envoient leurs projections axonales par trois voies bien distinctes, impliquées chacune dans des fonctions différentes (Klein *et al.*, 2019) (Figure 2) :

- la voie méso-corticale, connue pour influencer l'attention, l'apprentissage et la mémorisation, correspond à la projection des nDA de l'ATV (A10) vers le cortex préfrontal.

- la voie méso-limbique, impliquée dans la motivation, les émotions et le système de récompense, correspond à la projection des nDA de l'ATV (A10) vers le noyau accumbens, l'amygdale, le septum et le cortex pyriforme.

- la voie nigro-striatale, impliquée dans le contrôle moteur volontaire, correspond à la projection des nDA de la SN *pars compacta* (SNpc) (A9) vers le striatum.

Une quatrième voie participant au contrôle hormonal et nommée voie tubéro-infundibulaire est formée par la projection des nDA depuis l'hypothalamus vers l'hypophyse.

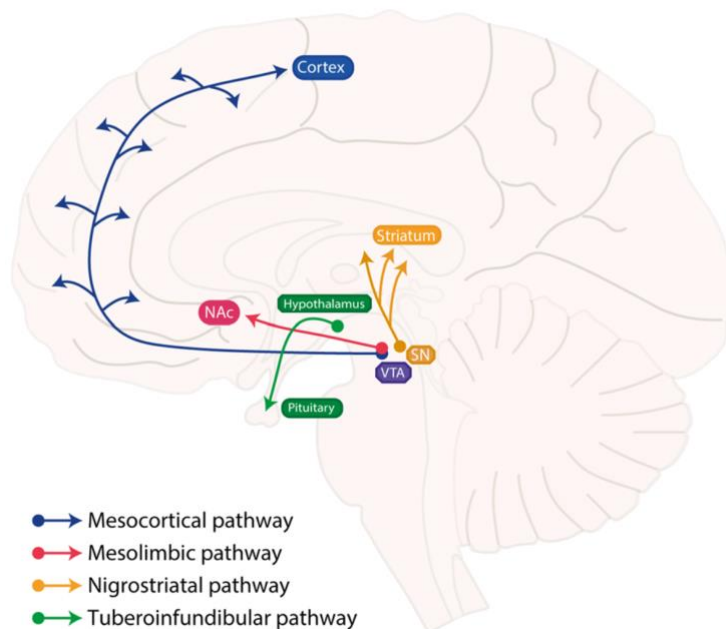


Figure 2 : Distribution des 4 voies dopaminergiques dans le cerveau humain

Les nDA projettent leurs axones depuis l'aire tegmentale ventrale (VTA) vers le cortex via la voie méso-corticale (en bleu) et vers le noyau accumbens (NAc) via la voie méso-limbique (en rouge). La voie nigro-striatale (en jaune) correspond à la projection des nDA depuis la substance noire (SN) vers le striatum. La projection des nDA depuis l'hypothalamus vers l'hypophyse forme la voie tubéro-infundibulaire (en vert) (Klein *et al.*, 2019).

La voie nigro-striatale a été longuement étudiée étant donné son implication dans une des maladies neurodégénératives les plus fréquentes dans le monde, la maladie de Parkinson (MP). Cette voie implique une structure sous-corticale nommée ganglion de la base (ou noyaux gris centraux). Cette structure est composée de plusieurs aires : le striatum subdivisé en 2 régions, le noyau caudé et le putamen, le globus pallidus interne et externe (GPi et GPe), le noyau sous-thalamique, et la substance noire ou *locus niger*, divisée en 2 sous-parties, la *pars compacta* (SNpc) et la *pars reticulata* (SNpr) (Balint *et al.*, 2018) (Figure 3a).

Introduction

Les ganglions de la base forment des boucles communiquant vers le thalamus et le cortex, la plus connue étant celle permettant de contrôler le mouvement (Figure 3b). La communication cortico-striatale se fait par deux voies principales prenant naissance dans le striatum : la voie directe et la voie indirecte. La stimulation de la voie directe inhibe les neurones GABAergiques (acide gamma-aminobutyrique) du GPi et de la SNpr, qui lèvent alors leur inhibition des neurones glutamatergiques du thalamus et facilite ainsi le mouvement. La voie indirecte implique deux structures relais, le GPe et le noyau sous-thalamique. La stimulation de cette voie induit à l'inverse une excitation des neurones GABAergiques du GPi et de la SNpr, ce qui inhibe les neurones glutamatergiques du thalamus, réduisant ainsi l'activité motrice. Les neurones GABAergiques striataux émettant vers le GPi expriment des récepteurs DAergiques de type D₁ alors que ceux projetant vers le GPe possèdent des récepteurs DAergiques de type D₂. En ciblant ces différents récepteurs, la DA peut stimuler la voie directe par ces récepteurs D₁ excitateurs et simultanément inhiber la voie indirecte par l'activation des récepteurs D₂ inhibiteurs.

En parallèle existe la voie hyperdirecte : le noyau sous-thalamique, région excitatrice glutamatergique, reçoit directement des projections excitatrices du cortex, contournant ainsi le striatum.

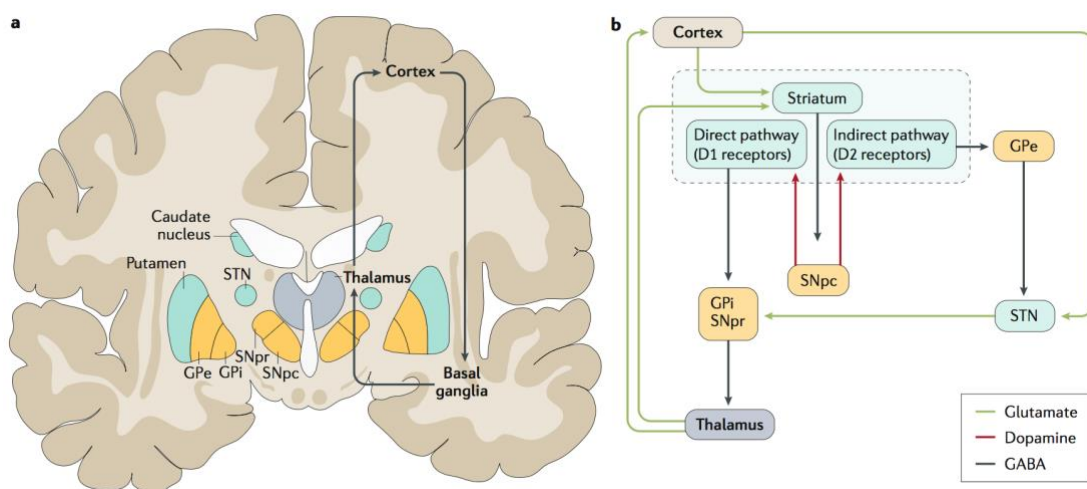


Figure 3 : Ganglions de la base et circuits associés

(a) Représentation anatomique des ganglions de la base en coupe coronale d'un cerveau humain. (b) Voies de communications des ganglions de la base. La communication cortico-striatale induite par le GPi et la SNpr se fait par deux voies principales, la voie directe et la voie indirecte. La voie directe implique les neurones du GPi-SNpr-thalamus et la voie indirecte implique en plus deux structures relais, le GPe et le STN. La voie hyperdirecte forme la connexion du cortex vers le STN-GPi-SNpr, contournant le striatum. GABA : γ -aminobutyric acid ; GPe : globus pallidus externe ; GPi : globus pallidus interne ; SNpr : substance noire *pars reticulata* ; SNpc : substance noire *pars compacta* ; STN : noyau sous-thalamique (Balint *et al.*, 2018).

Bien que les nDA de la SN (A9) représentent seulement 3 à 5 % de la population neuronale totale de cette région, ils jouent un rôle important dans de nombreuses fonctions neurophysiologiques, comme le contrôle volontaire des mouvements mais aussi l'humeur, l'addiction, le stress ou encore la motivation (Chinta *et al.*, 2005). Ces neurones, qui dégénèrent progressivement dans la MP, sont particulièrement vulnérables à la mort cellulaire en comparaison aux autres populations de nDA du mésencéphale (A8 et A10) (Alavian *et al.*, 2008). Les différences anatomiques, fonctionnelles et d'apparentes sensibilité de ces 3 populations résultent vraisemblablement de différences acquises au cours du développement. Cependant, les mécanismes moléculaires exacts régulant cette différenciation restent encore partiellement obscures et les études se sont principalement concentrées sur les nDA de la SN dans l'espoir de développer une approche de thérapie cellulaire pour la MP.

3. Développement des neurones dopaminergiques

Le développement des nDA du mésencéphale suit une série d'étapes régulées par divers facteurs déterminant leur migration, leur localisation, leur spécification et leur connectivité (Ono *et al.*, 2007 ; Hegarty *et al.*, 2013 ; Bissonette & Roesch, 2016). Ils proviennent de cellules neurales progénitrices localisées dans la ligne ventrale de la plaque de plancher du tube neural. Les premières cellules progénitrices DAergiques sont différenciées par la sécrétion de trois protéines de signalisation, Shh (Sonic hedgehog), Fgf8 (Fibroblast growth factor 8) et Wnt1. Ces cellules migrent alors ventralement puis latéralement vers les aires qui deviendront l'ATV et la SN. Plusieurs

Introduction

facteurs de transcription sont ensuite sélectivement exprimés et régulent la différenciation des nDA, notamment Nurr1 (Nuclear receptor related-1), Lmx1b (LIM homeobox), Pitx3, Msx1, Otx2, NGN2 (Neurogenin 2) et En1/En2 (Engrailed). Enfin, l'expression des protéines impliquées dans la biosynthèse de dopamine et dans la neurotransmission DAergique, notamment la TH (tyrosine hydroxylase), DDC/AADC, DAT (transporteur de la dopamine) et VMAT2 (transporteur vésiculaire des monoamines), permet la différenciation de ces cellules en nDA matures.

4. Neurotransmission dopaminergique

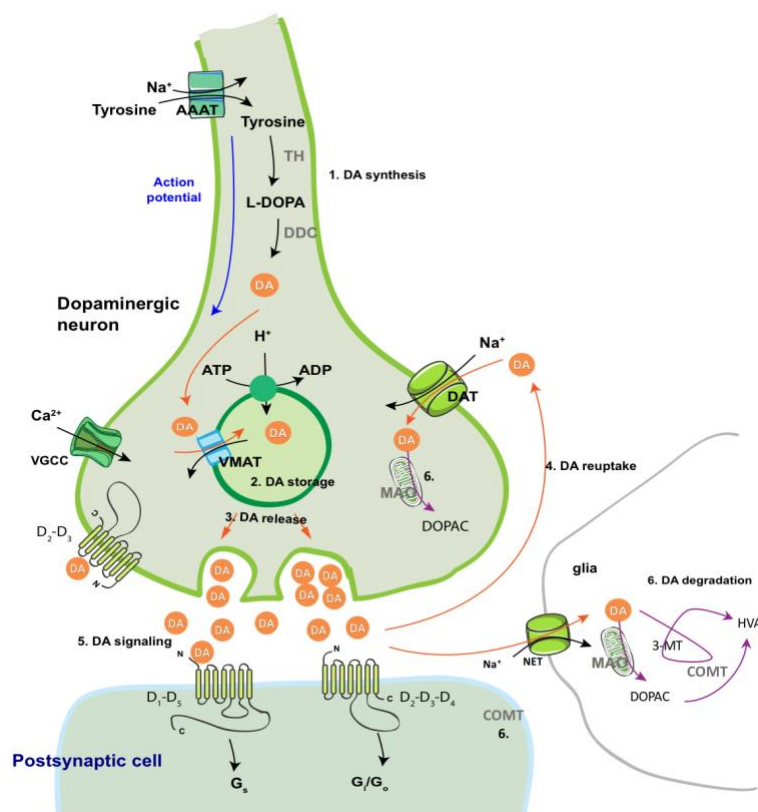


Figure 4 : Vue d'ensemble du système de neurotransmission dopaminergique de mammifères

La neurotransmission DAergique des mammifères comprend : 1) la synthèse de DA : La L-tyrosine est transportée dans les nDA et convertit en L-DOPA par la TH, puis en DA par la DDC. 2) le stockage de DA : la DA cytosolique est internalisée dans des vésicules synaptiques via le transporteur VMAT, grâce à une pompe H⁺/ATPase générant un flux de protons. 3) la libération de DA : en réponse à un potentiel d'action et une entrée de Ca²⁺, la DA est libérée dans la fente synaptique. 4) recapture de la DA : la DA est recapturée dans le neurone présynaptique par le transporteur DAT et recyclée dans les vésicules ou éliminée. 5) signalisation DA : la DA se lie à ses récepteurs postsynaptiques (D₁ à D₅) ou à ses autorécepteurs (D₂-D₃) en position présynaptique. 6) dégradation de la DA : la DA est dégradée par la

MAO ou la COMT en HVA qui est alors excrétée dans l'urine. 3-MT : 3-méthoxytyramine ; AAAT : transporteur d'acide aminé aromatique ; COMT : catéchol-O-méthyltransférase ; DA : dopamine ; DAT : transporteur de dopamine ; DDC : dopa décarboxylase ; DOPAC : acide 3,4-dihydroxyphénylacétique ; HVA : acide homovanillique ; MAO : monoamine oxydase ; NET : transporteur de norépinéphrine ; TH : tyrosine hydroxylase ; VMAT : transporteur vésiculaire des monoamines ; VGCC : canaux calciques voltage-dépendants.

4.1 Synthèse de la DA

La DA est l'un des neurotransmetteurs les plus étudiés dans le cerveau, en raison de son implication dans de nombreux troubles neurologiques et psychiatriques. Son système de neurotransmission est donc bien décrit (Figure 4). La DA est une monoamine synthétisée à partir de l'acide aminé L-tyrosine, qui peut provenir du bol alimentaire ou être synthétisée de façon endogène par le foie à partir de la L-phénylalanine par la phénylalanine hydroxylase. Elle est alors transportée activement dans le cerveau pour être utilisée par les nDA (Fernstrom & Fernstrom, 2007). La tyrosine hydroxylase (TH), enzyme limitante de la voie de synthèse de DA, convertit la tyrosine en L-DOPA en utilisant la tétrahydrobioptérine (BH4) comme cofacteur de la réaction (Nagatsu *et al.*, 1964). La L-DOPA est ensuite transformée en DA par la DDC, utilisant le phosphate de pyridoxal (PLP) comme cofacteur. A noter que cette dernière enzyme permet également de convertir le 5-hydroxytryptophane en sérotonine (Christenson *et al.*, 1972).

En périphérie, la DA est aussi synthétisée à partir de tyrosine par une autre enzyme, la tyrosinase, exprimée dans les mélanocytes et permettant la biosynthèse de mélanine.

4.2 Stockage de la DA

Une fois synthétisée dans les nDA, la DA est rapidement internalisée dans des vésicules synaptiques via le transporteur vésiculaire des monoamines 2 (VMAT2) jusqu'à sa libération par exocytose dans la fente synaptique. Cette internalisation dans l'environnement acide des vésicules est importante pour la stabilisation de la DA afin

d'éviter son oxydation qui serait toxique pour les neurones (Guillot & Miller, 2009). Une ATPase à protons vacuolaire (V-ATPase) utilisant l'énergie libérée par l'hydrolyse d'ATP génère une entrée de protons dans le lumen de la vésicule. Le transporteur VMAT2 utilise ce gradient de pH pour faire sortir 2 protons et simultanément faire entrer la DA (Figure 4). Une seule vésicule a une capacité de stockage supposée de plus de 20 000 molécules (Chaudhry *et al.*, 2008).

4.3 Libération et dégradation de la DA

La libération de DA depuis les axones mais aussi les dendrites des nDA striataux est régulée par des canaux calciques voltage-dépendants (Cheramy *et al.*, 1981, Phillips & Stamford, 2000, Sulzer *et al.*, 2016). La DA est donc libérée en réponse à un potentiel d'action et une entrée de Ca^{2+} dans le neurone. Une fois dans la fente synaptique, elle peut activer différents types de récepteurs DAergiques qui seront décrits dans la sous-section suivante.

La DA est enfin recyclée ou dégradée. Sa recapture au sein des neurones présynaptiques pour une future utilisation est effectuée par le transporteur de dopamine (DAT) (Nirenberg *et al.*, 1997 ; Uhl, 2003). Deux enzymes principales sont impliquées dans sa dégradation, la monoamine oxydase (MAO) et la catéchol-O-méthyltransférase (COMT), présentes dans les neurones pré et postsynaptiques, respectivement (Eisenhofer *et al.*, 2004). La MAO, située sur la membrane externe des mitochondries, convertit la DA en 3,4-dihydroxyphénylacétaldéhyde (DOPAL) qui est aussitôt transformé en acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (DOPAC) par l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH). Quant à la COMT, elle peut dégrader le DOPAC en acide homovanillique (HVA) mais aussi directement la DA en 3-méthoxytyramine, qui sera ensuite convertie en HVA puis excrétée dans les urines. De plus, la présence astrocytaire de ces deux enzymes suggère que la recapture de la DA au niveau glial joue un rôle important dans la régulation de la concentration extracellulaire de cette monoamine (Takeda *et al.*, 2002 ; Jennings & Rusakov, 2016). Bien que le transporteur

DAergique DAT soit présent également à la membrane des astrocytes, il semblerait que la recapture de la DA à ce niveau s'effectue via un autre transporteur de monoamine, le transporteur de norépinephrine (= noradrénaline) NET (Takeda *et al.*, 2002). En effet, ces catécholamines sont des molécules très proches, et la DA peut aussi être convertie en noradrénaline, puis en adrénaline par la dopamine β -hydroxylase et la phénylétholamine N-méthyltransférase, respectivement, dans les neurones noradrénergiques et adrénérgiques.

5. Récepteurs dopaminergiques

Les récepteurs dopaminergiques (rDA) appartiennent à la famille de récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) (Figure 5). On distingue 5 sous-types de rDA chez les Vertébrés, divisés en 2 grandes familles selon leurs structures et leurs propriétés pharmacologiques (Missale *et al.*, 1998) :

- les récepteurs de type D₁ incluant les récepteurs D₁ et D₅, ont une structure caractérisée par une troisième boucle cytoplasmique courte et une longue queue C-terminale. Ils stimulent la production d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) par l'activation des sous-unités G_{s/olf} des protéines G, à la membrane postsynaptique.

- les récepteurs de type D₂ incluant les récepteurs D₂, D₃ et D₄, ont quant à eux une troisième boucle cytoplasmique longue et une courte queue C-terminale. Ils inhibent la production d'AMPc par l'activation des sous-unités G_i et G_o des protéines G, à la membrane postsynaptique. A noter que les récepteurs D₂ et D₃ peuvent aussi être présents au niveau des terminaisons nerveuses présynaptiques et sont alors qualifiés d'autorécepteurs (Beaulieu & Gainetdinov, 2011).

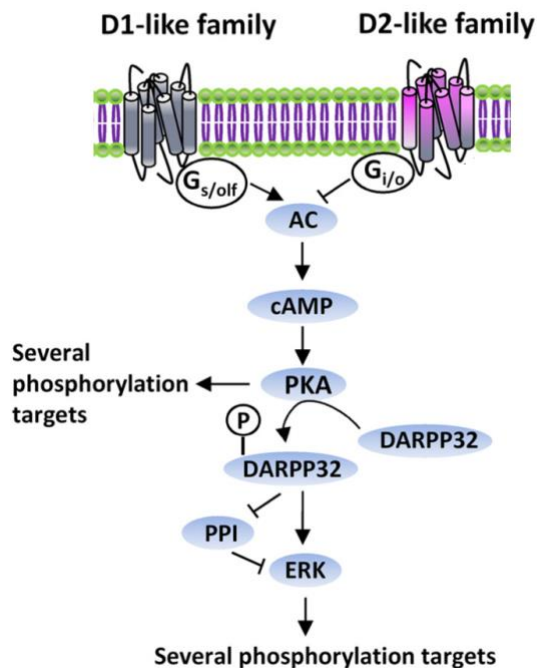


Figure 5 : Signalisation des récepteurs dopaminergiques

Les rDA de type D₁ ont un rôle excitateur en activant l'adénylate cyclase (AC) et donc la production d'AMPc via leur couplage avec les sous-unités G_{s/olf} des protéines G. Les récepteurs de type D₂ ont un rôle inhibiteur en inhibant l'AC et donc la production d'AMPc via leur couplage avec les sous-unités G_{i/o} des protéines G. La cascade de signalisation implique ensuite la protéine kinase A (PKA) pouvant phosphoryler différentes cibles (Adapté de Ledonne & Mercuri, 2017).

Les rDA sont fortement exprimés dans le système nerveux central (SNC) mais on les retrouve également en périphérie comme dans les vaisseaux sanguins, le cœur, les reins et les glandes surrénales, ou encore la rétine (Klein *et al.*, 2019). Au sein du SNC, les récepteurs D₁ et D₂ sont ceux que l'on retrouve le plus abondamment, les récepteurs D₃, D₄ et D₅ sont présents en plus faible quantité (Ayano *et al.*, 2016). Les rDA de type D₁ sont principalement exprimés dans le striatum, le noyau accumbens, la SN, le bulbe olfactif, l'amygdale et le cortex frontal. Ceux de type D₂ sont présents en majorité dans le striatum, le globus pallidus externe, le core du noyau accumbens, l'aire tegmentale ventrale, l'hypothalamus, l'amygdale, les aires corticales, l'hypocampe et l'hypophyse (Mishra *et al.*, 2018 ; Klein *et al.*, 2019). Au niveau cellulaire, il est admis que les rDA ne sont pas seulement exprimés à la surface des neurones mais aussi au sein des astrocytes (Miyazaki *et al.*, 2004 ; Kuric *et al.*, 2013).

Tableau 1 : Récapitulatif des localisations, mécanismes, fonctions et agonistes/antagonistes sélectifs des différents récepteurs dopaminergiques (Mishra *et al.*, 2018)

RECEPTORS	D1	D5	D2	D3	D4
Location	Striatum, nucleus accumbens, Olfactory bulb, amygdala hippocampus, substantia nigra Hypothalamus, frontal cortex	Cortex, substantia nigra, hypothalamus	Striatum, VTA Olfactory bulb, cerebral cortex	Striatum, islands of Calleja, cortex	Frontal cortex, amygdala, hypothalamus, nucleus accumbens
Type	Gs-coupled	Gs-coupled	Gi-coupled	Gi-coupled	Gi-coupled
Mechanism	Increased intracellular level of cAMP by activated adenylyl cyclase	Adenylyl cyclase \uparrow	Increased intracellular level of cAMP by activate adenylyl cyclase	Adenylyl cyclase \downarrow	Adenylyl cyclase \downarrow
Function	Locomotion, learning and memory, attention, impulse control, sleep, regulation of renal function	Cognition, attention, decision making, motor learning, renin secretion	Locomotion, learning and memory, attention, sleep, reproductive behaviour	Locomotion, cognition, attention, impulse control, sleep, regulation of food intake	Cognition, impulse control, attention, sleep, reproductive behavior
Selective agonist	SKF-38393 SKF-81297 Fenoldopam (SKF-82526)	—	Bromocriptine Pergolide Cabergoline Ropinirole	7-OH-DPAT Pramipexole Rotigotine PD-128907	A-412997 ABT-670 PD-168077
Selective antagonist	SCH-23390 SCH-39166 SKF-83566	—	Haloperidol Raclopride Sulpiride Spiperone Risperidone	Nafadotride GR-103691 GR-218231 SB-277011A NGB-2904 PG-01037 ABT-127	A-381393 FAUC213 L-745870 L-750667

6. Pathologies associées à un dysfonctionnement du système dopaminergique

La DA est très largement connue pour son implication dans la MP, dans laquelle la dégénérescence des nDA de la SN entraîne des symptômes moteurs tels qu'une bradykinésie, un tremblement de repos et une rigidité musculaire (Sulzer, 2007 ; Lees *et al.*, 2009 ; Surmeier, 2018). C'est le Dr. Hornykiewicz en 1960 qui montra que la DA était dramatiquement réduite dans le striatum de cerveaux parkinsoniens post-mortem. Cette monoamine ne pouvant traverser la barrière hématoencéphalique, l'idée lui vint d'un apport de son précurseur, la L-DOPA, ce qui fut testé cliniquement par administration orale au même moment par le Dr Barbeau au Canada (Barbeau, 1962 ; Hornykiewicz, 1986). La L-DOPA fut considérée par la suite comme un traitement sûr et efficace contre la MP (Carlsson, 2002 ; Hornykiewicz, 2002a), avant de découvrir que son usage chronique entraînait de très sérieux effets secondaires comme des dyskinésies, des symptômes gastro-intestinaux, des insomnies voire des

Introduction

hallucinations et évènements psychotiques (Foster & Hoffer, 2004 ; Fahn, 2008 ; Nagatsu & Sawada, 2009).

La DA est impliquée dans d'autres troubles moteurs tels que la dystonie dopa-sensible, liée par exemple à un dysfonctionnement d'enzymes de la synthèse de DA (Balint *et al.*, 2018), le trouble du déficit de l'attention/hyperactivité associé en partie à une hypofonction DAergique impliquant le transporteurs DAT et les récepteurs D₄ et D₅ (Faraone *et al.*, 2005 ; Genro *et al.*, 2010) ou encore plus indirectement la maladie de Huntington (Jakel & Maragos, 2000 ; Cyr *et al.*, 2006).

Une diminution de la neurotransmission DAergique est connue pour entraîner des troubles dépressifs, alors qu'une augmentation provoquerait les phases maniaques observées dans les troubles bipolaires (Ashok *et al.*, 2017). De même, une élévation de DA extracellulaire entraînant une forte stimulation des récepteurs D₂ est mise en cause dans certains des symptômes schizophréniques (Abi-Dargham *et al.*, 2000 ; Howes *et al.*, 2017 ; Weinstein *et al.*, 2017). Enfin, les addictions aux drogues (nicotine, héroïne, cocaïne, méthamphétamines, opioïdes...), à l'alcool ou encore à la nourriture sont connues pour être liées à une altération des voies mésolimbiques, la plupart de ces substances partageant la propriété d'augmenter la libération de DA dans le striatum et le noyau accumbens (Kenny, 2011 ; Baïk, 2013). Un résumé des acteurs DAergiques et leurs implications dans des pathologies neurologiques humaines est présenté dans le Tableau 2.

Au niveau périphérique, on sait que la DA participe à la régulation de la pression sanguine notamment au niveau rénal (Jose *et al.*, 2002 ; Zeng *et al.*, 2007), et aux fonctions cardiovasculaires (Holmes & Fowler, 1962 ; Kohli *et al.*, 1991) et intestinales (Dhasmana *et al.*, 1989 ; Anlauf *et al.*, 2003).

Tableau 2 : Acteurs dopaminergiques et leurs implications dans des pathologies humaines (adapté de Shen *et al.*, 2012)

Cible dopaminergique	Pathologies associées
Synthèse de la dopamine et renouvellement	Maladie de Parkinson TDAH Schizophrénie Dystonie dopa-sensible
Transporteur de la dopamine (DAT)	Dépendance à l'héroïne, à la cocaïne, aux opiacés, à la nicotine TDAH Maladie de Parkinson Parkinsonisme Maladie du tremblement essentiel Démence à corps de Lewy Maladie d'Alzheimer Schizophrénie Atrophie multisystématisée Dystonie dopa-sensible Paralysie supranucléaire progressive Maladie de Machado-Joseph
Récepteur dopaminergique D₁	Schizophrénie
Récepteur dopaminergique D₂	Dépendance à la drogue, à la cocaïne, aux méthamphétamines, aux opiacées, à l'alcool, aux antipsychotiques TDAH Parkinsonisme Schizophrénie
Transporteur vésiculaire de monoamine 2 (VMAT2)	Maladie de Parkinson Démence à corps de Lewy Maladie d'Alzheimer

B. Le système purinergique de l'Homme

Les purines sont des molécules azotées hétérocycliques composées d'un cycle pyrimidine accolé à un cycle imidazole. Les deux purines les plus connues sont l'adénine et la guanine, constituants de l'ADN se liant à leurs pyrimidines respectives, la thymine et la cytosine. La xanthine, l'hypoxanthine et l'acide urique sont également des purines, impliquées dans les voies de recyclage et de dégradation. Par extension, on entend plus communément dans le terme « purine » les composés à bases puriques, tels que les nucléosides (adénosine, inosine et guanosine) auxquels un pentose a été ajouté, et les nucléotides (AMP : adénosine monophosphate ; IMP : inosine monophosphate ; et GMP : guanosine monophosphate) possédant un pentose et un phosphate supplémentaire.

Les purines sont utilisées par toutes les cellules du corps pour de nombreux processus biologiques essentiels. Elles peuvent être produites au sein de l'organisme par la dégradation des acides nucléiques et nucléotides, ou peuvent être apportées par l'alimentation. Les aliments riches en purines sont par exemple la levure de bière, le thé, le cacao, les abats (ris de veau, cervelle, foie), certains poissons (hareng, maquereau, sardines, thon, anchois), la viande rouge, les légumineuses (lentilles, fèves).

1. Le métabolisme des purines et ses fonctions dans l'organisme

1.1 Synthèse, recyclage et catabolisme des purines

La biosynthèse des composés à bases puriques peut s'effectuer par deux voies distinctes : la voie de synthèse *de novo* à partir de petites molécules précurseurs, et la voie de recyclage, ou sauvetage, qui permet à la cellule d'incorporer directement des purines préformées (Figure 6). Toutes ces réactions ont lieu au sein du cytosol des

cellules. Les explications suivantes sont tirées en partie du Chapitre « Nucleotide Metabolism » de Bhagavan & Ha (2015).

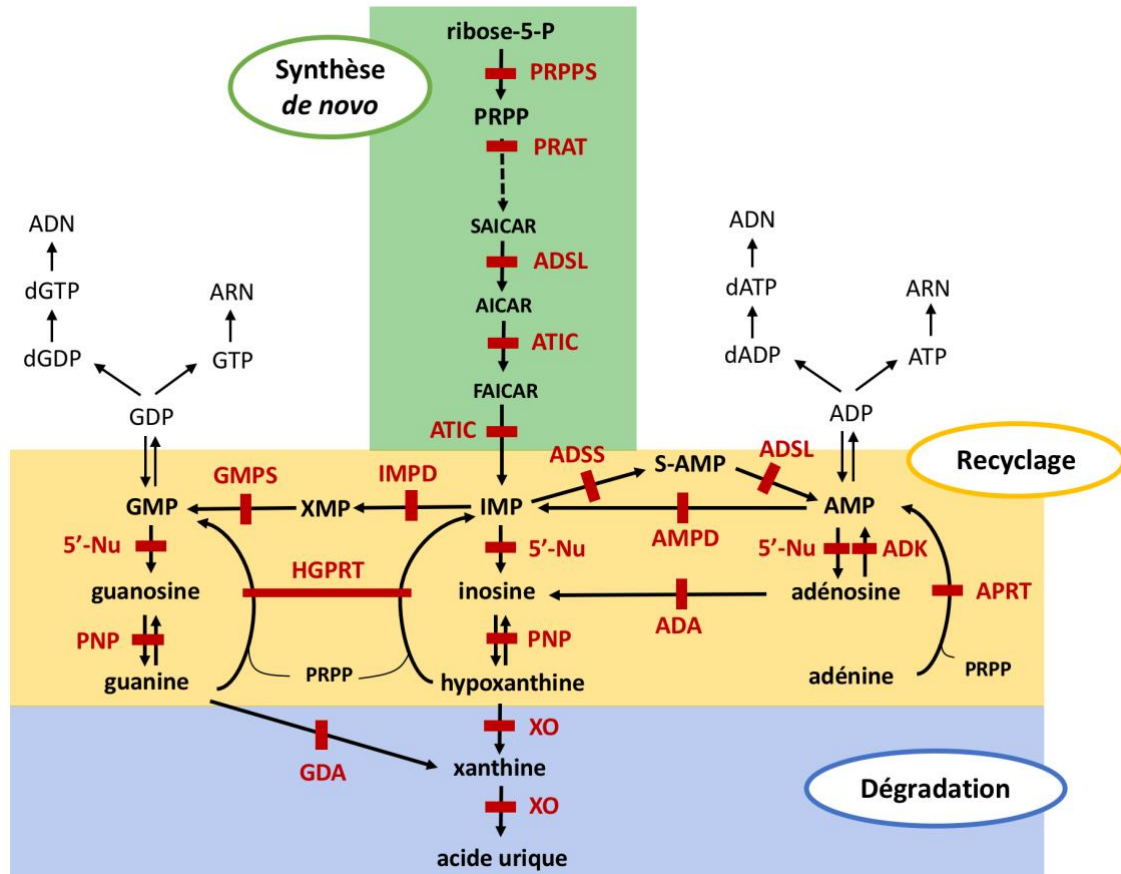


Figure 6 : Métabolisme des purines de l'Homme

Le métabolisme des purines comprend 3 grandes voies : la voie de synthèse *de novo*, la voie de recyclage et la voie de dégradation. 5'-Nu : 5' nucléotidase ; ADA : adénosine désaminase ; ADK : adénosine kinase ; ADN : acide désoxyribonucléique ; ADP : adénosine diphosphate ; ADSL : adénylosuccinate lyase ; ADSS : adénylosuccinate synthétase ; AICAR : aminoimidazole carboxamide ribonucléotide ; AMP : adénosine monophosphate ; AMPD : AMP désaminase ; APRT : adénine phosphoribosyltransférase ; ARN : acide ribonucléique ; ATIC : 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase ; ATP : adénosine triphosphate ; d : désoxy- ; FAICAR : 5-formamidoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide ; GDA : guanine désaminase ; GDP : guanosine diphosphate ; GMP : guanosine monophosphate ; GMPS : GMP synthase ; GTP : guanosine triphosphate ; HGPRT : hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase ; IMP : inosine monophosphate ; IMPD : IMP déshydrogénase ; PNP : purine nucléoside phosphorylase ; PRAT : phosphoribosylamidotransférase ; PRPP : phosphoribosylpyrophosphate ; PRPPS : PRPP synthétase ; SAICAR : succinylaminoimidazole carboxamide riboside ; S-AMP : succinyl-AMP ; XMP : xanthosine monophosphate ; XO : xanthine oxydase (Adapté de Ceballos-Picot & Jinnah, 2016).

Introduction

- La synthèse *de novo* des purines

La synthèse *de novo* correspond à une série de 11 réactions biochimiques menant à la formation d'inosine monophosphate (IMP) à partir de ribose 5-phosphate (ribose 5-P). Une grande variété de sources est utilisée afin de former le cycle purique, à savoir la glycine, la glutamine, l'acide formique, l'aspartate et le dioxyde de carbone. L'intermédiaire clé de la biosynthèse des nucléotides est le phosphoribosylpyrophosphate (PRPP) catalysé par la PRPP-synthétase (PRPPS) à partir de ribose 5-P (Remy *et al.*, 1955). Des niveaux intracellulaires élevés de PRPP entraînent une suractivation de la synthèse *de novo*. La phosphoribosylamidotransférase (PRAT), seconde enzyme de cette voie intervenant dans la conversion du PRPP en phosphoribosylamine (PRA), est l'enzyme limitante. Une fois l'IMP formé, il est très rapidement transformé en AMP ou GMP, eux-mêmes pouvant alors être convertis dans leur formes di- ou triphosphates respectives selon les besoins de la cellule.

La biosynthèse des purines est finement régulée par les deux enzymes allostériques PRPPS et PRAT, qui sont inhibées par un rétrocontrôle négatif des nucléotides formés (AMP et GMP). Un complexe multienzymatique formé de 6 enzymes de la synthèse *de novo* et nommé purinosome peut également se former près des mitochondries lors d'une demande importante en purines et ainsi accélérer leur synthèse (Zhao *et al.*, 2013 ; Pedley & Benkovic, 2017).

La synthèse *de novo* est particulièrement active dans le foie et les muscles squelettiques (Zhao *et al.*, 2013).

- La voie de recyclage, ou sauvetage, des purines

La voie de synthèse *de novo* est très énergivore : pour un nucléotide formé, 6 molécules d'ATP sont nécessaires. C'est pourquoi il existe une seconde voie moins coûteuse sur le plan énergétique (2 ATP), appelée voie de recyclage (ou sauvetage) des

purines. Celle-ci réutilise les bases puriques préformées par la voie de synthèse *de novo* ou apportées par l'alimentation pour les retransformer en leur nucléotides respectifs. Deux enzymes majeures jouent ce rôle, l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HGPRT) qui recycle l'hypoxanthine et la guanine en IMP et GMP, respectivement, et l'adénine phosphoribosyltransférase (APRT) qui recycle l'adénine en AMP (Williams & Buchanan, 1953 ; Korn *et al.*, 1955 ; Kornberg *et al.*, 1955). Ces réactions nécessitent le même co-substrat, le PRPP, afin de transférer un groupement ribose-1-phosphate à la base purique (Remy *et al.*, 1955).

Il est important de noter que chez l'Homme il n'y a pas de production endogène de l'adénine via la dégradation de l'AMP/adénosine, contrairement à la guanine et à l'hypoxanthine qui peuvent être formées à partir de leurs nucléosides respectifs sous l'action des purines nucléosides phosphorylases (PNP) afin d'être ensuite dégradées sous forme d'acide urique (Figure 6) (Fox *et al.* 1977 ; Bhagavan & Ha, 2015). L'apport d'adénine se fait donc seulement par le bol alimentaire. Une seconde différence entre ces purines est que l'adénosine kinase (AK) qui transforme l'adénosine en AMP est largement exprimée chez l'Homme alors que l'existence d'une inosine ou d'une guanosine kinase n'a jamais pu être mise en évidence pour faire de même avec ces nucléosides (Friedmann *et al.*, 1969). Il semblerait que seules les bactéries possèdent ces deux kinases et puissent donc convertir l'inosine et la guanosine en IMP et GMP, respectivement (Kawasaki *et al.*, 2000 ; Nyhan, 2014).

La voie de recyclage des purines est prédominante dans les tissus à forte demande énergétique comme le cœur et le cerveau (Ipata, 2011 ; Johnson *et al.*, 2019).

- Le catabolisme des purines

Les purines sont dégradées sous forme d'acide urique, molécule très insoluble dans l'eau dont deux tiers sont excrétés par les reins et les voies urinaires, et un tiers par le tube digestif. Le processus de catabolisme requière d'abord l'action des 5'-

nucléotidases (5'-Nu) qui hydrolysent les nucléotides en nucléosides (Figure 6). L'adénosine est convertie en inosine par l'adénosine désaminase (ADA), tandis que l'inosine et la guanosine sont transformées en hypoxanthine et guanine par les PNP. Ces deux dernières purines sont dégradées en xanthine par la xanthine oxydase (XO) et la guanine désaminase (GDA), respectivement. La XO catalyse également la dernière étape permettant la conversion de xanthine en acide urique, réaction qui libère également un composé oxydant, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

A l'exception de certains primates et l'Homme, les autres mammifères sont capables de convertir l'acide urique en allantoiné grâce à l'urate oxydase présente dans le foie (Varela-Echavarria *et al.*, 1988 ; Alvarez-Lario & Macarrón-Vicente, 2010). Le métabolisme des purines est conservé chez la levure (Daignan-Fornier & Pinson, 2019), *C. elegans* (Marsac *et al.*, 2019) ou encore chez les plantes (Moffatt & Ashihara, 2002).

1.2 Fonctions du métabolisme des purines

Le métabolisme des purines est impliqué dans de nombreuses fonctions variées et vitales (Jinnah *et al.*, 2013) :

- elles sont l'élément de base des acides nucléiques, et participent de ce fait à la synthèse et à la réparation des molécules d'ARN et d'ADN.
- elles permettent la formation des molécules d'ATP, essentielles au métabolisme énergétique cellulaire et requises dans de nombreuses réactions enzymatiques.
- elles sont la base de coenzymes et de cofacteurs essentiels à de nombreuses réactions biochimiques comme la flavine adénine dinucléotide (FAD), le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) et la tétrahydrobioptérine (BH₄).
- elles sont impliquées dans la transduction du signal intracellulaire via les molécules cycliques AMPc et GMPc.
- elles sont également les composants de certains alcaloïdes comme la caféine, la théobromine et la théophylline.

Certaines purines ont des rôles plus spécifiques dans le SNC, comme l'adénosine qui agit en tant que neuromodulateur et régule l'activité de plusieurs neurotransmetteurs (Abbracchio *et al.*, 2009 ; Sachdeva & Gupta, 2013). L'adénosine et la guanosine sont également connues pour être des agents trophiques (Rathbone *et al.*, 1999). De larges quantités de ces deux nucléosides sont par exemple libérées extracellulairement après une ischémie ou un traumatisme. L'acide urique est aussi un composé antioxydant puissant ayant des capacités neuroprotectrices contre certaines maladies neurodégénératives comme la MP et la sclérose en plaques (Cutler *et al.*, 2015 ; Crotty *et al.*, 2017).

Plus récemment, il a été montré un rôle des purines dans le contrôle de certaines étapes cruciales du développement fœtal et embryonnaire (Fumagalli *et al.*, 2017). Par exemple, l'activation des récepteurs purinergiques, exprimés par les cellules souches neurales, régule finement la prolifération des cellules, leur différenciation en neurones ou en cellules gliales, et leur positionnement correct.

1.3 Récepteurs et transporteurs membranaires associés au métabolisme des purines

Les récepteurs purinergiques font partis des récepteurs les plus abondants dans l'organisme. Ils ont été identifiés par Burnstock et ses collègues en 1976 et classés par la suite en différents groupes selon leur profil pharmacologique (Burnstock, 1976 ; Rathbone *et al.*, 1999) : les récepteurs P1 ou récepteurs de l'adénosine, et les récepteurs P2 stimulés principalement par l'ATP et subdivisés en 2, les récepteurs P2X et P2Y (Figure 7). Ils sont exprimés principalement au sein des neurones et des cellules gliales (astrocytes, microglie, oligodendrocytes) et sont impliqués dans de nombreuses fonctions, comme les processus d'apprentissage et de mémorisation, la locomotion, le sommeil, l'apoptose, et la prolifération et la migration des cellules souches neurales (Ulrich *et al.*, 2012 ; Burnstock, 2013).

Introduction

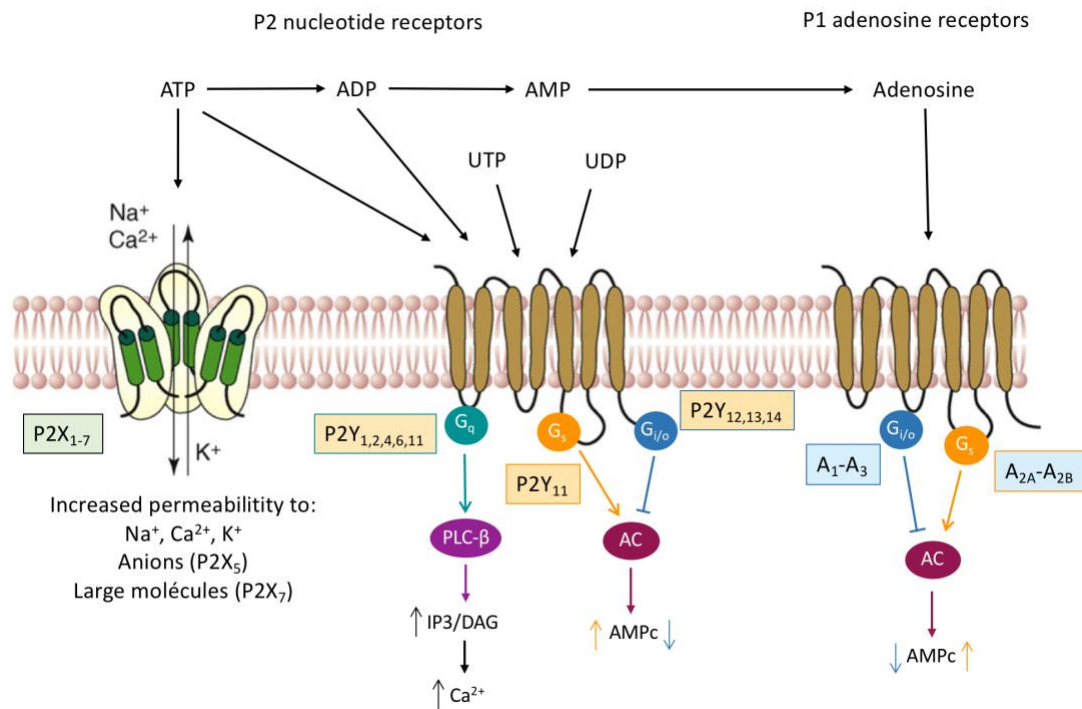


Figure 7 : Récepteurs purinergiques

Les récepteurs purinergiques sont divisés en 2 groupes, les récepteurs P1 et P2. Les récepteurs P1 sont des récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G et lient l'adénosine. Il en existe 4 sous-types : A₁, A₃, qui inhibent l'AC, et A_{2A}, A_{2B} qui l'activent. Les récepteurs P2 sont subdivisés en 2 sous-groupes et lient différents nucléotides : les P2X sont des récepteurs ionotropiques s'ouvrant en réponse à l'ATP et les P2Y sont des récepteurs métabotropiques stimulés par l'ATP-ADP et l'UTP-UDP. Suivant les différents sous-types, ils peuvent activer la PLC, entraînant une augmentation d'IP₃ et une mobilisation du calcium stocké, ou activer/inhiber l'AC. ADP : adénosine diphosphate ; AMP : adénosine monophosphate ; AMPc : AMP cyclique ; ATP : adénosine triphosphate ; DAG : diacylglycérol ; IP₃ : inositol triphosphate ; PLC : phospholipase C ; UDP : uridine diphosphate ; UTP : uridine triphosphate (Adapté de Abbraccio *et al.*, 2009 et Yang & Liang, 2012).

- Récepteurs purinergiques P1 ou récepteurs de l'adénosine

Les récepteurs P1 sont des récepteurs métabotropiques répondant à l'adénosine. 4 sous-types ont été identifiés : A₁, A_{2A}, A_{2B}, et A₃ (Sachdeva & Gupta, 2013 ; Sheth *et al.*, 2014). Typiquement, les récepteurs A₁ et A₃ se lient aux sous-unités G_{i/o} des protéines G et inhibent la production d'AMPc, tandis que les récepteurs A_{2A} et A_{2B} la stimulent via la sous-unité G_{s/olf}. Chaque sous-type est exprimé à plus ou moins grande intensité dans différents tissus : les A₁R sont largement distribués dans le cortex, l'hippocampe, le cervelet et les ganglions de la base, les A_{2A}R ont une expression plus restreinte

dans le striatum et le bulbe olfactif, les A_{2B}R sont plutôt présents dans l'intestin, le colon, la vessie, les poumons, et moins fortement dans le cerveau comme les A₃R que l'on retrouve en faible intensité dans l'hippocampe et le cerebellum. L'activation de ces récepteurs module notamment la libération de neurotransmetteurs tels que le glutamate, l'acétylcholine, la sérotonine, le GABA et la dopamine. Ils sont de ce fait impliqués dans de nombreux processus moteurs et cognitifs comme l'apprentissage et la mémoire, le sommeil, l'anxiété, la dépression, l'épilepsie et l'addiction aux drogues (Soliman *et al.*, 2018). Ainsi, leur implication dans des pathologies neurodégénératives telles que la MP (Nazario *et al.*, 2017 ; Fathalla *et al.*, 2017), la maladie d'Alzheimer (Laurent *et al.*, 2014 ; Faivre *et al.*, 2018 ; Cellai *et al.*, 2018) et la maladie de Huntington (Blum *et al.*, 2003 ; Popoli *et al.*, 2007 ; Blum *et al.*, 2018) a été beaucoup étudiée.

- Récepteurs purinergiques P2

Les récepteurs P2 sont divisés en 2 sous-groupes en fonction de leur structure et leur mécanisme d'action : les récepteurs P2X et P2Y (Abbracchio, 1994 ; Abbracchio *et al.*, 2009 ; Sperlágh *et al.*, 2007).

Les récepteurs P2X sont des récepteurs ionotropiques qui ouvrent leur canal en réponse à la liaison de molécules d'ATP. Leurs pores sont perméables aux ions Na⁺, K⁺ et Ca²⁺. Ce sont des trimères formés de sous-unités encodées par 7 gènes distincts (P2X1-7) ce qui permet une grande diversité de récepteurs P2X suivant leurs sous-unités d'assemblage. Ils sont retrouvés dans les neurones pré et post-synaptiques et dans les cellules gliales. Durant une activité synaptique, la libération d'ATP par les neurones ou les cellules gliales stimule ces récepteurs, ce qui déclenche une entrée de Ca²⁺ dans l'espace intracellulaire. L'influx calcique médié par les récepteurs P2X en présynaptique permet par exemple la régulation de libération de neurotransmetteurs. Les P2X post-synaptiques peuvent eux interagir directement avec des récepteurs ionotropiques comme les récepteurs GABA_A et NMDA (N-méthyl-D-aspartate).

Introduction

Les récepteurs P2Y sont des récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G, stimulés principalement par l'ATP, l'ADP, l'UTP (uridine triphosphate) et l'UDP (uridine diphosphate). 2 sous-groupes sont référencés, les P2Y₁₋₂₋₄₋₆₋₁₁ et les P2Y₁₂₋₁₃₋₁₄. Les récepteurs du premier groupe utilisent la sous-unité G_q pour activer la phospholipase C qui a pour conséquence d'augmenter l'inositol triphosphate (IP3) et le Ca²⁺, tandis que les récepteurs du second groupe se couplent à la sous-unité G_{i/o} qui inhibe l'adénylate cyclase (AC) et donc l'AMPc. Le P2Y₁₁ a à l'inverse la capacité d'augmenter l'activité de l'AC.

- Transporteurs de nucléosides puriques

Deux types de transporteurs sont capables d'importer ou exporter des nucléosides puriques entre les espaces intra et extracellulaires : les ENTs (*Equilibrative nucleoside transporters*) et les CNTs (*Concentrative nucleoside transporters*).

Les ENTs sont des transporteurs ubiquitaires bidirectionnels passifs qui font passer les nucléosides à travers la membrane plasmique selon leur gradient de concentration (Podgorska *et al.*, 2005 ; Boswell-Casteel & Hays, 2017 ; Pastor-Anglada & Pérez-Torras, 2018). Il existe 4 isoformes de l'ENT chez l'Homme (ENT1-4), ENT1 et ENT2 étant les plus exprimés dans le cerveau. Ces transporteurs présentent une plus forte affinité à l'adénosine et ont été de ce fait beaucoup étudiés. En conditions physiologiques, la concentration en adénosine intracellulaire étant très faible, les ENTs capturent rapidement l'adénosine extracellulaire dans les terminaisons nerveuses où elle est convertie aussitôt en AMP ou en inosine pour maintenir le gradient de concentration. Cependant, sous certaines circonstances de stress métaboliques comme une hypoxie ou une ischémie, les ENTs peuvent agir en sens inverse et relarguer d'importantes quantités d'adénosine dans l'espace extracellulaire (Sperlágh & Vizi, 2011). A noter que l'adénosine est le plus souvent libérée indirectement dans l'espace extracellulaire sous forme d'ATP, rapidement décomposé en adénosine par

l'action des ectonucléotidases, mais elle peut aussi être libérée directement, bien que le mécanisme exact reste pour l'instant mal compris (Nguyen & Venton, 2015).

Les CNTs sont des transporteurs unidirectionnels actifs dépendants du sodium transportant les nucléosides contre leur gradient de concentration (Gray *et al.*, 2004 ; Podgorska *et al.*, 2005 ; Pastor-Anglada & Pérez-Torras, 2018). A l'inverse des ENTs, ils sont plus sélectifs et montrent une plus grande affinité pour leurs substrats respectifs. 3 sous-types ont été décrits (CNT1-3) mais seuls les CNT2 et CNT3 transportent des nucléosides puriques (adénosine et uridine), en les important dans l'espace intracellulaire. Les CNTs sont particulièrement présents dans le foie, le rein, l'intestin, les cellules immunitaires et le cerveau mais principalement au niveau de la barrière hémato-encéphalique.

2. Interactions entre les systèmes purinergique et dopaminergique

2.1 Interactions entre les récepteurs de l'adénosine et de la dopamine

Comme mentionné dans la partie précédente, les récepteurs de l'adénosine de type A₁ et A_{2A} sont particulièrement enrichis dans le striatum, et une grande majorité se retrouvent notamment dans une sous-population de neurones, les neurones GABAergiques épineux, exprimant également les récepteurs DAergiques D₁ ou D₂ (Schiffmann & Vanderhaeghen, 1995 ; Fuxe *et al.*, 2010). Ceci n'est pas un hasard car de nombreuses études ont en effet démontré des interactions antagonistes entre les récepteurs adénosinergiques et DAergiques chez les mammifères (Ferré *et al.*, 1997 ; Franco *et al.*, 2000 ; Kim & Palmiter, 2008). Ces interactions seraient notamment impliquées dans plusieurs pathologies comme la MP, la schizophrénie et l'addiction aux drogues (Fuxe *et al.*, 2010 ; Borroto-Escuela *et al.*, 2016 ; Pinna *et al.*, 2018 ; Borroto-Escuela & Fuxe, 2019).

Introduction

Des analyses *in vitro* ont permis de mettre en évidence que les récepteurs s'associent pour former des hétéromères (A_1 avec D_1 et A_{2A} avec D_2). L'activation du récepteur de l'adénosine induit une diminution de l'affinité du récepteur DAergique pour son ligand, modulant ainsi la signalisation secondaire. Une régulation peut aussi avoir lieu au niveau de l'AC, régulée dans des sens contraires par ces deux récepteurs. Par exemple dans le cas des interactions A_1 - D_1 , la présence d'un agoniste à l'adénosine entraîne une diminution de la production d'AMPc induite par la signalisation du récepteur D_1 , et à l'inverse la présence d'un antagoniste se fixant au récepteur A_1 potentialise la réponse en AMPc ayant lieu après activation des récepteurs D_1 (Ferré *et al.*, 1998). Ces hétéromères sont ainsi connus pour moduler l'excitabilité des neurones GABAergiques striato-pallidaux (Figure 8).

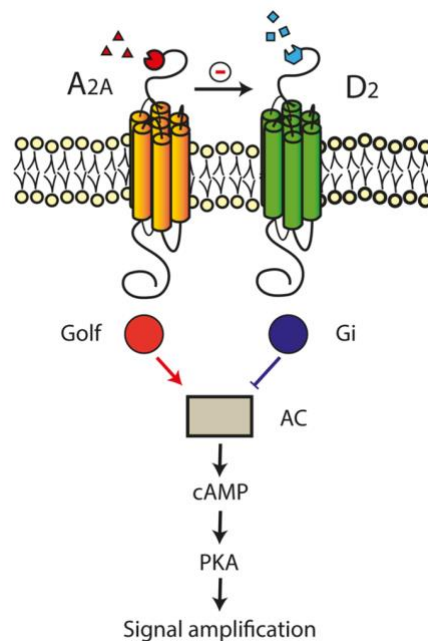


Figure 8 : Représentation schématique d'un hétéromère A_{2A} - D_2

Les neurones épineux striato-pallidaux coexpriment les récepteurs A_{2A} et D_2 à la leur membrane, qui s'associent et forment un hétéromère. La flèche noire montre l'interaction allostérique antagoniste du récepteur A_{2A} sur le récepteur D_2 . L'activation du récepteur A_{2A} diminue la signalisation médiée par le récepteur D_2 , qui est en revanche potentialisé par l'antagonisme du récepteur A_{2A} . Les flèches rouges et bleues indiquent le couplage opposé des deux récepteurs avec l'adénylate cyclase (AC), ce qui explique leurs interactions fonctionnelles opposées résultant en des modifications divergentes des niveaux d'AMPc et de PKA (Pinna *et al.*, 2018).

2.2 Modulation du système dopaminergique par les récepteurs purinergiques

Des études ont mis en évidence un rôle modulateur des récepteurs adénosinergiques A_1 et A_{2A} sur la libération de DA dans le noyau accumbens et le striatum (Quarta *et al.*, 2004 ; Ciruela *et al.*, 2006 ; Ross & Venton, 2015). Ceci serait rendu possible par les interactions antagonistes de ces deux récepteurs sur la neurotransmission glutamatergique, la stimulation des récepteurs A_1 diminuant les effets stimulateurs des A_{2A} sur le glutamate et inversement. Le glutamate libéré activerait ensuite ses récepteurs NMDA pour induire un relargage de DA (Figure 9).

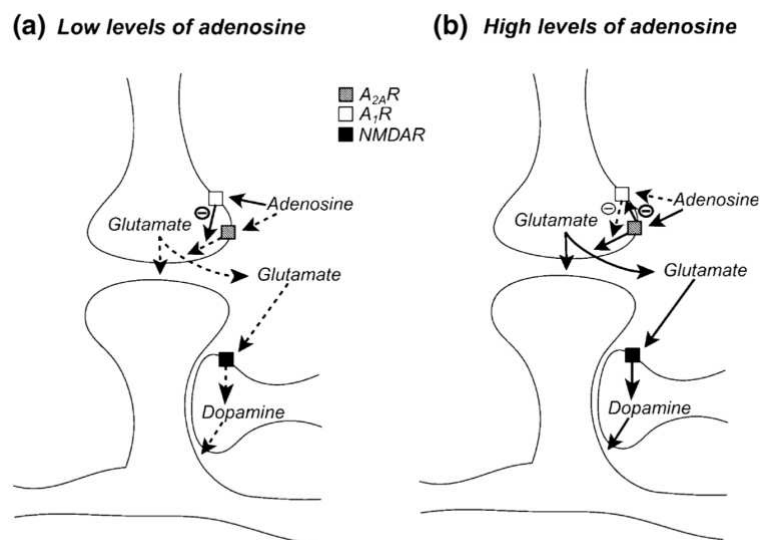


Figure 9 : Modulation de la libération de glutamate et de DA par l'adénosine dans le noyau accumbens

Les interactions antagonistes fonctionnelles entre les récepteurs A_1 et A_{2A} au sein des terminaisons nerveuses glutamatergiques contrôlent la libération de glutamate, qui lui-même module la libération de DA par la stimulation de ses récepteurs NMDA localisés sur les terminaisons DAergiques. (a) En conditions basales, l'activation des récepteurs A_1 par l'adénosine prédomine et masque l'effet stimulant des récepteurs A_{2A} . (b) Dans des conditions physiologiques avec de fortes concentrations d'adénosine, une activation forte des récepteurs A_{2A} outrepassa l'effet inhibiteur imposé par le récepteur A_1 , probablement en diminuant l'affinité de l'adénosine pour ce récepteur, ce qui induit un relargage de glutamate puis de DA via l'activation du récepteur NMDA (Quarta *et al.*, 2004).

Introduction

Des analyses sur des synaptosomes striataux et cellules PC12 de rats ont aussi montré que les récepteurs adénosinergiques A₂ régulent positivement la transcription de la TH (Erny & Wagner, 1984 ; Onali *et al.*, 1988 ; Gammella *et al.*, 2010).

Enfin, de nombreuses études ont observé que l'activation des récepteurs purinergiques P2 par l'ATP augmente le relargage de DA des neurones nigrostriataux (Zhang *et al.*, 1995 ; Krügel *et al.*, 2001 ; Sperlágh *et al.*, 2007 ; Navarro *et al.*, 2015). Une récente étude montre également des interactions entre les récepteurs purinergiques et DAergiques, le blocage des récepteurs D₁ ou D₂ modifiant les effets médiés par le récepteur purinergique P2X4 (Khoja *et al.*, 2019).

2.3 Purines et maladie de Parkinson

Étant donné les liens étroits entre systèmes purinergiques et DAergiques, l'implication des purines et leurs potentielles propriétés neuroprotectrices ont logiquement été investiguées dans la MP.

Garcia-Esparcia et collaborateurs ont exploré les possibles altérations de l'expression de gènes codant pour des enzymes du métabolisme des purines dans la SN, le putamen et le cortex de cerveaux parkinsoniens à différents stades (Garcia-Esparcia *et al.*, 2015). Ils ont ainsi pu établir une réduction de l'expression de l'AK (AK2-3-4), de l'APRT et de la PNP dans la SN, ainsi qu'une augmentation de l'expression de l'ADA et de l'AK (1-5) dans le cortex. Une autre étude a identifié une nouvelle cause génétique de la MP par mutation du gène *ADORA1* codant pour le récepteur de l'adénosine A₁ (Jaberi *et al.*, 2016). Ce gène se trouve en fait dans le locus parkinsonien PARK16 et pourrait donc être le gène de susceptibilité de la MP au sein de ce locus.

L'implication potentielle de la signalisation adénosinergique dans la MP a été largement explorée. Un *knock-out* (KO) du gène codant pour le récepteur A_{2A} chez des souris traitées à la 6-hydroxydopamine (6-OHDA), une neurotoxine ciblant

principalement les nDA, permet de réduire les mouvements anormaux involontaires observés après administration de L-DOPA (Yin *et al.*, 2017). Le blocage pharmacologique du récepteur A_{2A} par des antagonistes comme la caféine (inhibiteur compétitif non sélectif) a également démontré des effets neuroprotecteurs sur la dégénérescence des neurones de la SN, les niveaux de DA et les comportements moteurs dans plusieurs modèles de rats de la MP (Xu *et al.*, 2016 ; Reyhani-Rad & Mahmoudi, 2016 ; Roshan *et al.*, 2016 ; Fathalla *et al.*, 2017 ; Carmo *et al.*, 2019). Une récente analyse métabolomique effectuée sur un modèle murin MPTP (méthylphényltétrahydropyridine) de MP a également mis en évidence une augmentation d'hypoxanthine et d'inosine, et une diminution d'adénosine et d'adénine dans le striatum (Huang *et al.*, 2019). Cette même étude montre que l'inhibition de l'ADA (permettant une augmentation d'adénosine) protège contre la dégénérescence des neurones DA induite par le MPTP, et qu'un effet neuroprotecteur additif est obtenu par combinaison avec un antagoniste des récepteurs A_{2A}. Une diminution d'adénosine pourrait donc être en cause ou participer à la neurodégénérescence DAergique observé dans la MP.

De récents résultats montrent aussi que l'augmentation d'ATP par application de pyruvate d'éthyle améliore les défauts cognitifs et moteurs chez un modèle murin MPTP de la MP (Haga *et al.*, 2019). Cependant, une autre étude mettait auparavant en avant une toxicité de l'ATP et plutôt un rôle neuroprotecteur des antagonistes des récepteurs P2X et P2Y dans la locomotion et les concentrations de DA striatale chez des rats traités à la 6-OHDA (Kumar *et al.*, 2017). L'inosine et la guanosine ont aussi été proposés comme molécules neuroprotectives dans la MP selon des résultats positifs sur des modèles cellulaires et rongeurs (Cipriani *et al.*, 2014 ; Marques *et al.*, 2018).

Enfin, étant donné les propriétés anti-oxydantes de l'acide urique et les évidences de l'implication du stress oxydatif dans la MP, l'acide urique a été proposé comme facteur neuroprotecteur endogène contre la MP. En effet, des taux plus faibles d'acide urique sont associés à un risque plus élevé de développer la MP et à l'inverse, mais seulement

chez les hommes, des taux plus élevés sont associés à un risque plus faible et un ralentissement de la progression de la MP (Cipriani *et al.*, 2010 ; Jain *et al.*, 2011 ; McFarland *et al.*, 2013 ; Gao *et al.*, 2016). Un essai clinique sur 75 patients parkinsoniens au stade encore précoce de la maladie a ainsi été lancé en administrant de l'inosine afin d'augmenter les taux d'acide urique dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien (LCR) (Schwarzschild *et al.*, 2014 ; Crotty *et al.*, 2017 ; Chen *et al.*, 2018).

Ces études démontrent l'existence de liens physiologiques entre le métabolisme des purines et le système DAergique, mais les mécanismes mis en jeu restent flous.

3. Maladies associées à des anomalies du métabolisme des purines

Des mutations des gènes codant pour des enzymes du métabolisme des purines sont connues pour être associées à des pathologies neurologiques aux conséquences souvent dramatiques (Ceballos-Picot & Jinnah, 2016). Ces pathologies, qualifiées d'erreurs innées du métabolisme, sont cependant rares et de ce fait parfois mal connues. Bien que les purines soient des éléments essentiels à tout l'organisme, les manifestations cliniques observées suggèrent souvent que le SNC est touché plus sévèrement que les autres organes (Camici *et al.*, 2010 ; Jinnah *et al.*, 2013). Et souvent, le lien moléculaire entre l'affectation métabolique et les manifestations neurologiques est incompris. Ceci suggère qu'on ne connaît encore pas bien toutes les fonctions des purines dans l'organisme et plus particulièrement dans le SNC.

Les anomalies du métabolisme des purines donnent lieu à une grande variété de symptômes neurologiques, immunologiques, hématologiques, musculo-squelettiques ou rénaux, la majorité du temps dès l'enfance (Jurecka, 2009 ; Balasubramaniam *et al.*, 2014 ; Ceballos-Picot & Jinnah, 2016). Les pathologies prévalentes de la voie de synthèse *de novo* affectent les enzymes PRPPS, ADSL et ATIC. Des mutations de la PRPPS augmentant son activité entraînent une perte auditive et neurosensorielle, un

retard psychomoteur à degrés variés et de la goutte. Des mutations réduisant son activité sont liées à certains cas de syndrome de Charcot-Marie-Tooth avec une perte auditive et neurosensorielle, une neuropathie optique et une neuropathie sensorimotrice périphérique. Un déficit en ADSL provoque un retard psychomoteur, de l'épilepsie, des troubles autistiques et une hypotonie. Un déficit en ATIC est quant à lui lié à un retard mental, une cécité congénitale, une dysmorphie et de l'épilepsie.

Les troubles principaux affectant les voies de recyclage et de catabolisme des purines sont les déficits en ADA, PNP, AMPD, ADK, APRT et HGPRT. Le déficit en ADA provoque un déficit immunitaire combiné sévère souvent lié à des infections létales dès la petite enfance. Une transplantation de moelle épinière est efficace dans 70% des cas. La thérapie génique est également utilisée pour ce déficit mais des défauts neurologiques persistent (retard psychomoteur, épilepsie, perte auditive). Le déficit en PNP entraîne une immunodéficience associée parfois à un retard psychomoteur et des mutations de l'AMPD induisent une faiblesse musculaire liée à l'exercice, des douleurs musculaires et des crampes. Enfin, le déficit en ADK provoque une encéphalopathie progressive, un retard psychomoteur, une absence de langage, de l'épilepsie et une hypotonie.

Les manifestations cliniques associés aux mutations des deux enzymes principales du recyclage des purines, l'APRT et l'HGPRT sont curieusement assez différentes l'une de l'autre. Le déficit en APRT entraîne la formation de cristaux de 2,8-dihydroxyadénine (2,8-DHA) dans l'urine provoquant des néphrolithiases (calculs rénaux) pouvant amener à une insuffisance rénale. Cependant, ce déficit n'induit pas de manifestations neurologiques chez l'Homme et peut être traité par l'administration d'allopurinol ou de febuxostat, des inhibiteurs de la XO empêchant la formation des cristaux de 2,8-DHA, associé à un régime pauvre en purines (Takano *et al.*, 2005 ; Bollée *et al.*, 2010 ; Marra *et al.*, 2012 ; Bollée *et al.*, 2012 ; Ceballos-Picot *et al.*, 2019). Le déficit en HGPRT, autrement nommé maladie de Lesch-Nyhan (MLN), induit également des néphrolithiases, cette fois-ci dues à une accumulation d'acide urique, mais aussi des problèmes moteurs variés (dystonie, choréoathétose) et une automutilation

Introduction

compulsive sévère associée parfois à d'autres formes d'autodestruction. La pathogenèse des troubles neurologiques est mal comprise mais semble être associée à une dérégulation DAergique. La description de la MLN, le tableau clinique, la pathogenèse des troubles neurocomportementaux, les tentatives de traitements et les modèles *in vitro* et *in vivo* seront détaillés dans la partie ci-après.

C. La maladie de Lesch-Nyhan

1. Découverte et généralités

Septembre 1962, deux frères de 5 et 8 ans sont admis aux urgences pédiatriques de l'Hôpital Johns Hopkins, à Baltimore. Ils présentent un tableau clinique très particulier avec des mouvements spasmodiques les empêchant de marcher, se tenir debout ou s'asseoir sans assistance, un retard mental et développemental important et une urine sableuse d'une couleur orangée dans leur couche. William Nyhan, alors pédiatre et chercheur scientifique et l'un de ses étudiants en médecine, Michael Lesch, auscultent les deux garçons et commencent des visites régulières. Ils découvrent la présence de cristaux d'acide urique dans les urines et une augmentation de l'uricémie ainsi que de nouveaux signes cliniques : des mouvements anormaux de choréoathétose, une hypertonie et une automutilation très sévère des doigts et des lèvres avec perte de matière. Les enfants parlent difficilement mais semblent comprendre plus qu'ils ne peuvent communiquer. Leur comportement n'indique pas d'anesthésie sensorielle : ils apparaissent horrifiés et crient durant les phases d'automutilation, mais sont soulagés et rassurés lorsque des contentions permettent d'empêcher leurs mouvements compulsifs. Deux ans après leur rencontre avec ces deux garçons, Nyhan et Lesch publient le premier article décrivant ce syndrome, que l'on appela par la suite la maladie de Lesch-Nyhan (Lesch & Nyhan, 1964 ; Nyhan 1997).



Pr. William Nyhan (à gauche) et Dr. Michael Lesch (à droite)

C'est peu de temps après, en 1967, que J. Edwin Seegmiller et collaborateurs mirent en évidence qu'une enzyme du métabolisme des purines, l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HGPRT), ne fonctionnait plus chez les patients LN (Seegmiller *et al.*, 1967 ; Kelley *et al.*, 1967). L'activité de cette enzyme a été mesurée dans les érythrocytes et les cellules de peau (fibroblastes) mais aussi dans les cellules amniotiques des malades (Shin-Buehring *et al.*, 1980).

2. Un déficit en HGPRT

2.1 Altérations du métabolisme des purines

La découverte d'un déficit en HGPRT chez les patients LN explique logiquement la surproduction d'acide urique observée. En effet, en absence de recyclage de l'hypoxanthine et de la guanine, ces deux purines s'accumulent notamment dans les urines, le plasma et le LCR et sont éliminées sous forme d'acide urique (Harkness *et al.*, 1988). Deux autres mécanismes sont probablement impliqués secondairement dans l'hyperuricémie. Des concentrations plus faibles d'ATP et de GTP ont été retrouvées dans des lymphoblastes de patients (McCreanor *et al.*, 1987 ; Fairbanks *et al.*, 2002). La production moindre de ces nucléotides entraînerait un rétrocontrôle positif sur la PRPPS, suractivant la voie de synthèse *de novo* pour compenser le manque de nucléotides, et donc augmentant la production d'IMP dégradé sous forme d'hypoxanthine puis d'acide urique (Figure 10). Enfin, cette dernière voie est probablement aussi augmentée par la biodisponibilité accrue du PRPP, étant co-substrat de l'HGPRT et précurseur de la synthèse *de novo* (Reem *et al.*, 1975 ; Rosenbloom *et al.*, 1968 ; Fu *et al.*, 2015). En effet, une étude a montré dans des lymphoblastes de patients LN une augmentation de 3 fois de la production de purines *de novo* et de 4 à 8 fois des concentrations intracellulaires de PRPP (Wood *et al.*, 1973).

La décision de traiter cette hyperuricémie par l'allopurinol a rapidement été prise (Newcombe *et al.*, 1966 ; Nyhan *et al.*, 1969). Bien que ce médicament soit efficace

dans le traitement de la goutte et des tophi en abaissant la concentration d'acide urique, il n'a cependant aucun effet sur les troubles neurocomportementaux (Torres *et al.*, 2007 ; Jinnah *et al.*, 2010 ; Madeo *et al.*, 2019). Son dosage doit également être finement ajusté car en absence d'activité de la XO, des niveaux élevés de xanthine et d'hypoxanthine sont retrouvés dans les urines. Des calculs de xanthine peuvent ainsi se former et provoquer des insuffisances rénales (Ogawa *et al.*, 1985 ; Sikora *et al.*, 2006 ; Torres *et al.*, 2007).

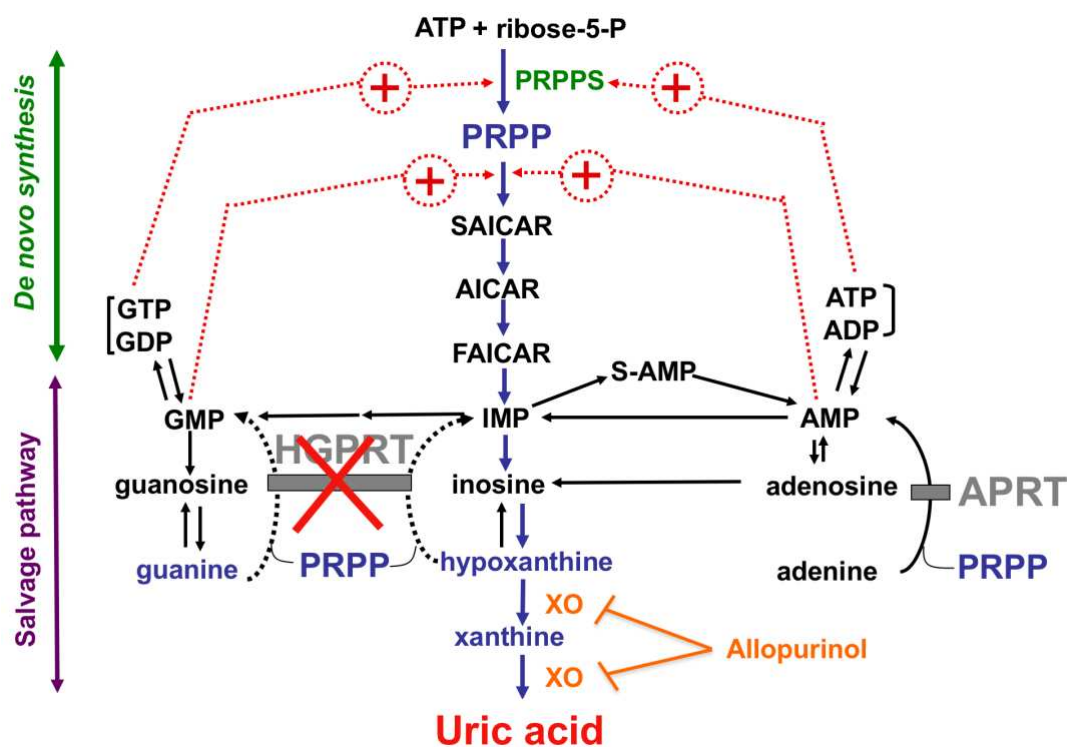


Figure 10 : Déficit en HGPRT et maladie de Lesch-Nyhan

L'absence d'activité HGPRT, et donc de recyclage d'hypoxanthine et de guanine en IMP et GMP, respectivement, entraîne : 1- une accumulation d'hypoxanthine et de guanine, 2- une suractivation de la voie de synthèse *de novo* par rétrocontrôle positif des nucléotides non recyclés, 3- une biodisponibilité augmentée du PRPP, co-substrat de l'HGPRT et de l'APRT et précurseur de la synthèse *de novo*. Ces 3 dérégulations contribuent à la surproduction du produit de dégradation final des purines, l'acide urique. L'allopurinol ou le febuxostat, inhibiteurs de la xanthine oxydase (XO), permettent d'en limiter sa production.

Introduction

Le PRPP étant co-substrat non seulement de l'HGPRT mais aussi de l'APRT, l'augmentation de sa biodisponibilité a une conséquence secondaire sur l'activité de cette enzyme. Il a en effet été démontré dans plusieurs publications une augmentation de l'activité APRT dans les érythrocytes, les fibroblastes, le foie, mais aussi le putamen, le noyau caudé, le thalamus et le cortex de patients LN (Rosenbloom *et al.*, 1967 ; Greene *et al.*, 1970 ; Boyle *et al.*, 1970 ; Shin-Buehring *et al.*, 1980 ; Lloyd *et al.*, 1981).

D'autres dérégulations métaboliques ont également été décrites. Une analyse métabolique sur des globules rouges de patients LN a ainsi révélé une augmentation drastique d'AICAR mono- et triphosphate (aussi nommés ZMP et ZTP), de nicotinamide, d'acide nicotinique et de S-AMP, et une diminution importante d'ATP (Ceballos-Picot *et al.*, 2015).

2.2 Epidémiologie et génétique

La découverte de signes cliniques semblables chez deux enfants d'une même fratrie et semblant exclusivement masculine a tout de suite suggéré une maladie génétique liée au chromosome X. Cette théorie fut confirmée par une étude menée au sein d'une même famille, où plusieurs cas de MLN ont été décelés au sein de la descendance (Nyhan *et al.*, 1970). Ces travaux montrent que la mutation est transmise par la mère, qui est hétérozygote pour la déficience de l'enzyme. Cependant, l'activité de l'HGPRT chez les femmes hétérozygotes est en général normale dans les globules rouges en raison d'une sélection clonale des érythrocytes non déficients au cours de l'érythropoïèse.

Les mutations sont apparues spontanément dans les familles, puis ont été transmises selon les lois de l'hérédité. L'allèle de l'HGPRT s'exprime de façon récessive. Les mères porteuses de la mutation sont qualifiées de porteuses saines car le second chromosome X compense la mutation de l'*HPRT*. Elles ont donc un risque de 50% de transmettre l'allèle muté à leur enfant. En revanche, les pères des enfants atteints ne

sont pas porteurs de la mutation. Les mères donnant naissance à des garçons porteurs de l'allèle muté seront atteints de la MLN, n'ayant pas un second chromosome X pour compenser. A l'inverse, les filles héritant de l'allèle muté seront porteuses de la maladie mais saines. Ainsi à chaque grossesse, les mères porteuses de la mutation ont 50% de chance d'avoir des enfants (garçon ou fille) sains, 25% de risque d'avoir une fille porteuse de l'allèle muté, et 25% de risque d'avoir un garçon atteint de la maladie.

Il existe cependant quelques cas très rares de femme LN dus à une mutation de l'*HPRT* sur le premier chromosome X actif et à une inactivation non aléatoire du second chromosome X non muté (Ogasawara *et al.*, 1989 ; Aral *et al.*, 1996 ; De Gregorio *et al.*, 2000 ; Rinat *et al.*, 2006).

Le gène *HPRT* humain, nommé par la suite *HPRT1*, a été décrit pour la première fois en 1983 (Jolly *et al.*, 1983). D'une taille de 44kb, il est localisé sur le chromosome X dans la région q26-27. Il est composé de 9 exons et 8 introns et encode un seul ARN messager mature d'environ 1,6 kb. Sa séquence codante contient 654 nucléotides et est traduite en HGPRT, une protéine de 24,6 kDa et 218 acides aminés s'assemblant spontanément en dimère ou tétramère (Patel *et al.*, 1986 ; Fu *et al.*, 2014a). Le gène *HPRT* est exprimé dans tous les tissus, à plus ou moins forte intensité (Stout & Caskey, 1985).

Avec l'essor des nouvelles technologies de séquençage, les premières mutations de l'*HPRT* chez les patients LN ont pu être décrites dans les années 90 (Bouwens-Rombouts *et al.*, 1993). Environ toutes les mutations retrouvées sont différentes d'une famille à l'autre et sont de tous types : insertions, délétions, substitutions et épissage (Figure 11) (Fu & Jinnah., 2012 ; Ceballos-Picot *et al.*, 2015 ; Madeo *et al.*, 2019). Le simple changement d'un acide aminé dans la séquence du gène peut affecter la structure tridimensionnelle de l'enzyme et conduire à une réduction ou abolition de son activité.

Les mutations du gène *HPRT1* sont très variées et de tous types. Les encadrés jaunes correspondent aux mutations retrouvées dans plus d'une famille. Les formes variantes HND (en bleu) et HRH (en orange) sont détaillées dans la partie ci-après (Ceballos-Picot *et al.*, 2015).

3.1 Forme classique

Dès l'âge de 3 à 6 mois, il est possible d'observer chez les nourrissons un retard développemental caractérisé par une hypotonie (diminution du tonus musculaire) avec une incapacité à se tenir assis sans support. Une urine sableuse et orangée visible dans les couches est aussi un signe apparent d'une surproduction d'acide urique qui peut donner l'alerte au pédiatre d'un possible déficit en HGPRT. L'hyperuricémie non traitée peut mener à des crises de gouttes ou le développement de tophi (poussées

inflammatoires dues à l'accumulation de cristaux d'acide urique dans les articulations pour la goutte ou en sous-cutané pour le tophus) et de néphrolithiases (calculs rénaux) pouvant conduire à une insuffisance rénale (Ankem *et al.*, 2000 ; Petru *et al.*, 2016).

Les mouvements involontaires apparaissent communément entre 6 et 12 mois. La principale caractéristique du syndrome moteur est la dystonie, un trouble du tonus musculaire entraînant des contractions involontaires prolongées se traduisant par des mouvements et postures anormales. Elle affecte chez les LN toutes les parties du corps et empêche donc les enfants de marcher ou se tenir debout sans soutien, ainsi que se nourrir seuls ou saisir des objets. Une choréoathétose (mouvements de contorsion involontaires et répétitifs), des mouvements de ballismes (projection brusque, violente et involontaire d'un membre) et une spasticité (contraction musculaire réflexe exagérée provoquant une raideur persistante et des mouvements répétitifs) sont parfois également observés. Ces troubles moteurs peuvent ne pas évoluer pendant 5-6 ans, avant d'observer une dégradation (Jinnah *et al.*, 2006).

Une dysarthrie (trouble de l'articulation et de la parole) et une dysphagie (difficulté à déglutir) sont souvent observées. L'élocution est retardée chez tous les patients (2-4 ans). Elle se limite à quelques mots ou de très courtes phrases et leur compréhension reste compliquée. La mastication et la déglutition sont laborieuses et beaucoup ont des reflux gastro-œsophagiens avec vomissements fréquents (Jinnah *et al.*, 2006).

Un comportement d'autodestruction conduisant à une automutilation sévère, principalement des doigts, des lèvres et de la langue, apparaît entre 1 et 6 ans (Robey *et al.*, 2003). Il peut aussi se manifester par des coups de têtes violents, des coups de poings dans les yeux ou par des comportements de mise en danger. Ces enfants ressentent pourtant bien la douleur donc une perte sensorielle n'est pas mise en cause. Ce comportement agressif peut aussi être dirigé envers leurs proches, avec des crachats ou un langage abusif (coprolalie). Lorsqu'ils sont maintenus par des

Introduction

contentions pour ne pas se nuire, les enfants sont habituellement calmes, joyeux et sociables.

Des études font également part d'un retard mental léger à modéré (Anderson *et al.*, 1992 ; Matthews *et al.*, 1999 ; Schretlen *et al.*, 2001). Cependant ce point est assez discuté à l'heure actuelle. En raison de leur handicap, les enfants ne sont pas forcément scolarisés comme les enfants de leur âge. De plus, la dysarthrie, les symptômes moteurs et leur comportement autodestructeur, les poussant parfois à refuser de répondre ou donner intentionnellement des réponses incorrectes, rendent les mesures de quotient intellectuel difficiles (Schretlen *et al.*, 2001). Des déficits d'attention et de mémoire de travail ont été notés dans la majorité des cas.

D'autres symptômes peuvent être observés comme des anémies mégaloblastiques, des anomalies respiratoires, des épisodes épileptiques et des troubles du sommeil et de l'humeur (van der Zee *et al.*, 1968 ; Christy *et al.*, 2017 ; Madeo *et al.*, 2019). Bien pris en charge, les patients LN peuvent vivre jusqu'à 30-40 ans mais sont généralement frêles et décèdent souvent d'infections comme de pneumonie. Un certain nombre d'entre eux meurent aussi de façon soudaine et inexpiquée (Neychev & Jinnah, 2006).

3.2 Formes variantes

A ce jour, plus de 300 mutations différentes du gène *HPRT* ont été décrites et conduisent à une variabilité phénotypique importante chez les patients, parfois même au sein d'une même famille (Jinnah *et al.*, 2010 ; Sampat *et al.*, 2011 ; Ceballos-Picot *et al.*, 2013). Il a été établi que la sévérité clinique des symptômes est directement corrélée à l'activité résiduelle de l'enzyme (Figure 12) (Page *et al.*, 1981 ; Hersh *et al.*, 1986 ; Puig *et al.*, 2001 ; Fu & Jinnah, 2012, Fu *et al.*, 2014ab ; Fu *et al.*, 2015).

Ainsi, la forme la moins sévère (HRH - *HGPRT-related hyperuricemia*), correspondant à une activité résiduelle située entre 10 et 90%, est caractérisée uniquement par une

hyperuricémie et ses potentielles conséquences. La forme intermédiaire (HND - *HGPRT-related neurological dysfunction*), correspondant à une activité résiduelle de l'enzyme entre 2 et 10%, présente en plus des troubles moteurs et neurologiques variables, mais sans comportement d'automutilation. La forme la plus sévère est celle que l'on appelle plus communément la MLN. Elle correspond au spectre clinique complet décrit précédemment et à une activité résiduelle inférieure à 2%.

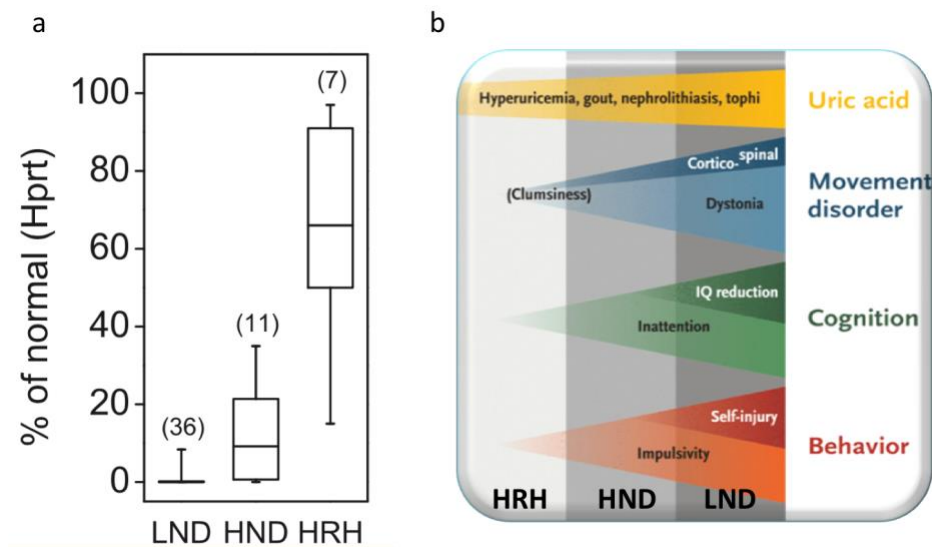


Figure 12 : Association génotype-phénotype et formes variantes de la MLN

(a) Activité HGPRT mesurée dans les érythrocytes des différents groupes, par rapport à des sujets sains. (b) Degré d'atteintes métaboliques, motrices, cognitives et comportementales en fonction des groupes. Le dosage de l'activité résiduelle de l'HGPRT a permis de classer les patients en différents sous-groupes pathologiques. La MLN (LND : *Lesch-Nyhan disease*) est la forme la plus sévère. Un groupe intermédiaire comprend les patients présentant une atteinte neurologique et une hyperuricémie associée, sans comportement d'automutilation (HND : *HPRT-related neurological dysfunction*). L'hyperuricémie isolée constitue la forme la moins sévère (HRH : *HPRT-related hyperuricaemia*) (Adapté de Fu *et al.*, 2014a).

L'âge de diagnostic est aussi corrélé à la sévérité des symptômes, les patients au phénotype complet LN étant diagnostiqués beaucoup plus tôt que ceux ne présentant que de l'hyperuricémie. De même, les formes HRH et HND ne sont liées qu'à des mutations faux-sens, permettant la traduction en une protéine moins stable mais active, alors qu'on retrouve tous les types de mutations dans la MLN (Figure 13) (Ceballos-Picot *et al.*, 2015).

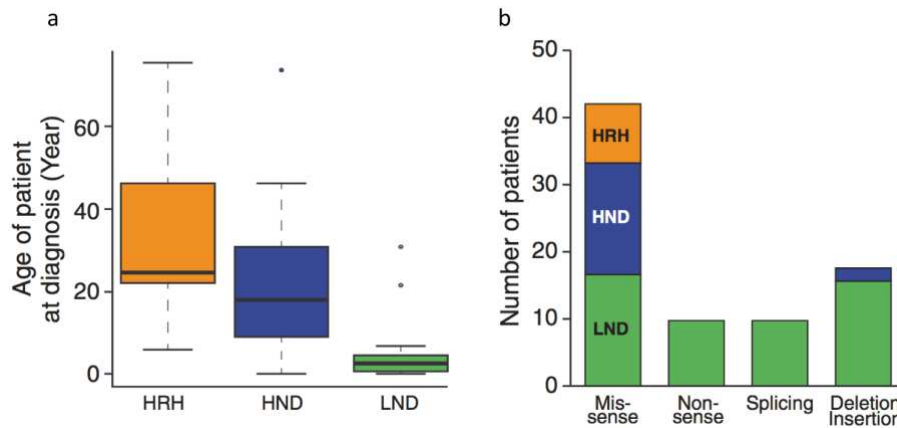


Figure 13 : Age au diagnostic et types de mutations retrouvées en fonction de la sévérité clinique des symptômes

(a) L'âge médian est représenté par la barre noire. Il est de 25 ans pour le groupe HRH, 18 ans pour le groupe HND et 3 ans pour le groupe LND. (b) Distribution des mutations du gène *HPRT1* retrouvées chez les patients HRH, HND et LND (Ceballos-Picot *et al.*, 2015).

4. Pathogenèse des troubles neurocomportementaux

Logiquement, les chercheurs se sont intéressés de plus près à comprendre l'origine des troubles neurologiques observés dans la MLN. La possibilité d'une toxicité de l'acide urique au niveau cérébral ayant été écartée par l'inefficacité de l'allopurinol à limiter les troubles neurocomportementaux, les chercheurs ont entrepris de nouvelles analyses.

4.1 Implication du système dopaminergique

- Études neurochimiques

Des preuves convaincantes de l'implication d'un dysfonctionnement des ganglions de la base, et plus particulièrement du système DAergique, dans la MLN ont été obtenues par une analyse neurochimique *post-mortem* de tissus de cerveaux (Lloyd *et al.*, 1981). Bien qu'effectuée sur seulement 3 patients, cette étude a permis de mettre en évidence une perte significative de 60 à 90% de la DA et de son métabolite d'excrétion, l'HVA, dans toutes les régions des ganglions de la base, à savoir le noyau caudé, le

putamen, le GPe, le noyau accumbens et la SN. Les activités de deux enzymes clés impliquées dans la synthèse de DA, la TH et la DDC, ont été trouvées réduites de façon similaire. Une baisse de l'immunoréactivité pour la TH a aussi été décelée au niveau de la SN de patients LN (Göttle *et al.*, 2014). Une seconde étude a pu confirmer la diminution de DA dans le noyau caudé de 2 autres patients, mais aucun effet sur l'expression de la TH n'a cette fois-ci été détecté (Saito *et al.*, 1999). Ces derniers ont par contre révélé par immunohistochimie une surexpression des récepteurs DAergiques D₁ et D₂ dans le putamen et le noyau caudé et ont mis en cause une hypersensibilité de ces récepteurs dans l'automutilation observée chez les patients. Une réduction de l'activité de la MAO dans des fibroblastes de patients a aussi été mise en évidence (Breakefield *et al.*, 1976). Enfin, des analyses biochimiques de LCR provenant de patients ont également révélé une diminution drastique de l'HVA durant les 3 premières années et s'accroissant durant l'adolescence, fournissant ainsi de nouvelles preuves d'un dysfonctionnement DAergique (Castells & Chakrabarti, 1979 ; Silverstein *et al.*, 1985 ; Jankovic *et al.*, 1988).

Un déficit en sérotonine (ou 5-hydroxytryptamine : 5-HT) avait initialement été proposé comme cause de l'automutilation car des rats ayant un niveau bas de 5-HT dans le cerveau montraient un comportement très agressif (Di Chiara *et al.*, 1971, Valzelli *et al.*, 1981). Cependant, les résultats obtenus sur le système sérotoninergique ne sont pas cohérents. Une tendance à la diminution de la 5-HT a été observée dans le noyau caudé, et des niveaux plus faibles d'acide 5-hydroxyindoleacétique (5-HIAA), un métabolite urinaire de la 5-HT, ont été repérés dans le LCR de patients LN (Castells *et al.*, 1979 ; Silverstein *et al.*, 1985 ; Harkness *et al.*, 1988 ; Saito *et al.*, 1999). En revanche, des niveaux sensiblement plus élevés de 5-HT et de 5-HIAA ont été retrouvés dans le striatum et le LCR d'autres patients (Lloyd *et al.*, 1981 ; Jankovic *et al.*, 1988). Ces incohérences peuvent indiquer que les changements observés dans le système sérotoninergique sont dus à un effet secondaire du dysfonctionnement DAergique, qui augmenterait le taux de renouvellement de la 5-HT (Nyhan *et al.*, 1980 ; Saito & Takashima, 2000).

Introduction

Les autres systèmes de neurotransmission apparaissent relativement épargnés. À part une baisse de l'activité de la choline acétyltransférase observée une fois, les systèmes glutamatergiques, GABAergiques et norépinéphriques n'ont pas montré d'altération significative ou cohérente dans le cerveau des patients LN (Rockson *et al.*, 1974 ; Lake & Ziegler, 1977 ; Lloyd *et al.*, 1981).

- Études de neuroimagerie

L'arrivée de nouvelles techniques de neuroimagerie, notamment la tomographie par émission de positons (TEP ou *PET scan* en anglais), a permis de mesurer l'intégrité des fibres DAergiques dans le cerveau de patients LN *in vivo*. Une première étude utilisant le ligand [¹¹C]WIN-35,428, un agent se liant au transporteur de la DA, a révélé une diminution de la fixation de ce ligand de 63% dans le noyau caudé et de 75% dans le putamen de 6 patients (Figure 14a) (Wong *et al.*, 1996). Ce résultat montre ainsi une diminution de la densité des transporteurs de la DA, suggérant une perte de neurones DAergiques ou une réduction des terminaisons nerveuses DAergiques chez les malades. Une seconde étude utilisant la [¹⁸F]fluorodopa, un analogue de la L-DOPA naturellement transformé en DA par la DDC, a révélé une diminution de sa transformation en [¹⁸F]fluorodopamine, de 61% dans le noyau caudé et de 69% dans le putamen de 11 patients (Figure 14b) (Ernst *et al.*, 1996). Ceci reflète une activité de la DDC diminuée, et par conséquent une synthèse de DA réduite dans les terminaux présynaptiques.

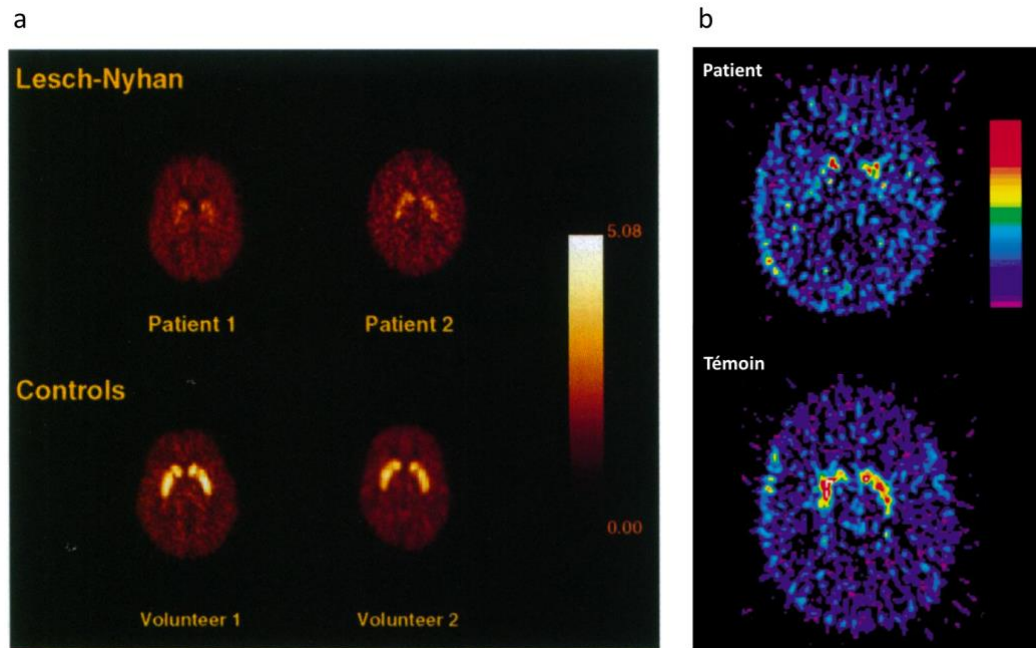


Figure 14 : Tomographie par émission de positons (TEP) sur des cerveaux de patients LN, révélant un dysfonctionnement dopaminergique

(a) Imagerie TEP du ligand [^{11}C]WIN-35,428 de deux cerveaux de patients atteints de la MLN et deux cerveaux de personnes saines, âgés de 22 ans (à droite) et 35 ans (à gauche). Ces images démontrent une réduction dramatique de la fixation du ligand sur le transporteur de DA au niveau des ganglions de la base des patients (Wong *et al.*, 1996). (b) Imagerie TEP du ligand [^{18}F]fluorodopamine d'un cerveau de patient et d'une personne en bonne santé de 20 ans. Ces images montrent une réduction de la production de fluorodopamine chez les malades LN (Ernst *et al.*, 1996).

- Études anatomiques

Les autopsies pratiquées sur les cerveaux de malades LN n'ont pas permis de révéler de problèmes histologiques ou neuroanatomiques majeurs pouvant expliquer les troubles neurologiques (Sass *et al.*, 1965 ; Crussi, 1969 ; Watts *et al.*, 1982 ; Mizuno, 1986). En particulier, aucuns signes de malformation de certaines régions cérébrales ou de dégénérescence des nDA n'ont été observés (Harris *et al.*, 1998 ; Jinnah *et al.*, 2006 ; Egami *et al.*, 2007 ; Göttle *et al.*, 2014). Deux études d'imagerie par résonance magnétique ont toutefois détecté de légères atrophies cérébrales. La première montre une réduction de 30% du volume du noyau caudé chez quelques patients LN mais cette réduction n'est pas mise en cause dans la diminution des transporteurs DAergiques (Wong *et al.*, 1996). La seconde a décelé chez 5 patients une réduction de

Introduction

17% du volume total du cerveau ainsi qu'une réduction de 34% du volume du noyau caudé et 12% du putamen (Harris *et al.*, 1998).

L'ensemble de ces études sur le cerveau et le LCR de personnes atteintes par la MLN apportent des preuves directes d'une perturbation relativement importante et sélective du système DAergique des ganglions de la base, qui serait plutôt due à une réduction du nombre ou de l'arborescence des fibres DAergiques plutôt qu'à un phénomène de neurodégénérescence.

4.2 Liens hypothétiques entre HGPRT et système dopaminergique

Malgré l'évidence d'une forte connexion entre l'HGPRT et la DA, la nature du lien permettant d'expliquer la baisse de DA détectée chez les patients LN reste énigmatique. Les fonctions connues de l'HGPRT n'ont *a priori* pas de relations directes avec la neurotransmission DAergique, donc il est probable que l'absence d'activité HGPRT influence le système DAergique indirectement, par ses conséquences sur le métabolisme des purines ou par une fonction encore inconnue de l'enzyme. Les différentes hypothèses proposées dans la littérature sont présentées ci-dessous (Visser *et al.*, 2000).

- Rôle de l'HGPRT dans les ganglions de la base

La première hypothèse avancée suggère que la vulnérabilité sélective des ganglions de la base serait due à une dépendance particulière de cette région pour la voie de recyclage des purines médiée par l'HGPRT. En effet, certaines études ont montré des niveaux plus élevés d'activité HGPRT dans cette région, en comparaison avec la voie de synthèse *de novo* (Rosenbloom *et al.*, 1967 ; Kelley *et al.*, 1969). Il pourrait donc exister un lien étroit entre cette enzyme et les ganglions de la base : une absence de recyclage des purines dans cette région pourrait entraîner un important déficit en purines si l'augmentation de leur biosynthèse ne suffit pas à compenser les pertes. Le développement des nDA s'en trouverait alors impacté. Cependant, cette hypothèse n'a

pas été supportée par les études suivantes qui ont démontrées que l'HGPRT n'était pas particulièrement enrichie dans les ganglions de la base (Boyle *et al.*, 1970 ; Adams & Harkness, 1976 ; Shin-Buehring *et al.*, 1980 ; Watts *et al.*, 1982). De surcroît, toutes les régions étudiées semblent être affectées de façon identique par la baisse d'activité de l'HGPRT dans la MLN (Boyle *et al.*, 1970). Ces résultats semblent donc réfuter la première hypothèse d'une relation directe entre l'HGPRT et les ganglions de la base.

- Rôle de l'HGPRT dans la maturation des fibres dopaminergiques

Les études anatomiques et neurochimiques présentées en amont ont conduit à l'hypothèse de l'implication spécifique d'une déficience en HGPRT dans la réduction des fibres DAergiques au niveau du circuit nigro-striatal, laissant les corps cellulaires intacts. En effet, cette hypothèse est supportée par une profonde réduction de DA et des marqueurs DAergiques dans les ganglions de la base, sans affectation du mésencéphale. Une réduction des fibres DAergiques avec préservation des corps cellulaires permettrait d'expliquer l'échec à trouver des preuves d'une dégénérescence des nDA du mésencéphale (Visser *et al.*, 2000). Cependant, cette théorie n'a jamais pu être démontrée directement et les changements observés peuvent tout à fait être dus à un dérèglement métabolique plutôt que structural.

- Rôle de l'HGPRT dans la régulation de gènes neuro-développementaux

Une piste privilégiée aujourd'hui est celle d'un rôle développemental de l'HGPRT. Son déficit conduirait à une cascade d'anomalies moléculaires à des stades précoces du développement. Notamment, plusieurs études sur des modèles cellulaires humains et murins de la MLN ont révélé des dérégulations transcriptionnelles de gènes impliqués dans le développement des nDA : *engrailed 1 et 2*, *Wnt4*, *Lmx1a/b*, *Ngn1/2*, *NeuroD*, *FoxA1*, *Msx1*, *Mash1*, *Nurr1* et *Pitx3* (Ceballos-Picot *et al.*, 2009 ; Guibinga *et al.*, 2010 ; Kang *et al.*, 2011 ; Guibinga *et al.*, 2012 ; Torres & Puig, 2015). En particulier, une étude montre que des cellules différenciées en neurones après ajout d'acide rétinoïque, et

soumises à un excès d'hypoxanthine, présentent une augmentation de l'expression de *Wnt4* et *En1*, entraînant une augmentation secondaire de la TH et des récepteurs D₁, A_{2A} et HTR₇ (récepteur de la sérotonine) dans les nDA immatures générés (Torres & Puig, 2015). Cependant, à ce jour, aucun modèle n'a réellement permis de reproduire le déroulement de la différenciation de nDA déficients en HGPRT afin de vérifier l'implication chronologique de chaque gène, et des modèles *in vivo* seraient nécessaires pour conforter cette hypothèse.

- Rôle de l'HGPRT dans la neurotoxicité métabolique

Nous avons vu précédemment que l'absence d'activité HGPRT induit des altérations du métabolisme des purines. Un effet délétère des métabolites s'accumulant dans la MLN a donc été évoqué comme cause possible des dérégulations DAergiques, comme l'acide urique, l'hypoxanthine, la xanthine, le PRPP et l'AICAR. Plusieurs évidences ont montré que l'accumulation d'acide urique ne serait pas mise en cause. Premièrement, les concentrations d'acide urique retrouvées dans le LCR de patients sont normales voire légèrement augmentées mais n'indiquent pas que le cerveau soit exposé à des concentrations excessives, probablement car la XO est peu exprimée dans le cerveau donc une accumulation d'hypoxanthine et de xanthine est prépondérante (Rosenbloom *et al.*, 1967). Deuxièmement, une accumulation d'acide urique est retrouvée dans d'autres troubles métaboliques, dont la forme variante HRH, sans pour autant que des problèmes neurologiques soient notés. Troisièmement et comme déjà mentionné dans la partie C.2.1, la prévention de l'hyperuricémie par l'administration d'allopurinol ne permet pas d'atténuer la sévérité ou de retarder la progression des symptômes neurologiques chez les personnes atteintes de la MLN.

L'accumulation d'hypoxanthine et de xanthine a également été proposée comme contribuant à la pathogenèse de la MLN par leur fixation aux récepteurs aux benzodiazépines dans le cerveau, dérégulant la balance entre systèmes GABAergiques et DAergiques (Skolnick *et al.*, 1978 ; Dasheiff, 1980 ; Kish *et al.*, 1985). D'autres

métabolites s'accumulant comme le PRPP et l'AICAR mono et triphosphates (ZMP et ZTP) pourraient aussi y contribuer (Rosenbloom *et al.*, 1968 ; Wood *et al.*, 1973 ; Reem, 1975 ; Sidi & Mitchell, 1985 ; Ceballos-Picot *et al.*, 2015). Cependant, il n'y a pour l'instant pas assez de preuves expérimentales indiquant que ces molécules seraient toxiques pour le cerveau. Une autre théorie propose que l'accumulation d'histamine soit la cause du dysfonctionnement des ganglions de la base dans la MLN mais aucune évidence n'existe non plus à ce jour (Neychev & Mitev, 2004).

La vulnérabilité des nDA au stress oxydatif étant bien connue grâce aux travaux sur la MP, une association entre la déficience en HGPRT et la diminution de la DA via l'élévation du stress oxydatif a été avancée. Celui-ci proviendrait notamment de l'augmentation de l'activité de la XO qui génère des radicaux libres et d'une demande en énergie accrue par les mitochondries, source intracellulaire majeure d'espèces oxydantes, pour subvenir à l'augmentation de la synthèse *de novo* des purines induite par le déficit en HGPRT (Beal, 1995 ; Cantu-Medellin & Kelley, 2013). Toutefois, l'augmentation des taux d'acide urique a plutôt une action anti-oxydante, et il n'y a à ce jour aucunes preuves d'une augmentation de stress oxydatif dans la MLN.

- Rôle de l'HGPRT dans la déplétion des nucléotides à guanine

La possibilité d'une déplétion des nucléotides à guanine comme cause de la pathogenèse de la MLN a été avancée par plusieurs équipes (Watts, 1985 ; Curto *et al.*, 1998). Il a été montré que le déficit en HGPRT, enzyme habituellement nécessaire à la production de GMP, induit une diminution de GTP dans des érythrocytes et lymphoblastes de patients et des neuroblastomes déficients en HGPRT (Sidi & Mitchell, 1985 ; McCreanor *et al.*, 1987 ; Fairbanks *et al.*, 2002 ; Shirley *et al.*, 2007). Les chercheurs ont donc suggéré qu'un déficit en GTP pourrait avoir des conséquences sur le système DAergique. En effet, le GTP est le substrat de l'enzyme GTP cyclohydroxylase qui catalyse la première étape limitante de la synthèse d'une ptérine, la BH₄, cofacteur essentiel à la synthèse de L-DOPA par la TH. Un déficit en GTP

Introduction

entraînerait donc indirectement une moindre synthèse de DA via une déficience en BH4 (Figure 15). Même si cette hypothèse semble attractive, plusieurs résultats ne la corroborent pas. Les niveaux de BH4 dans le LCR et les urines n'apparaissent pas réduits chez les patients (Sebesta *et al.*, 1991). De plus, la BH4 est également impliquée dans la synthèse de la sérotonine et de la norépinéphrine mais ces neurotransmetteurs ne sont pas affectés drastiquement dans la MLN. Enfin, une administration de BH4 aux patients n'a montré aucun effet sur les symptômes neurologiques (Manzke *et al.*, 1986).

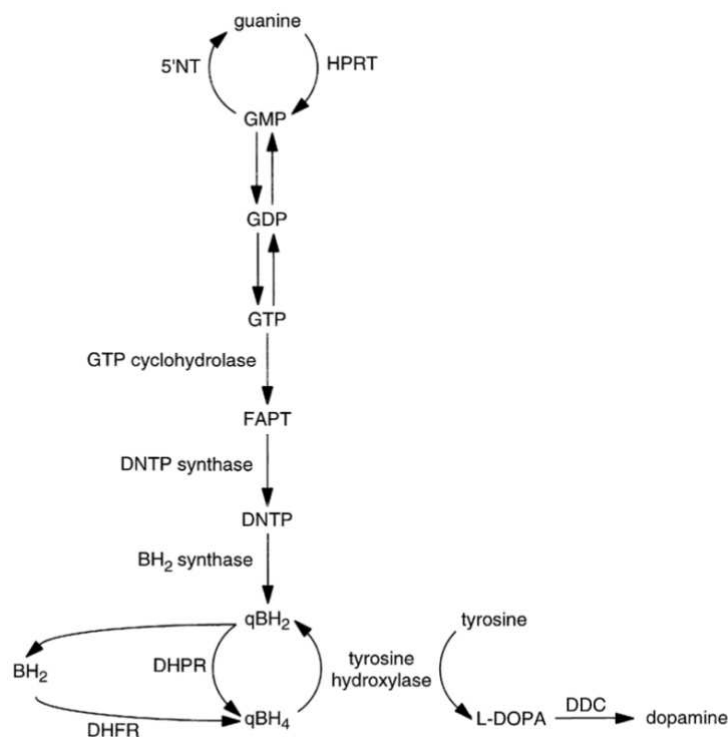


Figure 15 : Voie de synthèse du BH4 potentiellement perturbée et mise en cause dans la pathogenèse de la MLN

Cette figure montre un lien hypothétique entre le déficit en HGPRT et la diminution de synthèse de DA. Le GTP est le précurseur de la synthèse d'une ptéridine, la BH4 (tétrahydrobioptérine). La BH4 est le cofacteur de la TH et permet donc la synthèse de L-DOPA, convertie ensuite en DA par la DDC. En absence d'activité HGPRT, le déficit en GTP provoquerait un déficit en BH4, et donc une moindre synthèse de DA (Visser *et al.*, 2000).

Un déficit en GTP pourrait également altérer la transduction du signal DAergique médié par les protéines G dans le cerveau (Gilman, 1987 ; Birnbaumer, 1990). En effet,

le GTP se lie à des sous-unités des protéines G et stimule l'AC qui activera ou inhibera l'AMPc. Comme décrit dans la partie A.5, la signalisation médiée par les récepteurs DAergiques requiert l'AMPc. Une dérégulation de l'AC, incapable de jouer son rôle de messenger secondaire, pourrait donc induire des défauts neurologiques. Une étude montre ainsi un défaut de stimulation de l'activité AC par le GTP dans des fibroblastes humains et des neuroblastomes de rat déficients en HGPRT (Pinto & Seifert, 2006). D'autres travaux montrent une dérégulation de la voie AMPc-PKA (Guibinga *et al.*, 2013). Cependant, de nombreux neurotransmetteurs, neuropeptides et récepteurs hormonaux sont couplés aux protéines G donc une dysfonction DAergique spécifique paraît peu probable. De plus, la majorité des protéines G couplées aux récepteurs DAergiques est localisée dans les neurones striataux post-synaptiques, alors que l'on observe plutôt un dysfonctionnement des terminaisons DAergiques présynaptiques (Visser *et al.*, 2000).

- Rôle de l'HGPRT dans la déplétion des nucléotides à adénine

L'HGPRT est une enzyme bifonctionnelle qui permet aussi le recyclage d'hypoxanthine en IMP, précurseur de l'AMP. Il a donc été proposé qu'une absence d'HGPRT pourrait entraîner plus indirectement une diminution des nucléotides à adénine. Une étude montre d'ailleurs que la sévérité clinique associée à l'activité résiduelle de l'HGPRT corrèle mieux avec le recyclage de l'hypoxanthine que celui de la guanine, suggérant que la déplétion des nucléotides à adénine jouerait un rôle plus important que ceux à guanine dans la pathogenèse (Page *et al.*, 1981). Une diminution drastique d'ATP a été décelée dans des lymphoblastes et globules rouges de patients LN (Lommen *et al.*, 1971 ; McCreanor *et al.*, 1987, McCreanor & Harkness, 1995 ; Ceballos-Picot *et al.*, 2015). L'accélération secondaire de la synthèse *de novo*, fortement dépendante d'énergie, pourrait expliquer de surcroît cette réduction. Une déplétion d'ATP peut entraîner des dysfonctionnements neurologiques par altération des processus dépendants d'énergie ou des réactions biochimiques dont il est le cofacteur. Une réduction d'ATP semble aussi entraîner une diminution de l'activité de la poly(ADP-

ribose) synthétase, impliquée dans la réparation de l'ADN (McCreanor & Harkness, 1995). Enfin, il a été proposé qu'une diminution d'ATP peut interférer dans l'import des neurotransmetteurs, comme la DA, dans leurs vésicules synaptiques (Yeh *et al.*, 1998 ; Visser *et al.*, 2000). En effet, l'importation des monoamines via le transporteur VMAT est un processus dépendant de l'ATP, comme décrit dans la section A.4.2. La DA alors non stockée pourrait diffuser dans le cytosol et entraîner une cytotoxicité au sein des nDA en s'oxydant (Fahn & Cohen, 1992 ; Stokes *et al.*, 1999).

L'adénosine étant un dérivé non phosphorylé de l'ATP et jouant un rôle important de neuromédiateur dans le SNC, une hypothèse consiste également à penser qu'une diminution en adénosine serait impliquée dans la pathogenèse de la MLN (Figure 16) (Visser *et al.*, 2000). Notamment, des dérégulations de la concentration en adénosine pourrait impacter les récepteurs DAergiques via leurs interactions avec les récepteurs adénosinergiques, comme détaillé précédemment dans la section B.2.1. Des travaux sur des lymphocytes de patients LN ont ainsi montré une diminution des niveaux transcriptionnels et protéiques du récepteur A_{2A} (García *et al.*, 2009 ; García *et al.*, 2012) et du transport de l'adénosine à l'intérieur de la cellule (Torres *et al.*, 2004). Des expériences sur des modèles rongeurs supportent aussi l'hypothèse d'une implication de la neurotransmission adénosinergique. Une légère diminution de l'expression des récepteurs A_{2A} et une forte augmentation des récepteurs A₁ a été détectée dans le cerveau de souris déficientes en HGPRT (Bertelli *et al.*, 2005). De plus, une administration chronique de caféine, un antagoniste des récepteurs de l'adénosine, induit un comportement d'automutilation chez les rats (Ferrer *et al.*, 1982 ; Miñana *et al.*, 1984, Casas-Brugué *et al.*, 1985 ; Jinnah *et al.*, 1990). A l'inverse, une injection d'agonistes de l'adénosine permet d'empêcher l'automutilation observée dans un modèle pharmacologique de la MLN (Criswell *et al.*, 1988). Une diminution de la neurotransmission via les récepteurs de l'adénosine pourrait donc être en cause. Toutefois, le mécanisme précis liant l'adénosine à l'automutilation n'a pas été décrit et la piste adénosinergique dans la MLN est restée sans suite à ce jour.

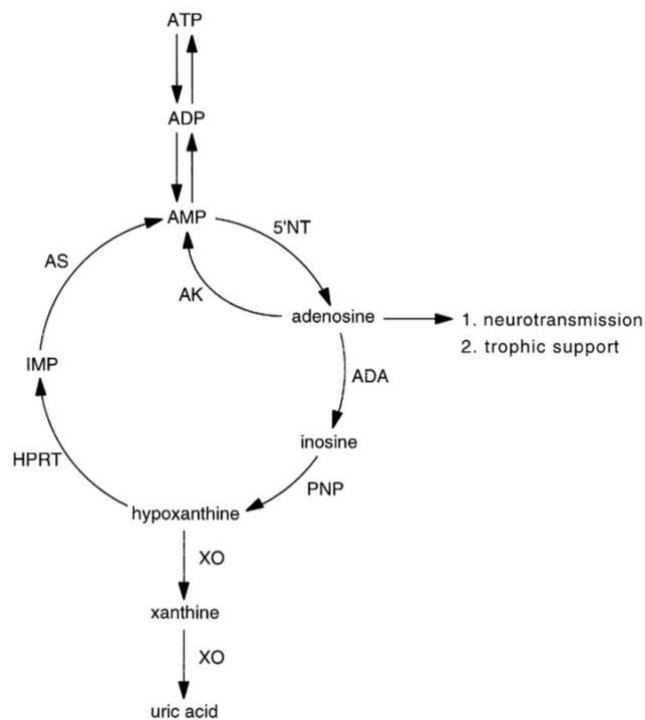


Figure 16 : Hypothèse d'une déplétion en adénosine dans la pathogenèse de la MLN

Le métabolisme de l'adénosine pourrait dépendre de l'HPRT pour la réincorporation des bases puriques dans les pools de nucléotides. L'adénosine étant connue pour avoir un rôle important dans la neurotransmission et le support trophique, notamment des nDA, elle pourrait être impliquée dans la pathogenèse de la MLN (Visser *et al.*, 2000).

De nombreuses théories ont donc vu le jour pour tenter d'expliquer pourquoi un déficit en HGPRT entraînerait un dysfonctionnement DAergique et des troubles neurocomportementaux. Malheureusement après 50 années de recherche, aucune ne permet réellement de comprendre de façon certaine le ou les mécanismes impliqués, rendant le développement de thérapies très compliqué.

5. Traitements des troubles neurologiques

5.1 Pistes thérapeutiques ayant échouées

- L-DOPA et antagonistes des récepteurs DAergiques

Étant donné les nombreuses évidences d'un déficit DAergique dans la MLN, des essais d'administration de L-DOPA associée à la carbidopa ont rapidement été mis en place. La carbidopa est un inhibiteur de la DDC périphérique, utilisée dans la MP pour augmenter le taux de L-DOPA susceptible de passer la barrière hémato-encéphalique. Malheureusement, ce traitement s'est montré infructueux et a parfois même aggravé les symptômes moteurs (Watts *et al.*, 1982 ; Visser *et al.*, 2011 ; Bell *et al.*, 2016 ; Madeo *et al.*, 2019).

D'après l'hypothèse qu'une hypersensibilité des récepteurs DAergiques serait en cause dans l'automutilation, une autre piste constituant à administrer des antagonistes des récepteurs D₁ et D₂ a été explorée (Goldstein *et al.*, 1985 ; Gualtieri & Schroeder, 1989 ; Allen & Rice, 1996 ; Khasnavis *et al.*, 2016). Des essais ont été effectués avec des antagonistes sélectifs ou non des deux types de récepteurs, comme la fluphénazine, l'halobenzazépine, la rispéridone et plus récemment l'écopipam, montrant parfois une atténuation du comportement d'automutilation, plutôt liée au récepteur D₁. Malheureusement, tous les essais ont dû être stoppés prématurément à cause d'importants effets secondaires.

- Précurseur de sérotonine

Bien que certaines études soient contradictoires sur un déficit en sérotonine dans la MLN (comme mentionné en C.4.1), l'administration de 5-hydroxytryptophane (5-HTP), précurseur de la sérotonine, a été tentée. Cependant, aucun changement dans les déficits neurologiques n'a pu être observé, sauf pour l'automutilation qui semble supprimée mais l'effet n'est que temporaire (quelques semaines) et ne fonctionne plus

après une nouvelle administration (Castells *et al.*, 1979 ; Nyhan *et al.*, 1980 ; Nyhan *et al.*, 2000 ; Bell *et al.*, 2016).

- Composés puriques

Une supplémentation d'adénine a fait l'objet de quelques essais épars dans les années 70, sur un seul patient à chaque fois, sans grands résultats sur les troubles neurologiques (Felix & DeMars, 1969 ; van der Zee *et al.*, 1970 ; Schulman *et al.*, 1971 ; Benke *et al.*, 1973 ; Watts *et al.*, 1974 ; Bell *et al.*, 2016). Un autre composé, la S-adénosylméthionine (SAM), a connu des tests plus avancés après la découverte par sérendipité que son administration permettait de diminuer drastiquement l'automutilation d'un patient (Glick, 2006). La SAM est un précurseur de la synthèse d'adénosine via sa transformation en S-adénosylhomocystéine (SAH), clivée ensuite en homocystéine et en adénosine. Son effet bénéfique pourrait donc être de reconstituer un pool de nucléotides et d'adénosine. Cependant, les résultats sont partagés entre amélioration et détérioration des symptômes et n'en font donc pas une thérapie pouvant être utilisée en routine pour l'instant (Dolcetta *et al.*, 2013 ; Chen *et al.*, 2014 ; Lauber *et al.*, 2017 ; Bell *et al.*, 2016 ; Madeo *et al.*, 2019).

- Stimulation cérébrale profonde

Le lien entre la MLN et la MP étant évident, certains chercheurs ont proposé de tester la stimulation cérébrale profonde sur les patients LN. Cette technique, qui consiste à envoyer des stimulations électriques de hautes fréquences dans le noyau sous-thalamique, a déjà fait ses preuves chez les parkinsoniens en atténuant les symptômes moteurs (Groiss *et al.*, 2009 ; Fang & Tolleson, 2017). Un premier garçon LN, âgé de 19 ans, a été implanté au Japon pour initialement essayer de contrôler ses mouvements dystoniques. Après avoir reçu une stimulation chronique du globus pallidus interne, les médecins ont observé à leur plus grande surprise une disparition de l'automutilation (Taira *et al.*, 2003). Ce premier cas très prometteur a conduit à de nouvelles tentatives

réussies, aussi bien au niveau des fonctions motrices que de l'automutilation (Cif *et al.*, 2007 ; Deon *et al.*, 2012 ; Abel *et al.*, 2014 ; Piedimonte *et al.*, 2015 ; Bell *et al.*, 2016). Toutefois, cette technique mérite une attention particulière car 4 garçons inclus dans une étude récente sur des patients français et italiens ont montré de tout autres résultats. Après une amélioration des symptômes pour deux d'entre eux, tous ont présenté une aggravation entraînant l'arrêt de la stimulation, et 3 sont décédés peu de temps après (Madeo *et al.*, 2019).

5.2 « Traitements » symptomatiques actuels

A ce jour, aucun réel traitement n'existe pour stopper les troubles neurocomportementaux. Certains médicaments sont tout de même administrés aux patients en fonction des symptômes détectés et permettent de les soulager plus ou moins bien. Le plus souvent, des dispositifs médicaux adaptés sont mis en place, comme des fauteuils roulants particuliers et des contentions, gouttières ou gants pour limiter l'automutilation. Ces traitements sont résumés dans le tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3 : Résumé de la prise en charge et des traitements symptomatiques ou dispositifs mis en place à ce jour pour améliorer les conditions de vie des patients atteints de la MLN

(Tiré en partie des informations fournies par Madeo *et al.*, 2019 et Orphanet « Syndrome de Lesch-Nyhan ».)

Troubles	Traitements
Hyperuricémie	Allopurinol ou febuxostat
Dysarthrie / Dysphagie	Rééducation
Sommeil / Humeur	Benzodiazépines - Antidépresseurs - Anxiolytiques
Motricité (marche)	Dispositifs médicaux : fauteuils roulants
Dystonie / Spasticité	Médicaments : soulagées par benzodiazépines (diazépam, alprazolam) et inhibiteur de GABA (baclofène, tizanidine) (Pozzi <i>et al.</i> , 2014) Injection de toxine botulique (Dabrowski <i>et al.</i> , 2005) Dispositifs médicaux : soutiens de posture
Épilepsie	Anti-épileptiques (valproate, carbamazépine, gabapentine)
Automutilation	Dispositifs médicaux : dispositifs de protection des mains, gouttières dentaires, contention Thérapie comportementale Médicaments : soulagée par gabapentine (McManaman & Tam, 1999) et carbamazépine

6. Modèles de la MLN

Afin d'essayer de mieux comprendre l'origine des troubles neurologiques de la MLN et trouver de potentielles cibles thérapeutiques, plusieurs modèles ont été construits et étudiés : des modèles cellulaires issus de patients ou génétiquement modifiés pour être déficients en HGPRT et des modèles animaux génétiques ou pharmacologiques. Ces modèles tentent de reproduire les défauts biochimiques et/ou phénotypiques, chacun ayant certaines limitations.

6.1 Modèles cellulaires

Étant donné la rareté de la MLN et la difficulté à acquérir des tissus neuronaux humains, les premiers modèles cellulaires étudiés ont été des cellules non-neurales extraites de patients, comme des érythrocytes, des lymphocytes et des fibroblastes (Rosenbloom *et al.*, 1968 ; Raivio & Seegmiller, 1973 ; Wood *et al.*, 1973 ; Reem, 1975 ; Shin-Buehring *et al.*, 1980 ; Sidi *et al.*, 1985). Ces cellules sont encore couramment utilisées, notamment pour poser le diagnostic de la MLN (Ceballos-Picot *et al.*, 2015). Cependant, même si elles sont d'une grande pertinence car directement prélevées des personnes atteintes de la MLN, elles ne peuvent être utilisées pour étudier les déficits neurologiques.

Un modèle plus proche de la maladie a été construit par isolation de cellules souches neurales du cerveau de fœtus avortés LN (Cristini *et al.*, 2010). Celui-ci a permis de mettre en évidence une dérégulation de facteurs de transcription impliqués dans la neurogenèse et un déficit de croissance des neurites, suggérant un rôle de l'HGPRT dans le développement neuronal. Toutefois, ces cellules sont extrêmement rares et les neurones obtenus ne permettent pas d'étudier une population ciblée de nDA. Le processus de différenciation de cultures primaires de neurones en nDA a été étudié sur d'autres populations neuronales provenant de souris KO pour l'HGPRT (Smith & Friedmann, 2000 ; Boer *et al.*, 2001 ; Kang *et al.*, 2013 ; Kang & Friedmann, 2015). Une expression aberrante de multiples gènes et une croissance anormale des dendrites ont été observées dans ces modèles. Une étude sur une culture primaire d'astrocytes provenant de souris KO pour l'HGPRT a aussi confirmé les dérégulations métaboliques associées à l'absence d'activité HGPRT comme une accumulation d'hypoxanthine, de guanine et de PRPP, une accélération de la synthèse *de novo* et des concentrations réduites d'ATP et de GTP (Pelled *et al.*, 1999).

De nombreuses lignées génétiquement modifiées pour être déficientes en HGPRT ont été construites à partir de neuroblastomes ou de gliomes humains, de souris ou de

rats : les cellules C1 et C6-16 (Skaper & Seegmiller, 1976), B103 (Zoref-Shani *et al.*, 1993 ; Pinto & Seifert, 2006), Neuro-2a (Pinto & Seifert, 2006), SK-N-BE(2) M17 (Shirley *et al.*, 2007), MN9D (Lewers *et al.*, 2008), et SH-SY5Y (Kang *et al.*, 2011 ; Guibinga *et al.*, 2012). Ces modèles ont permis d'étudier les conséquences d'un déficit en HGPRT sur le métabolisme des purines, la signalisation cellulaire, la morphologie des neurones, mais aussi les taux de monoamines. Entre autres, ils ont pu confirmer un déficit DAergique (Shirley *et al.*, 2007 ; Lewers *et al.*, 2008). Bien que d'origines neurales, ces cellules ont été obtenues sur des tumeurs de patients non atteints par la MLN, et ne possèdent donc pas la mutation *HPRT* de façon naturelle.

Une autre catégorie de cellules a été utilisée, les cellules PC12 provenant de phéochromocytomes de rats, une tumeur de la médullosurrénale (Bitler *et al.*, 1986 ; Yeh *et al.*, 1998) et les cellules NT2, cellules embryonnaires issues de carcinomes testiculaires humains (Guibinga *et al.*, 2010 ; Torres & Puig, 2015). Tandis que les cellules PC12 n'ont pas montré de défauts DAergiques, les cellules NT2 ont permis de mettre en évidence des dérégulations évidentes des marqueurs DAergiques incluant les enzymes TH et DDC, le transporteur VMAT et le récepteur D₁.

Enfin, une récente étude concernant l'identification de molécules potentiellement thérapeutiques issues d'un criblage à haut débit sur des fibroblastes de patients propose de valider les cibles identifiées sur des neurones issus de cellules souches pluripotentes induites de patients LN (Augé *et al.*, 2016). Cependant, aucun résultat sur ces cellules n'a encore été publié.

Malgré de précieuses informations fournies par ces modèles *in vitro* sur les mécanismes pouvant être impliqués dans la pathogenèse de la MLN, l'utilisation de cellules en culture limite les champs d'études possibles, notamment sur le plan des interactions cellulaires et comportementales. Des modèles *in vivo* ont donc été développés, à la fois pour vérifier les effets métaboliques et biochimiques observés

dans les modèles cellulaires, mais aussi pour étudier d'autres phénotypes, en particulier neurocomportementaux.

6.2 Modèles animaux

Les modèles animaux construits ont été d'une part des modèles génétiques, tâchant de reproduire les mutations de l'*HPRT*, et d'autre part des modèles pharmacologiques, tentant de retrouver des phénotypes de la MLN par altération de la neurotransmission DAergique (Jinnah *et al.*, 1990).

- Modèles génétiques

Les souris KO HPRT

Le premier modèle génétique *in vivo* de la MLN, construit en 1987, était un modèle de souris KO pour le gène *HPRT1*, sans activité résiduelle de l'enzyme (Doetschmann *et al.*, 1987 ; Hooper *et al.*, 1987 ; Kuehn *et al.*, 1987). Les analyses métaboliques de ce modèle ont confirmé une accélération de la synthèse *de novo* (4 à 5 fois) mais par ailleurs les niveaux de purines (hypoxanthine, guanine, acide urique, ATP, GTP...) ont été retrouvés normaux (Jinnah *et al.*, 1993). Les souris possédant l'enzyme urate oxydase (ou uricase), capable de dégrader l'acide urique en allantoiné, il est logique qu'aucune hyperuricémie n'ait été détectée. Les analyses biochimiques ont par contre permis de mettre en évidence un déficit DAergique dans les ganglions de la base, néanmoins moindre que chez l'Homme (20 à 60% selon les études) (Finger *et al.*, 1988 ; Dunnett *et al.*, 1989 ; Jinnah *et al.*, 1994 ; Egami *et al.*, 2007 ; Tschirner *et al.*, 2015). De plus, le système DAergique semble aussi être affecté de façon spécifique car les autres systèmes de neurotransmission paraissent normaux (Dunnett *et al.*, 1989 ; Jinnah *et al.*, 1994 ; Tschirner *et al.*, 2016). Ce modèle a également permis de conforter l'hypothèse que la diminution de DA serait due à un défaut biochimique plutôt qu'anatomique, car des études immunohistochimiques sur des coupes de

mésencéphale ont révélé une distribution et une morphologie normales des nDA (Egami *et al.*, 2007).

En revanche, les tests moteurs et neurocomportementaux effectués sur ces souris n'ont montré aucun défaut neurologique notable (Finger *et al.*, 1988). Il est possible que des mécanismes compensatoires absents chez l'Homme leur permettent de réguler plus efficacement les niveaux de purines et la synthèse de neurotransmetteurs. Une étude suggère également que la souris recyclerait peu l'hypoxanthine, et donc qu'elle dépendrait moins de cette voie pour maintenir un niveau acceptable de purines (Moyer & Henderson, 1983). Ce modèle a donc soulevé beaucoup de questions quant à son intérêt en tant que modèle de la MLN. Il reste utile pour étudier les défauts métaboliques et neurochimiques associés à une absence d'activité HGPRT, mais n'est pas pertinent pour comprendre le lien entre HGPRT et troubles neurologiques.

Les souris KO HPRT/APRT

Les souris semblant être plus tolérantes que l'Homme à une absence d'activité HGPRT, une équipe a soumis l'hypothèse qu'elles étaient peut-être plus dépendantes de l'APRT, la seconde enzyme de la voie de synthèse des purines recyclant l'adénine en AMP (Wu & Melton, 1993). En administrant un inhibiteur de l'APRT, la 9-éthyladénine, aux souris déficientes en HGPRT, les expérimentateurs ont alors pu observer qu'elles s'infligeaient des blessures par un toilettage excessif. Pourtant, suite à ce résultat encourageant, un nouveau modèle de souris double KO HPRT/APRT a été construit et n'a pas pu confirmer l'apparition d'un comportement d'automutilation (Engle *et al.*, 1996b). Par contre, ces souris, tout comme les souris KO pour l'APRT seule (Engle *et al.*, 1996a), présentaient une accumulation de 2,8-DHA dans les urines, un composé très insoluble produit par un excès d'adénine et associé à un déficit en APRT chez l'Homme.

Introduction

Un second modèle modifié de souris KO pour l'HPRT a été généré par expression transgénique du gène humain *PRTFDC1* (*phosphoribosyltransferase domain containing 1*), un paralogue de l'HPRT dont le gène est fonctionnel chez l'Homme mais inactivé chez la souris (Keebaugh *et al.*, 2011). Bien que ce modèle ait montré de façon intéressante l'apparition d'un comportement agressif et de stéréotypies, aucune étude n'y a pour l'instant donné suite.

Les chimères souris/rat KO HPRT

Devant l'incapacité à reproduire les troubles neurocomportementaux associés à un déficit en HGPRT chez la souris, une équipe a proposé de développer un modèle chimère souris/rat (Isotani *et al.*, 2016). Pour se faire, des cellules embryonnaires de rats modifiées pour l'HPRT ont été injectées dans des blastocytes de souris. Ce modèle novateur présente l'avantage d'être plus gros, ce qui facilite certaines opérations expérimentales et notamment les tests comportementaux. Cependant, ces chimères, maintenues en vie une année, n'ont présenté aucunes anomalies comportementales et ne peuvent donc pas non plus être utilisées pour comprendre les atteintes neurologiques de la MLN (Figure 17).



Figure 17 : Modèle de chimères souris/rats KO pour l'HPRT

A gauche, photo d'un rat avec *HPRT*, à droite un rat sans *HPRT*. Aucune différence n'a été observée entre les deux, ni aucun comportement autodestructeur chez le rat sans *HPRT* (Isotani *et al.*, 2016).

Les rats KO HPRT

La même année, un modèle de rat KO pour l'HPRT a pu être produit à partir de cellules souches embryonnaires modifiées (Meek *et al.*, 2016). Même si une baisse de 60% de la DA a pu être détectée dans le striatum de ces rats ainsi qu'une altération de divers métabolites, notamment lipidiques, dans le cerveau, aucun défaut neurocomportemental n'a une fois de plus pu être mis en évidence.

En conclusion, les modèles rongeurs ne constituent pas jusqu'ici de bons modèles génétiques de la MLN. Bien qu'une baisse de DA soit observée, aucun ne permet de reproduire les manifestations neurologiques associées à un déficit en HGPRT. Les chercheurs se sont donc tournés vers des modèles phénotypiques en altérant directement les nDA des animaux.

- Modèles pharmacologiques

Les rats 6-OHDA

En 1972, Breese et Traylor ont mis au point un modèle de la MP consistant à administrer dans le cerveau de rats nouveaux-nés de la 6-hydroxydopamine (6-OHDA), une neurotoxine détruisant sélectivement les nDA (Breese & Traylor, 1972). Ce modèle permettait bien de réduire efficacement les niveaux de DA dans le SNC. Ils se sont aperçus quelques temps plus tard que l'administration de L-DOPA ou d'apomorphine, des agonistes de la DA, à ces rats devenus adultes déclenchaient un comportement d'automutilation (Breese *et al.*, 1984 ; Breese *et al.*, 1990 ; Breese *et al.*, 2005 ; Knapp & Breese, 2016). Par inadvertance, ils avaient créé un modèle de rat avec des symptômes de la MLN, démontrant l'implication de la DA dans le comportement d'automutilation. De plus, l'apparition de ce comportement était totalement bloquée après administration d'un antagoniste DAergique des récepteurs D₁, ce qui n'était pas le cas avec un antagoniste D₂. Ceci a confirmé l'hypothèse consistant à penser que l'activation des récepteurs D₁, plutôt que D₂, serait en cause dans l'apparition

Introduction

d'automutilation chez les enfants LN. De façon intéressante, l'âge des rats au moment de l'administration de la 6-OHDA était déterminant car des rats adultes recevant la molécule ne présentaient pas d'automutilation. Ces chercheurs ont également observé que l'administration de 5-HTP n'induisait pas ce trouble, démontrant ainsi que la sérotonine ne serait pas responsable du déclenchement de l'automutilation, contrairement à ce qui avait pu être avancé auparavant.

Les singes dénervés

De même, un modèle similaire d'hypersensibilité DAergique a été créé chez le singe. Un comportement d'automutilation et une spasticité ont été observés après administration d'agonistes de la DA à des singes ayant subi une intervention chirurgicale unilatérale de l'aire tegmentale ventrale, résultant en une dénervation des nDA des voies nigrostriatales (Goldstein *et al.*, 1986).

Cependant, bien que ces modèles permettent d'attester d'un lien entre dérégulation DAergique et automutilation, ils ne possèdent pas le défaut génétique de base de la MLN. Ils ne peuvent donc constituer de bons outils pour répondre à la question de la relation entre le déficit en HGPRT et la diminution de DA observée chez les malades (Bell *et al.*, 2016), d'autant plus que l'activité HGPRT a été retrouvée normale dans le striatum des rats traités à la 6-OHDA (Goldstein *et al.*, 1986 ; Criswell *et al.*, 1988). De ce fait, ce ne sont aussi pas de bons modèles prédictifs de la maladie chez l'Homme, c'est-à-dire qu'une drogue permettant de corriger le phénotype d'automutilation chez ces animaux ne fonctionnera peut-être pas de la même façon chez des patients dépourvus d'HGPRT.

A ce jour, aucun modèle cellulaire ou animal n'est capable de récapituler l'ensemble des caractéristiques de la MLN. Les résultats expérimentaux obtenus sont donc difficilement extrapolables à l'Homme et les causes exactes des troubles neurocomportementaux n'ont toujours pas été établies. La mise au point de nouveaux modèles *in vivo* permettant d'approfondir notre compréhension de ce syndrome

constitue un enjeu majeur. C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser la drosophile et ses nombreux avantages afin d'explorer aussi bien les aspects cellulaires que moléculaires et comportementaux de la MLN.

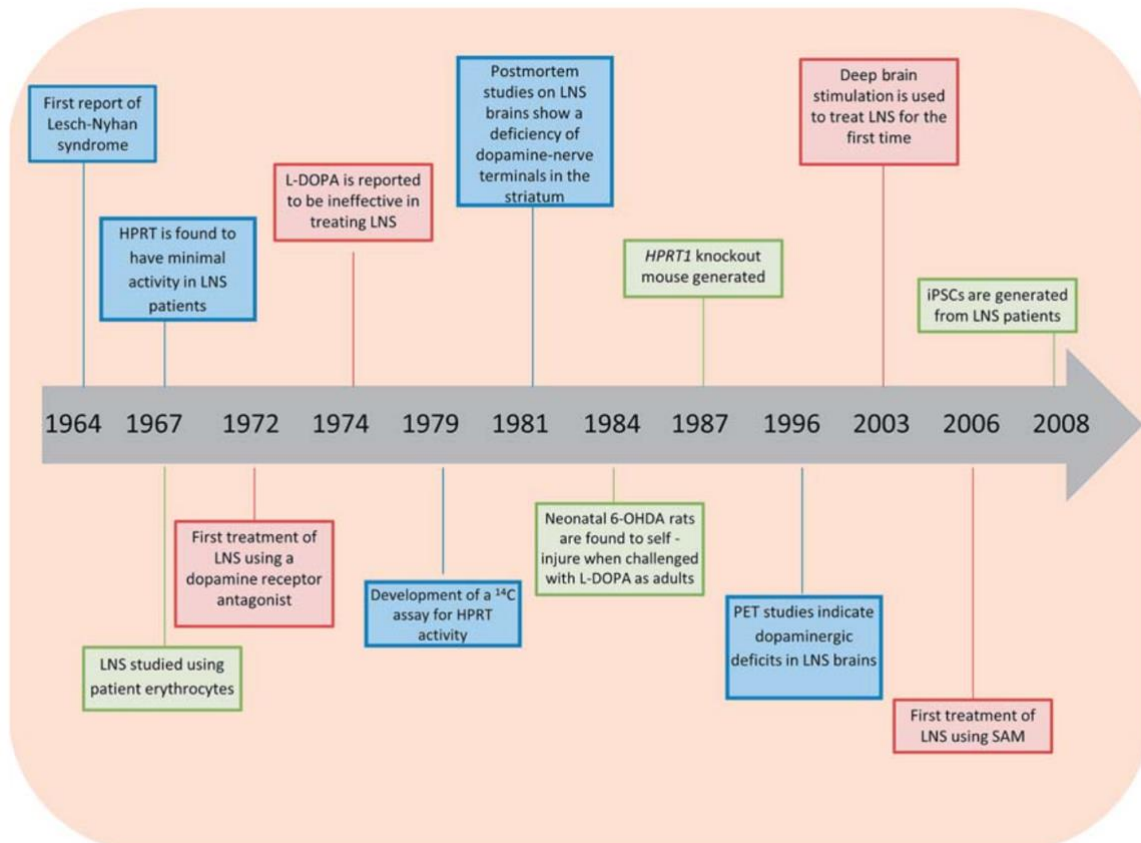


Figure 18 : Chronologie des étapes importantes de la recherche sur la MLN

Les études relatives à l'étiologie, aux traitements, et à la génération de modèles de la MLN sont mises en évidence en bleu, rouge et vert, respectivement (Bell *et al.*, 2016).



D. La drosophile comme modèle d'étude

1. Historique et généralités

C'est un entomologiste américain, Charles W. Woodworth, qui proposa pour la première fois en 1900 d'utiliser la drosophile (*Drosophila melanogaster*) comme organisme modèle pour la recherche en génétique (Ugur *et al.*, 2016). Au même moment, Thomas Hunt Morgan, désirant confirmer sur l'animal la théorie de l'hérédité avancée par Mendel grâce à sa génétique des pois, recherchait un modèle capable d'être élevé dans un espace réduit, à la reproduction rapide et à faibles coûts. Il utilisa alors la drosophile, appelée aussi mouche du vinaigre, et parvint à identifier le gène *white*, gouvernant le caractère des « yeux blancs ». Grâce à cette découverte, il mit en évidence les lois de l'hérédité chez l'animal et révéla l'importance des chromosomes dans ces mécanismes (Morgan, 1910).

La drosophile n'a depuis cessé d'être utilisée dans le monde de la recherche, en raison notamment de ses nombreux avantages (Bellen *et al.*, 2010). Premièrement, sa petite taille, son cycle de développement très court (10 jours à 25°C, Figure 19) et sa grande capacité de reproduction (une femelle peut pondre plusieurs centaines d'œufs) permettent d'obtenir rapidement une descendance et de maintenir en vie un grand nombre d'individus dans un espace restreint, ce qui limite les coûts d'investissement. Son espérance de vie de 60-80 jours permet également d'effectuer des études de vieillissement beaucoup plus rapidement que chez des modèles murins (Grotewiel *et al.*, 2005). Deuxièmement, la totalité de son génome a été décrite (Adams *et al.*, 2000). Celui-ci étant plus réduit que celui de l'Homme (environ 13 600 gènes contre 20 à 25 000 chez l'Homme), une moindre redondance permet d'interpréter plus facilement les résultats de perte ou de gain de fonction des gènes. De plus, environ 75% des gènes impliqués dans des maladies humaines ont un orthologue fonctionnel chez la drosophile (Reiter *et al.*, 2001 ; Yamamoto *et al.*, 2014) ce qui lui confère la capacité d'être un bon modèle de nombreuses pathologies.

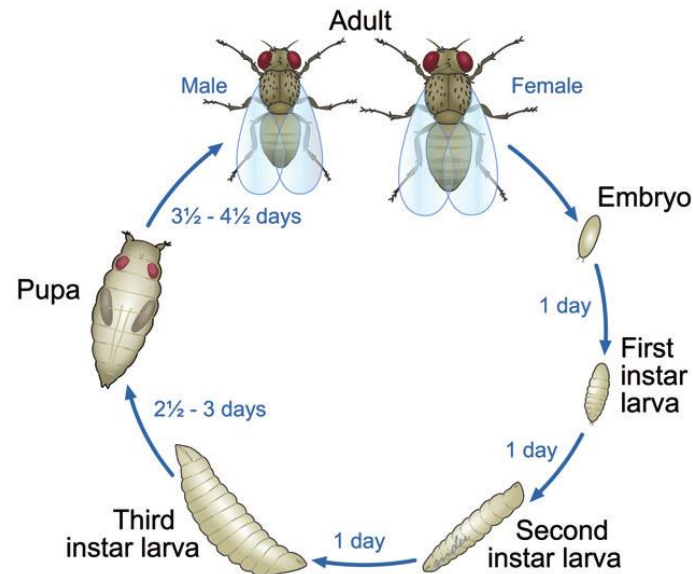


Figure 19 : Le cycle de développement de la drosophile

Les phases développementales de la drosophile comprennent un stade embryonnaire, 3 stades larvaires, un stade pupal et un stade adulte. Les temps indicatifs entre chaque stade correspondent à un élevage à 25°C. 10 jours sont nécessaires à cette température pour obtenir une nouvelle génération d'adultes (Ong *et al.*, 2015).

Troisièmement, la plupart des organes internes de drosophile sont fonctionnellement analogues à ceux de l'Homme (Figure 20) : elle possède un cœur, une musculature sophistiquée, un système tubulaire (trachées) analogue aux poumons, un système digestif, un système analogue au foie (les corps gras), un système excrétoire (tubes de Malpighi) analogue au rein, et un système nerveux complexe et sophistiqué composé de neurones et de cellules gliales protégés par l'équivalent d'une barrière hémato-encéphalique (Buchon *et al.*, 2014 ; Perrimon *et al.*, 2016).

Enfin, les grandes fonctions physiologiques sont conservées chez la drosophile, ce qui permet d'étudier facilement un grand nombre de comportements : la locomotion (Jordan *et al.*, 2006 ; Sun *et al.*, 2018b), le sommeil (Seugnet *et al.*, 2009a), l'apprentissage et la mémorisation (Quin *et al.*, 1974), le comportement de cour et la reproduction (Hall, 1977 ; Ewing, 1983), l'agressivité (Baier *et al.*, 2002), ou encore l'épilepsie (Song & Tanouye, 2008).

Introduction

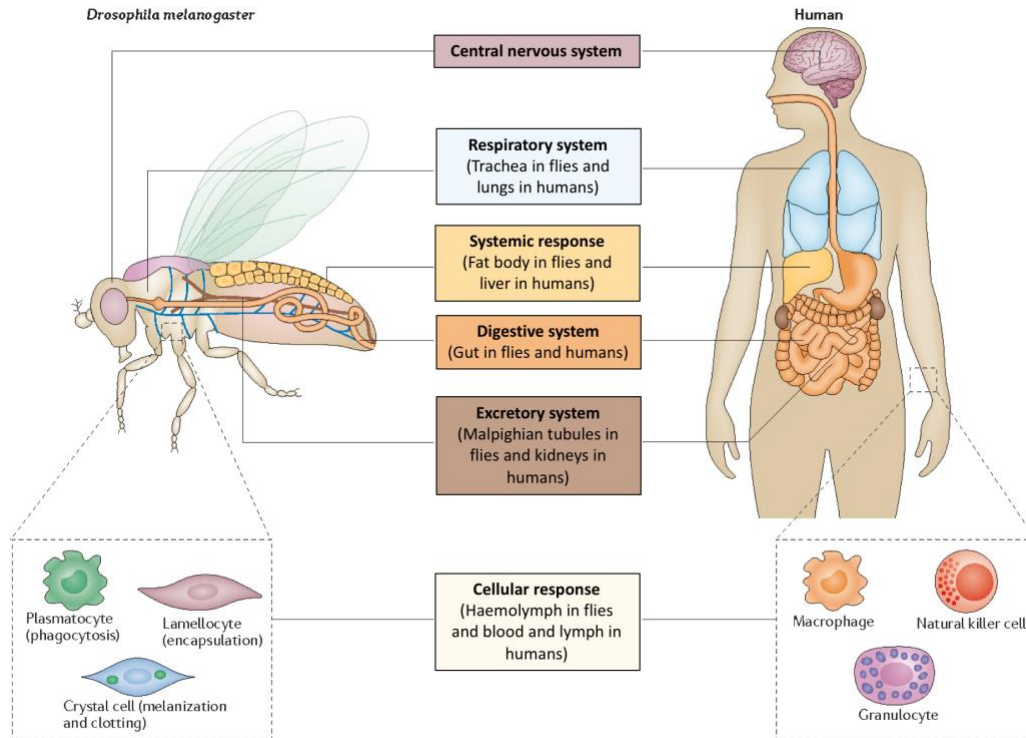


Figure 20 : Analogie entre organes de *Drosophila melanogaster* et de l'Homme (Adapté de Buchon et al., 2014)

2. Outils génétiques

Étant donné son utilisation croissante depuis plus de 100 ans, de nombreux outils génétiques sophistiqués ont été développés pour ce modèle dans le but d'éditer ou de manipuler l'expression des gènes afin de comprendre leurs fonctions ainsi que les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans des pathologies humaines (Beumer & Carroll, 2014 ; Venken *et al.*, 2016 ; Sentürk & Bellen, 2018).

2.1 Outils d'édition du génome

Trois classes d'enzymes sont généralement utilisées pour éditer le génome : des recombinases, des intégrases et des nucléases. Il est possible d'induire des mutations par délétion (KO) ou d'insérer de nouveaux transgènes par *knock-in* (KI) grâce à la technique d'excision et transposition d'éléments transposables (élément P, PiggyBac ou autres) (Voelker *et al.*, 1984 ; Thibault *et al.*, 2004) et à la recombinaison

homologue. Deux systèmes principaux de recombinaison fonctionnant de façon similaire sont couramment utilisés chez la drosophile, le système FLP-FRT (*FLP recombinase recognition target*) (Theodosiou & Xu, 1998) et le système bactériophage PhiC31, une intégrase (Bischof *et al.*, 2007). De nouvelles technologies d'édition du génome permettent de cibler plus spécifiquement les gènes : les nucléases *zinc-finger* (ZFNs) (Bibikova *et al.*, 2002), les nucléases *transcription activator-like effector* (TALENs) (Liu *et al.*, 2012b), et plus récemment les nucléases Cas9 associées aux *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR/Cas9) (Bassett *et al.*, 2013). Cette dernière technique permet notamment de couper très précisément le double brin d'ADN à n'importe quel emplacement complémentaire d'un ARN guide.

2.2 Le système UAS-Gal4

Un outil génétique puissant et largement utilisé depuis qu'il a été développé en 1993 est le système d'expression bipartite UAS-Gal4 (Brand & Perrimon 1993). Ce système permet l'expression ciblée d'un gène dans un tissu ou type cellulaire donné. Une première lignée parentale, nommée « pilote d'expression » ou *driver*, contient un promoteur d'expression spécifique placé en amont du gène codant pour le facteur de transcription de levure Gal4. Une seconde lignée parentale « effectrice » est constituée du transgène d'intérêt en aval d'une séquence UAS (*Upstream activating sequence*), séquence d'ADN répétée liant spécifiquement la protéine Gal4. Le croisement de ces deux lignées permet d'obtenir dans la descendance l'expression du transgène seulement dans les cellules ciblées par le promoteur, c'est-à-dire où le Gal4 est traduit et peut se lier à sa séquence activatrice (Figure 21). Le croisement des lignées parentales avec une lignée sauvage ne portant aucun de ces transposons permet d'obtenir dans la descendance les drosophiles contrôles *driver* et effecteur.

Introduction

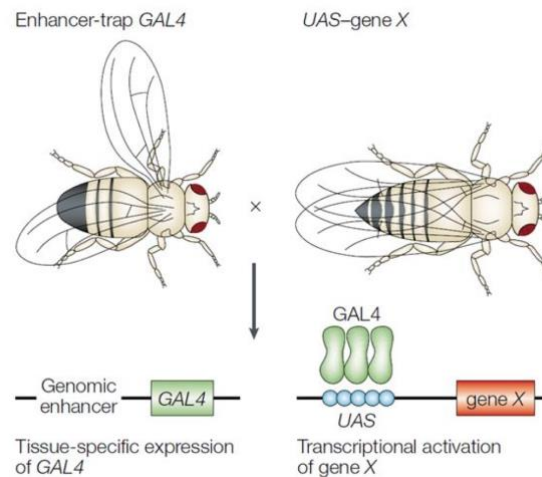


Figure 21 : Le système d'expression ciblée UAS-Gal4

Après croisement de la lignée pilote d'expression « enhancer-trap Gal4 » et de la lignée effectrice « UAS-gène X », le Gal4, exprimé dans les types cellulaires ciblés par le promoteur utilisé, active la transcription du gène X situé en aval de la séquence de liaison UAS (St Johnston *et al.*, 2002).

Des banques de lignées pilote d'expression Gal4 permettant de cibler parfois un nombre très restreint de cellules dans un tissu donné ont été construites et mises à disposition pour la recherche. De même, des banques de lignées effectrices UAS pour des milliers de gènes d'intérêt sont disponibles. Notamment, des protéines fluorescentes comme la GFP et mCherry, ou des protéines capteurs comme les GCaMP permettant de détecter la concentration cellulaire de calcium sont largement employées. Ce système permet également l'inactivation spécifique d'un gène d'intérêt dans un tissu ou un type cellulaire de façon sélective grâce à des transgènes codant pour des ARN interférents (ARN_i). De nombreuses banques de lignées ARN_i existent et sont utilisées à grande échelle pour réaliser des cribles ou pour disséquer plus finement des processus cellulaires (Mohr *et al.*, 2014 ; Heigwer *et al.*, 2018).

Il est également possible de restreindre temporellement l'expression du facteur de transcription Gal4 grâce au système TARGET (McGuire *et al.*, 2003) et ainsi inactiver par exemple un gène seulement au stade adulte. Ce système utilise une isoforme mutante thermosensible de la protéine Gal80, Gal80^{ts}, répresseur de l'activité transcriptionnelle du facteur Gal4.

Un second système similaire au système binaire UAS-Gal4 a été plus récemment développé, le système LexA-LexAop de bactérie. De la même façon, il permet l'expression ciblée de transgènes. Ces deux systèmes étant indépendants, leur utilisation associée permet d'exprimer ou réprimer un premier transgène dans un type cellulaire donné et un second dans un autre, de façon synchrone (Lai & Lee, 2006).

3. Le système nerveux central de drosophile

3.1 Organisation et composition

Le système nerveux central de drosophile adulte est composé d'un cerveau et d'un ganglion subœsophagien dans la tête et de ganglions thoraciques et abdominaux composant la corde nerveuse ventrale, située dans le thorax. Deux lobes optiques se trouvent de part et d'autre du cerveau central, qui comprend trois structures majeures, les lobes antennaires nécessaires à l'olfaction, les corps pédonculés (ou *mushrooms bodies* - MB) impliqués notamment dans l'apprentissage olfactif et la mémoire, et le complexe central, indispensable au contrôle moteur (Figure 22) (Martin & Krantz, 2014).

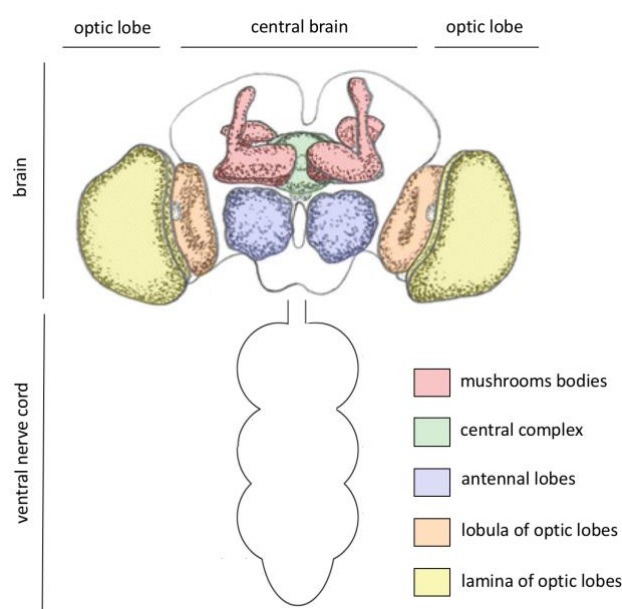


Figure 22 : Organisation anatomique du système nerveux central de drosophile

Le SNC de drosophile est composé du cerveau central, entouré de 2 lobes optiques (en jaune et orange) et d'une corde nerveuse ventrale située dans le thorax. Les lobes antennaires (en bleu), les corps pédonculés (en rouge) et le complexe central (en vert) sont trois structures importantes du cerveau central (Adapté de Koniszewski *et al.*, 2016).

Introduction

Le cerveau de drosophile adulte possède environ 100 000 neurones et les cellules gliales représentent environ 10 à 15% du nombre total de cellules du SNC (Ito *et al.*, 2013 ; Kremer *et al.*, 2017). A titre comparatif, le nombre total de neurones du cerveau chez l'Homme a été estimé à plus de 86 milliards, et les cellules non-neuronales sont approximativement de même nombre, avec des variations de ce rapport selon la région cérébrale (Azevedo *et al.*, 2009).

La morphologie des neurones de drosophile est quelque peu différente de celle des mammifères (Figure 23a-c). En effet, une seule projection émane du corps cellulaire et donne lieu aux axones et dendrites. Les corps cellulaires se regroupent en glomérule dans la région corticale du SNC, à l'intérieur desquels se trouve le neuropile, constitué de l'ensemble des projections.

Les cellules gliales de drosophile sont classées en 4 catégories, en fonction de leur rôle et de leur distribution (Figure 23d-e) (Ou *et al.*, 2014) :

- la glie de surface, divisée en glie périneurale et subpérineurale, forme une barrière protectrice équivalente à la barrière hémato-encéphalique.
- la glie corticale, située autour des corps cellulaires du cortex, participe aux échanges gazeux entre le soma et les trachées et vient en support de nutriments.
- la glie du neuropile, associée aux axones et régions synaptiques du neuropile, est divisée en 2 sous-types, la glie de type astrocytaire et la glie engainante. La glie astrocytaire s'infiltré dans les régions internes du neuropile et participe à la croissance des axones. La glie engainante joue un rôle d'oligodendrocyte en entourant le neuropile synaptique.
- la glie périphérique entoure les projections axonales périphériques, comme les cellules de Schwann des mammifères.

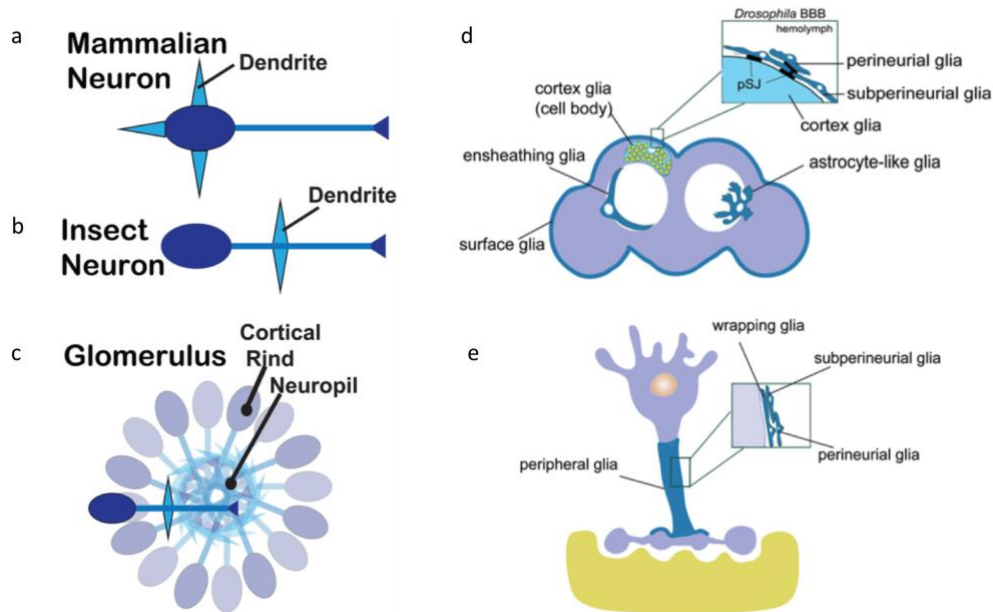


Figure 23 : Morphologie et organisation des neurones et cellules gliales de drosophile

Contrairement aux neurones de mammifères (a), un seul prolongement émane du soma des neurones d'insectes (b), qui tient lieu d'axone à partir duquel les dendrites se forment. Les corps cellulaires se regroupent en glomérules (c) et la région constituée seulement des projections est nommée neuropile. (Martin & Krantz, 2014). Les cellules gliales sont composées de 4 types (d) : la glie corticale, la glie de surface (divisée en glie périneurale et subpérineurale), la glie du neuropile (incluant la glie de type astrocytaire et la glie engainante) et la glie périphérique. (e) Schéma de la glie périphérique au niveau d'une jonction neuromusculaire (Ou *et al.*, 2014).

Bien que de taille réduite, le SNC de drosophile possède donc une architecture complexe lui permettant des comportements élaborés. Ceux-ci sont médiés par des circuits neuronaux bien définis utilisant des neurotransmetteurs identiques à ceux des mammifères. En effet, on retrouve l'acétylcholine, le glutamate, le GABA et certaines monoamines telles que la sérotonine, la dopamine et l'histamine, dont les mécanismes de synthèse, de stockage et de recyclage sont conservés (Long *et al.*, 2017 ; Meissner *et al.*, 2019). Seule l'adrénaline et la noradrénaline ne sont pas présentes chez la drosophile mais des équivalents structuraux et fonctionnels existent, la tyramine et l'octopamine, respectivement (Roeder, 2005).

3.2 Modèle d'étude de maladies neurodégénératives et neurodéveloppementales

Grâce à son cerveau sophistiqué et ses similitudes avec l'Homme, la drosophile a été largement utilisée comme modèle d'étude de maladies neurodégénératives, telles que les maladies d'Alzheimer, de Parkinson ou encore de Huntington (Birman, 2000 ; Jaiswal *et al.*, 2012 ; McGurk *et al.*, 2015 ; Dung & Thao, 2018). La mutation d'un gène homologue chez la drosophile peut ainsi entraîner des phénotypes similaires à ce qui est observé dans des formes génétiques de pathologies neurologiques humaines. Par exemple, une perte de fonction du gène *Appl*, l'homologue d'APP impliqué dans la maladie d'Alzheimer, entraîne un défaut de mémoire à long terme chez la drosophile (Goguel *et al.*, 2011). L'expression de gènes mutés humains est aussi parfois employée directement. La forme A30P de l' α -synucléine humaine (liée à des cas familiaux de la MP) exprimée dans les neurones de drosophiles récapitulent certains phénotypes de la MP comme un défaut locomoteur précoce, des inclusions semblables aux corps de Lewy et une dégénérescence des nDA (Feany & Bender, 2000). L'utilisation de toxines environnementales, comme la roténone ou le paraquat, est une autre façon de modéliser les troubles liés à la MP chez la drosophile (Coulom & Birman, 2004 ; Cassar *et al.*, 2015).

Des modèles génétiques de troubles héréditaires neurodéveloppementaux ont également été développés, notamment pour la neurofibromatose de type 1 et les syndromes d'Angelman, de Rett et du X fragile (Gatto & Broadie, 2011 ; Ferdousy *et al.*, 2011 ; Drozd *et al.*, 2018) ou plus largement pour les troubles du spectre autistique (Hahn *et al.*, 2013 ; Wise *et al.*, 2015 ; Coll-Tané *et al.*, 2019). En particulier, une étude de criblage protéique chez la drosophile a permis de mettre en évidence la contribution d'altérations DAergiques à l'étiologie du syndrome d'Angelman (Ferdousy *et al.*, 2011).

Les nombreux avantages de la drosophile en font un modèle de choix pour le criblage de molécules potentiellement thérapeutiques et son efficacité est de plus en plus

prouvée au sein de la recherche translationnelle, malgré certaines réticences quant à sa pertinence en tant que modèle prédictif des systèmes mammifères (Perrimon *et al.*, 2016 ; Fernández-Hernández *et al.*, 2016 ; Papanikolopoulou *et al.*, 2019). Pourtant, la drosophile a déjà permis la découverte, le repositionnement et la validation d'un certain nombre de composés (Papanikolopoulou *et al.*, 2019). Par exemple, trois antioxydants naturels capables d'atténuer la perte de nDA liée à l'âge ont été mis en évidence dans un modèle génétique de la MP chez la drosophile (Angeles *et al.*, 2016).

4. Le système dopaminergique de drosophile

4.1 Anatomie

Parmi les 30 000 neurones du cerveau central de la drosophile, les nDA sont environ au nombre de 250 (125 par hémisphère) (Mao & Davis, 2009 ; Pech *et al.*, 2013). Un immunomarquage avec un anticorps anti-TH sur un cerveau disséqué permet de les localiser facilement par microscopie confocale. Ils s'organisent en groupements, aussi appelés *clusters*, nommés en fonction de leur localisation anatomique (Figure 24) (Nässel & Elekes, 1992 ; Friggi-Grelin *et al.*, 2003a ; White *et al.*, 2010). Ces neurones projettent sur différentes structures cérébrales dont le complexe central, impliqué dans le contrôle moteur, et les MB, connus pour leur rôle dans l'apprentissage olfactif et la mémoire, structures que l'on peut considérer comme l'équivalent des ganglions de la base et de l'hippocampe des mammifères, respectivement (Strausfeld & Hirth, 2013). Le PAM (*Protocerebral Anterior Medial*) est le cluster le plus dense avec un peu moins d'une centaine de nDA. Situé en position antérieure et projetant principalement sur les MB, il est impliqué dans de nombreuses fonctions telles que la mémoire olfactive appétitive et la locomotion induite par un choc (Liu *et al.*, 2012a ; Riemensperger *et al.*, 2013).

Introduction

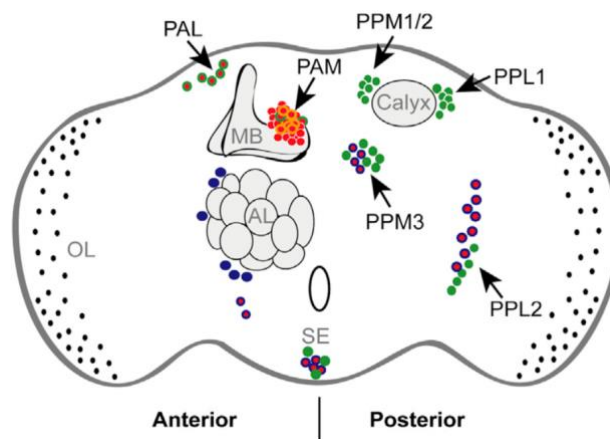


Figure 24 : Organisation anatomique des neurones dopaminergiques dans le cerveau adulte de drosophile

Les nDA de drosophile sont organisés en regroupements appelés « *clusters* » et nommés en fonction de leur localisation anatomique : PAL : *Prorocerebral Anterior Lateral* ; PAM : *Protocerebral Anterior Medial* ; PPM : *Protocerebral Posterior Medial* ; PPL : *Protocerebral Posterior Lateral*.

AL : antennal lobes (lobes antennaires) ; MB : mushroom bodies (corps pédonculés) ; OL : optic lobes (lobes optiques) ; SE : suboesophageal ganglion (ganglion suboesophagien) (Riemensperger *et al.*, 2013).

4.2 Neurotransmission

La neurotransmission DAergique chez la drosophile est semblable à celle décrite chez les mammifères (Yamamoto & Seto, 2014 ; Kasture *et al.*, 2018). Les gènes impliqués dans la synthèse de DA, le stockage, le transport et la transduction du signal secondaire ont tous un homologue chez la drosophile, à savoir TH, codée par le gène *pale* (Neckameyer & Quinn, 1984), Ddc (Wright *et al.*, 1976), VMAT (Greer *et al.*, 2005), DAT codé par le gène *fumin* (Pörzgen *et al.*, 2001), et des récepteurs DAergiques couplés positivement ou négativement à l'AC (Mustard *et al.*, 2005) (Figure 25). Cependant, une divergence est apparue dans le recyclage et le catabolisme de la DA. Si la DA n'est pas recapturée par le neurone présynaptique via le transporteur DAT, elle peut être recyclée par les cellules gliales. Les enzymes Black et Ebony la métabolise alors en N- β -alanyl dopamine (NBAD) (Hodgetts, 1972 ; Hovemann *et al.*, 1998), puis l'enzyme Tan recycle le NBAD en DA au sein du neurone présynaptique (True *et al.*, 2005). De plus, aucuns orthologues des enzymes MAO et COMT n'ont été identifiés chez cet organisme. C'est une autre enzyme, l'aralkylamine N-

acétyltransférase (aaNAT) qui métabolise la DA en un composé inactif, la N-acétyl dopamine (NADA) au sein de la glie (Hintermann *et al.*, 1996).

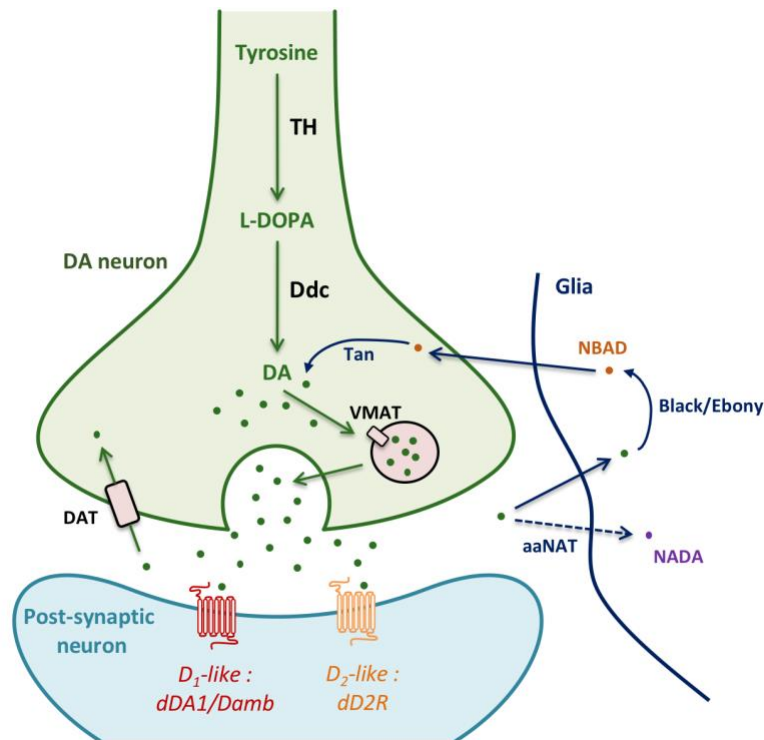


Figure 25 : Vue d'ensemble du système de neurotransmission dopaminergique de drosophile

La neurotransmission DAergique a été conservée de la drosophile aux mammifères. Dans le neurone présynaptique, la tyrosine est convertie en L-DOPA par la TH, puis en DA par la Ddc. Elle est ensuite stockée dans les vésicules synaptiques via le transporteur VMAT et est libérée par exocytose dans la fente synaptique après dépolarisation du neurone. Elle peut alors se lier à 2 types de récepteurs en position post-synaptique, des récepteurs couplés positivement à l'AC incluant dDA1/Dumb/Dop1R1, homologue du récepteur D₁ des mammifères, et DAMB/Dop1R2, récepteur propre aux invertébrés, et un récepteur couplé négativement à l'AC nommé dD2R/Dop2R, homologue du récepteur D₂ des mammifères. La DA excessive peut être recapturée dans le neurone présynaptique par le transporteur DAT ou être recyclée par les cellules gliales via l'action des enzymes Black, Ebony et Tan. Elle peut aussi être métabolisée en NADA par l'aaNAT, ce qui diverge des mammifères utilisant les enzymes COMT et MAO pour dégrader la DA en composés inactifs. aaNAT : aralkylamine N-acétyltransférase ; DAT : Transporteur de DA ; Ddc : Dopa décarboxylase ; NADA : N-acétyl dopamine ; NBAD : N-β-alanyl dopamine ; VMAT : Transporteur vésiculaire des monoamines ; TH : Tyrosine hydroxylase.

Il est important de noter que la DA périphérique des cellules de l'hypoderme qui participe à la production de mélanine est synthétisée via les mêmes processus que la DA du SNC, contrairement aux mammifères (Wright, 1987). Deux isoformes différentes

Introduction

de la TH ont ainsi été détectées, l'une spécifique du SNC et l'autre de l'hypoderme (Birman *et al.*, 1994 ; Friggi-Grelin *et al.*, 2003b), ce qui est également le cas pour la Ddc (Morgan *et al.*, 1986). La DA périphérique joue un rôle essentiel dans la pigmentation et le durcissement de la cuticule. Par exemple, des mutations nulles des gènes *pale* et *Ddc* entraînent l'apparition d'embryons non pigmentés et létaux en raison d'une cuticule non fonctionnelle. Les gènes *black*, *tan* et *ebony* ont eux été nommés en fonction de la couleur de pigmentation procurée par leur mutation réciproque.

Chez la drosophile, 4 récepteurs de la DA couplés aux protéines G ont été identifiés : un récepteur homologue au récepteur de type D₁ des mammifères, dDA1/Dumb/Dop1R1 (Gotzes *et al.*, 1994 ; Sugamori *et al.*, 1995), un récepteur D₁-like propre aux invertébrés, DAMB/Dop1R2 (Feng *et al.*, 1996 ; Han *et al.*, 1996 ; Mustard *et al.*, 2005), un récepteur homologue au récepteur de type D₂ des mammifères, dD2R/Dop2R (Hearn *et al.*, 2002) et un récepteur non canonique, DopEcR (Srivastava *et al.*, 2005). Comme chez les mammifères, les récepteurs D₁ et D₁-like activent la voie AMPc alors que le récepteur D₂ l'inhibe. De plus, ce dernier est aussi un autorécepteur (Vickrey & Venton, 2011). Ces rDA sont largement enrichis dans les MB et le complexe central, et ils participent à de nombreuses fonctions analogues à celles des rDA de l'Homme qui seront décrites dans la section ci-dessous (Kim *et al.*, 2003 ; Kim *et al.*, 2007 ; Karam *et al.*, 2019). Le récepteur DopEcR est quant à lui un récepteur particulier ayant une forte affinité pour la DA mais aussi pour l'ecdysone, l'hormone stéroïde majeure des insectes. Il a d'ailleurs une plus grande homologie avec les récepteurs β -adrénergiques qu'avec les récepteurs DAergiques des mammifères (Srivastava *et al.*, 2005).

4.3 Fonctions

De même que chez les mammifères, la DA joue un rôle essentiel dans le soutien de fonctions variées chez la drosophile. Des manipulations génétiques ou

pharmacologiques de l'activité basale DAergique ont permis de mettre en évidence l'altération de nombreux comportements. Nous nous intéresserons ici plus particulièrement au comportement locomoteur et au sommeil, paramètres que nous avons étudiés dans ce projet de thèse.

- Activité basale et locomotion spontanée

Plusieurs études ont permis de montrer que des variations des niveaux de DA peuvent modifier l'activité basale et la locomotion spontanée des drosophiles. En effet, des drosophiles dont la DA a été supprimée du SNC sont viables mais présentent une activité locomotrice spontanée réduite (Riemensperger *et al.*, 2011 ; Cichewicz *et al.*, 2017). De même, des mutants pour le récepteur dDA1 montrent une hypoactivité nocturne (Lebestky *et al.*, 2009) mais aussi une diminution de toilettage (Pitmon *et al.*, 2016). Enfin, l'inactivation de la transmission synaptique dans un large nombre de nDA par l'expression de la toxine tétanique (TTN) réduit drastiquement la locomotion des drosophiles (Alekseyenko *et al.*, 2013).

A l'inverse, la suppression du gène *fumin* codant pour le transporteur DAT entraîne une hyperactivité de jour comme de nuit, liée à une augmentation de DA dans la fente synaptique et donc probablement à une suractivation des rDA (Kume *et al.*, 2005). Une étude corrobore ainsi avec cette idée : une hyperactivité nocturne a été repérée après stimulation persistante du récepteur dD2R avec un agoniste, la bromocriptine (Lee *et al.*, 2013). Une surexpression de VMAT produit le même effet, inversé par l'application d'un antagoniste DAergique (Chang *et al.*, 2006). Enfin, la libération de DA stimulée optogénétiquement entraîne une augmentation instantanée et transitoire de l'activité locomotrice (Lima & Miesenböck, 2005).

Ainsi, des niveaux plus élevés de DA sont liés à une activité locomotrice spontanée plus élevée et inversement, des niveaux de DA plus faibles entraînent une diminution de la

Introduction

locomotion. Les effets de la DA sur ce comportement sont en partie dus à son rôle dans les états d'éveil et de sommeil (van Swinderen & Andretic, 2011).

- États d'éveil et de sommeil

En corrélation avec les descriptions précédentes, les mutants sans DA montrent une augmentation du temps de sommeil (Riemensperger *et al.*, 2011) alors que les mutants *fumin*, comme leur nom l'indique en japonais - « sans sommeil » - ont un temps de sommeil très réduit (Kume *et al.*, 2005). De plus, une souche de drosophile construite pour être insomniaque, avec seulement 60 minutes de sommeil par jour, présente des niveaux élevés de DA (Seugnet *et al.*, 2009a). Ainsi, la DA serait un médiateur de l'éveil (Birman, 2005 ; van Swinderen & Andretic, 2011 ; Kumar *et al.*, 2012). Comme chez les mammifères, on suppose que les niveaux de DA doivent sensiblement varier en fonction du jour et de la nuit dans des populations neuronales précises, mais de façon certainement différente étant donné que la drosophile présente des phases de sommeil diurnes et nocturnes.

Plusieurs études ont montré que le récepteur dDA1 serait largement impliqué dans les états de veille et de sommeil. En effet, un mutant pour ce récepteur montre une augmentation du temps sommeil, de jour comme de nuit (Lebestky *et al.*, 2009). Plus précisément, l'expression de dDA1 dans les MB est impliquée dans le sommeil de jour (Jiang *et al.*, 2016) et son expression dans les corps en éventail du complexe central joue un rôle dans le sommeil nocturne (Ueno *et al.*, 2012), comme cela a été démontré grâce à des surexpressions spécifiques de dDA1 dans ces deux structures en contexte mutant pour ce récepteur.

Comme chez l'Homme, l'ingestion de caféine promeut l'éveil chez la drosophile, notamment en augmentant l'activité des neurones du PAM (Nall *et al.*, 2016). De plus, la caféine n'a aucun effet sur le sommeil en absence de l'expression du récepteur

dDA1 dans les MB, ce qui démontre réellement que son action sur l'éveil est médiée par la signalisation DAergique (Andretic *et al.*, 2008).

- Locomotion induite par un choc

L'induction d'un stimulus mécanique sur un tube de drosophiles augmente son activité locomotrice et provoque un comportement réflexe et naturel de s'éloigner du centre de la Terre, nommé « géotaxie négative ». Ce comportement, qualifié de réactivité locomotrice (Connolly, 1967 ; Jordan *et al.*, 2006 ; Sun *et al.*, 2018b), est évalué classiquement par un test de SING (*Startle-induced negative geotaxis*), décrit dans le chapitre II. Les drosophiles ont naturellement un déficit locomoteur au cours de leur vieillissement, qui est facilement mesuré par ce test.

Les nDA tiennent un rôle important dans ce réflexe locomoteur, notamment un groupe de 15 neurones du PAM. En effet, l'inactivation de la TH par un ARN double-brin uniquement dans ce groupe de neurones suffit à induire une accélération des déficits locomoteurs liés à l'âge, tout comme l'expression de l' α -synucléine A30P (Riemensperger *et al.*, 2013). Les drosophiles déficientes en DA dans le SNC montrent également un déclin locomoteur très précoce, dès les premiers jours de vie (Riemensperger *et al.*, 2011). De plus, l'expression de la TTN dans les nDA induit une diminution des performances locomotrices (Friggi-Grelin *et al.*, 2003a). Il semble donc qu'une diminution de la signalisation DAergique soit associée à un défaut de réactivité locomotrice.

Cependant, l'augmentation de la signalisation DAergique semble aussi affecter ce comportement négativement. L'expression du canal cationique inductible par la chaleur dTrpA1 dans les nDA, induisant une stimulation vive des nDA, affecte sévèrement les performances locomotrices des drosophiles (Sun *et al.*, 2018b). Ce dernier article montre en outre qu'une diminution spécifique du récepteur dDA1 par ARNi dans les MB permet de sauver ce phénotype, ce qui n'est pas le cas avec le

Introduction

récepteur DAMB. Ainsi, la régulation des capacités locomotrices dépendrait spécifiquement de la signalisation DAergique médiée par le récepteur dDA1 dans les MB.

Tableau 4 : Récapitulatif des conséquences d'altérations de la signalisation dopaminergique sur l'activité locomotrice spontanée, le sommeil et la réactivité locomotrice

	Activité locomotrice spontanée	Sommeil	Réactivité locomotrice
Augmentation de DA	↗	↘	↘
Diminution de DA	↘	↗	↘
Augmentation des récepteurs	↗	↘	↘
Diminution des récepteurs	↘	↗	↗

- Apprentissage et mémoire

Comme décrit précédemment, les récepteurs DAergiques de drosophile sont particulièrement enrichis dans les MB. De ce fait, la signalisation DAergique joue un rôle important dans l'apprentissage associatif et la mémorisation (Waddell, 2010). Notamment, l'apprentissage est médié préférentiellement par le récepteur dDA1 et l'oubli par le récepteur DAMB (Himmelreich *et al.*, 2017). Il a été montré que dDA1 est important aussi bien pour l'apprentissage olfactif appétitif qu'avérsif (Kim *et al.*, 2007) ainsi que pour l'apprentissage visuel (Seugnet *et al.*, 2008). La suppression du récepteur dD2R en position pré ou post-synaptique affecte aussi ces deux types d'apprentissage olfactif (Qi & Lee, 2014). De plus, des nDA bien précis projetant vers les MB ont pu être détectés comme ayant un rôle dans l'apprentissage appétitif et avérsif (Aso *et al.*, 2010 ; Liu *et al.*, 2012a) et dans la formation de mémoire à court et long terme (Plaçais *et al.*, 2012 ; Yamagata *et al.*, 2015). Il semble cependant qu'un dosage optimal et une régulation spatio-temporelle fine de la DA soit requise car des

niveaux augmentés ou réduits de DA affectent tout deux négativement la rétention de la mémoire (Zhang *et al.*, 2008).

Enfin, une étude surprenante dans l'équipe a montré que des drosophiles déficientes en DA dans le SNC sont attirées préférentiellement par l'odeur associée à un choc plutôt que l'odeur neutre (Riemensperger *et al.*, 2011). Cette tendance qualifiée de « masochiste » dans l'article n'est pas sans rappeler le comportement d'automutilation observé chez les patients LN.

- Autres fonctions

La DA a également un rôle dans les addictions. L'exposition à diverses substances chimiques ciblant le système DAergique comme la caféine (Wu *et al.*, 2009), l'alcool, la nicotine et la cocaïne (McClung & Hirsh, 1998 ; Bainton *et al.*, 2000 ; Rothenfluh & Heberlein, 2002), ou les méthamphétamines (Andretic *et al.*, 2005), produit des réponses comportementales identiques à celles de l'Homme. Elle est aussi impliquée dans le comportement de cour (Liu *et al.*, 2008), l'attention et la prise de décision (Ye *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2007), la motivation et la récompense (Burke *et al.*, 2012 ; Yamagata *et al.*, 2016), la prise alimentaire (Marella *et al.*, 2012) et l'agressivité (Alekseyenko *et al.*, 2013) chez la drosophile.

5. Le métabolisme des purines chez la drosophile

5.1 Synthèse, recyclage et catabolisme des purines

- La synthèse *de novo*

La voie de synthèse *de novo* a été entièrement conservée de la drosophile à l'Homme. On retrouve les mêmes enzymes codées par des gènes homologues, notamment *Prat*, *ade2*, *ade3* et *ade5* dont les pertes de fonctions ont été étudiées plus en détail

Introduction

(Henikoff *et al.*, 1986 ; Clark, 1994 ; O'Donnell *et al.*, 2000 ; Malmanche & Clark, 2004). Des mutations homozygotes de ces gènes entraînent toutes une létalité au stade pupal, pouvant être sauvée par l'addition de nucléotides, nucléosides ou purines dans le milieu nutritif (Henikoff *et al.*, 1986 ; Holland *et al.*, 2011). Ceci démontre l'importance primordiale de la voie de synthèse *de novo* dans la métamorphose de la drosophile.

- La voie de recyclage

Les seules études ayant été réalisées sur la voie de recyclage des purines chez *Drosophila melanogaster* remontent aux années 70-80. C'est Jean-Louis Becker qui s'intéressa tout d'abord à ce sujet et publia ses premiers résultats en 1974. Par une technique d'autoradiographie sur des cellules de drosophiles en culture, il révéla une absence d'activité HGPRT, les cellules n'incorporant ni l'hypoxanthine-C¹⁴, ni la guanine-H³ (Becker, 1974a). Une forte activité Aprt fut par contre relevée, par incorporation d'adénine-C¹⁴. Il établit par la suite un schéma global des voies d'interconversions des purines chez la drosophile en fonction des dosages des différentes enzymes effectués sur des cellules embryonnaires, puis sur des extraits larvaires et adultes (Becker, 1974b). Il confirma ainsi que la seule différence notable entre la voie de recyclage de l'Homme et celle de la drosophile est cette absence d'activité HGPRT.

Cependant, il mit en évidence en 1978 qu'une activité HGPRT pouvait être détectée sous certaines conditions de cultures des cellules, comme l'ajout d'azasérine (un inhibiteur de la synthèse *de novo*), la dialyse, le traitement par charbon actif ou un choc thermique (Becker, 1978 ; Becker, 1980). Ceci reste toutefois peu probable étant donné qu'avec l'arrivée du séquençage du génome de la drosophile, aucun gène homologue à l'HGPRT n'a pu être détecté.

Johnson, Nash et Henderson complétèrent le schéma métabolique en analysant les taux de conversion des différents composés à bases puriques chez la larve de drosophile (Johnson *et al.*, 1980a-c). Quelques années plus tard, le gène *Aprt* fut isolé et décrit en position 62B9 du chromosome 3L (Johnson *et al.*, 1987). Celui-ci partage plus de 40% d'identité et plus de 80% de similarité avec le gène humain. Sa séquence codante contient 546 nucléotides et est traduite en Aprt, une protéine de 20 kDa et 182 acides aminés, seule enzyme *a priori* capable de recycler les purines (ici l'adénine) chez la drosophile. Un mutant pour ce gène, *Aprt*⁵, a été découvert grâce à sa résistance à la 7H-purine, une purine normalement toxique pour les organismes possédant une Aprt fonctionnelle (Johnson & Friedman, 1981, 1983). Ce mutant a été initialement généré par traitement à l'éthylméthylsulfonate (EMS, un agent chimique mutagène). Aucune étude n'a été réalisée à notre connaissance sur ce mutant depuis son identification.

- Le catabolisme des purines

Concernant le catabolisme, la drosophile, comme les mammifères non primates, possède l'enzyme urate oxydase capable de dégrader l'acide urique en allantoiné (Friedman, 1973, Wallrath *et al.*, 1990). Cette enzyme, qui a été perdue dans l'espèce humaine (Varela-Echavarría *et al.*, 1988 ; Álvarez-Lario & Maccarrón-Vicente, 2010), n'est exprimée que dans les tubes de Malpighi chez la drosophile. Le reste de la voie de dégradation des purines est entièrement conservé (Hodge & Glassman, 1967ab). L'ingestion d'allopurinol par les drosophiles entraîne une accumulation d'hypoxanthine et de xanthine, et une diminution d'acide urique et d'allantoiné, démontrant que cette molécule est capable d'inhiber la XO comme chez l'Homme (Bratty *et al.*, 2011).

Un schéma récapitulant l'état actuel des connaissances sur le métabolisme des purines chez la drosophile est présenté en Figure 26.

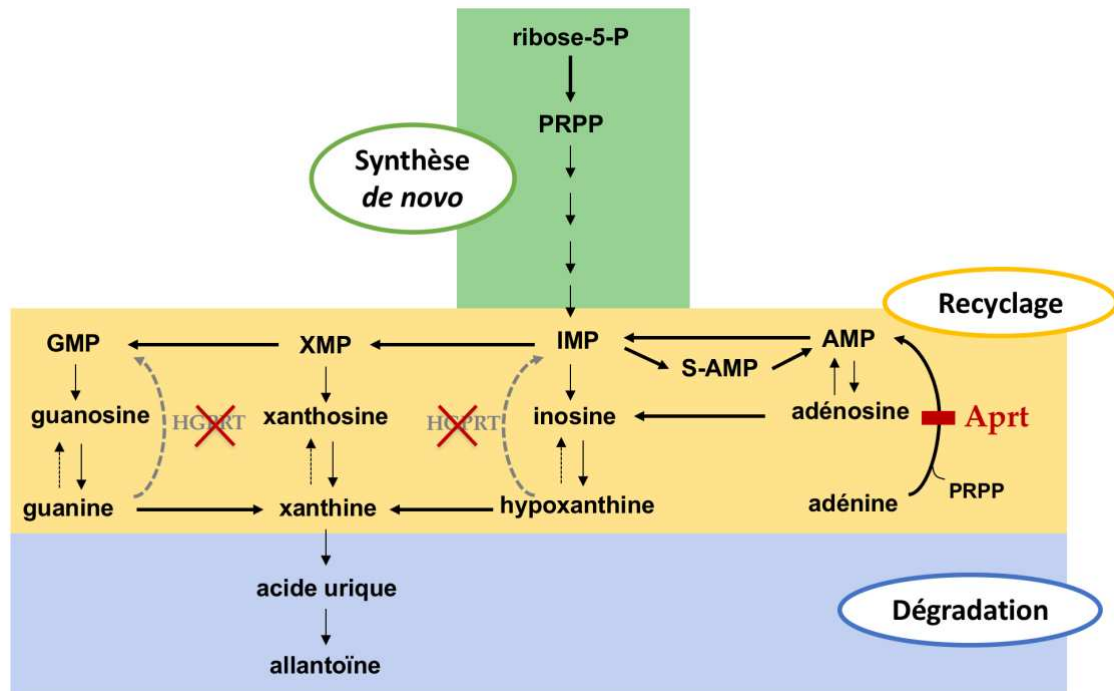


Figure 26 : Métabolisme des purines chez *Drosophila melanogaster*

Deux différences majeures distinguent le métabolisme des purines de drosophile de celui de l'Homme. Premièrement, la drosophile est capable de dégrader l'acide urique en allantoin grâce à l'enzyme urate oxydase, qui a été perdue au cours de l'évolution des primates. Deuxièmement, la drosophile ne possède pas de gène codant pour l'enzyme HGPRT, et aucune autre enzyme fonctionnellement identique n'a pu être détectée. Il semble donc que l'Aprt soit la seule enzyme capable de recycler les purines chez la drosophile.

5.2 Récepteurs et transporteurs associés au métabolisme des purines

Les récepteurs de l'ATP P2X et P2Y n'ont pas d'homologues connus chez la drosophile (Schulz & Schöneberg, 2003 ; Fountain, 2013). Ainsi, le seul récepteur purinergique décrit à ce jour est un récepteur de l'adénosine. Contrairement à l'Homme qui en possède 4 sous-types, la drosophile n'en a qu'un, nommé AdoR (Brody & Cravchik, 2000). Il est codé par le gène du même nom positionné en région 99D8 du chromosome 3R. De même que chez l'Homme, ce récepteur est couplé aux protéines G et est fortement exprimé dans le SNC. Il présente une plus forte homologie avec le récepteur A_{2A} (38% d'identité) et agit de la même façon en stimulant la voie AMPc mais aussi la libération de calcium (Dolezelova *et al.*, 2007 ; Kucerova *et al.*, 2012). Sa surexpression ubiquitaire entraîne une létalité au stade larvaire. Certaines

surexpressions plus spécifiques permettent la survie jusqu'au stade adulte mais les mouches présentent des malformations des ailes ou du thorax. Ce phénotype peut être sauvé partiellement par injection d'adénosine désaminase, permettant de diminuer l'adénosine extracellulaire en la convertissant en inosine (Dolezelova *et al.*, 2007). Par contre, des mutations du récepteur AdoR sont viables (Wu *et al.*, 2009), mais présente aussi des altérations comportementales, notamment d'apprentissage associatif (Knight *et al.*, 2010).

Concernant les transporteurs, trois gènes codant pour les ENT, *Ent1*, *Ent2* et *Ent3*, et deux codant pour les CNT, *Cnt1* et *Cnt2*, ont été décrits chez la drosophile (Sankar *et al.*, 2002). Seul Ent2 a été caractérisé comme transportant réellement des nucléosides entre les espaces extra et intracellulaires (Machado *et al.*, 2006). Des mutants nuls de ce récepteur sont létaux, tandis que des mutants hypomorphes sont viables mais présentent des altérations de l'apprentissage associatif et de la transmission synaptique (Knight *et al.*, 2010).

5.3 Interactions entre systèmes purinergique et dopaminergique chez la drosophile

Les interactions purine-dopamine chez la drosophile ont été très peu étudiées. Une seule publication à ce jour a montré un lien régulateur direct entre le récepteur AdoR et les neurones DAergiques, chez la larve de drosophile (Ma *et al.*, 2016). Cette étude montre que l'octopamine et la tyramine inhibent les nDA via un mécanisme dépendant du récepteur AdoR. Les auteurs proposent que l'entrée de calcium astrocytaire induite par la liaison de ces neurotransmetteurs entraînerait une libération d'ATP par les astrocytes, qui est alors hydrolysé en adénosine. L'adénosine stimulerait son récepteur AdoR présent à la membrane des nDA, ce qui inhiberait ces derniers (Figure 27).

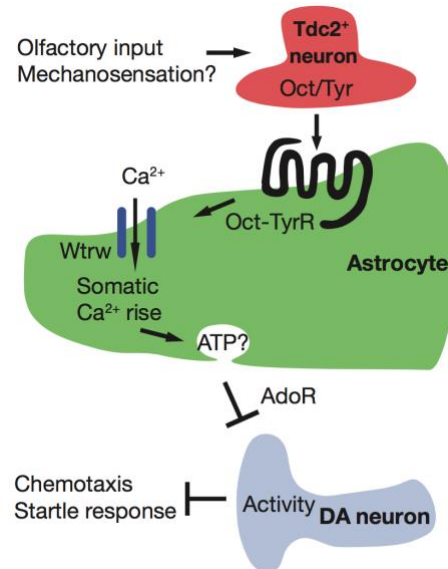


Figure 27 : Modèle proposé d'inhibition des neurones dopaminergiques via le récepteur AdoR

Des informations olfactives et mécanosensorielles entraînent une libération d'octopamine et de tyramine par les neurones Tdc2⁺. Ces neurotransmetteurs activent leur récepteur à la membrane des astrocytes, ce qui induit une entrée de Ca²⁺ via le canal Wtrw. L'augmentation de Ca²⁺ dans l'astrocyte serait suffisante pour inhiber les nDA par un mécanisme dépendant du récepteur AdoR, via probablement la libération d'ATP et son hydrolyse en adénosine dans l'espace extracellulaire. Ce processus serait essentiel pour certains comportements de la larve. Tdc2⁺ : neurones exprimant la tyrosine décarboxylase ; Wtrw : canal de potentiel transitoire Water witch. (Ma *et al.*, 2016).

Objectifs de la thèse

La voie de recyclage des purines permet de récupérer les bases puriques préformées, dérivées du régime alimentaire ou de la dégradation des nucléotides, évitant ainsi le coût énergétique de la synthèse *de novo*. Elle est utilisée par tous les organismes vivants, de façon plus ou moins importante en fonction des tissus. Les deux enzymes impliquées dans cette voie chez les mammifères sont l'APRT et l'HGPRT. Chez l'Homme, un déficit complet ou quasi complet en HGPRT est responsable de la maladie de Lesch-Nyhan (MLN), une pathologie génétique rare affectant essentiellement les garçons, caractérisée par une hyperuricémie et des troubles neurocomportementaux tels qu'une dystonie, une spasticité et une automutilation compulsive.

Des études ont montré que les patients atteints de MLN présentent une forte réduction des niveaux de DA dans les ganglions de la base, probablement liée à une diminution de l'expression du phénotype DAergique. Bien que de nombreuses théories aient été proposées quant aux mécanismes liant le recyclage des purines et le système DAergique, aucune n'a pour le moment reçu validation et le développement de thérapies reste inexistant. Une autre contrainte réside dans le fait qu'un déficit en HGPRT chez les rongeurs n'induit pas de défauts neurocomportementaux comparables à ceux observés chez les patients. Le développement de nouveaux modèles *in vivo* est donc crucial afin de mieux comprendre la MLN et progresser dans le traitement de cette maladie. Bien que l'importance de l'utilisation de la drosophile dans la modélisation de maladies rares soit reconnue (Oriol & Lasko, 2018), un modèle de la MLN chez cet organisme n'a jamais été développé, et l'exploration d'un lien entre le recyclage des purines et le système DAergique n'a pas été réalisée à ce jour dans un modèle invertébré.

Les objectifs généraux de mon projet de doctorat étaient ainsi d'analyser les liens entre la voie de recyclage des purines et le système DAergique de la drosophile et de

Objectifs

développer des modèles d'étude de la MLN chez cet organisme génétiquement modifiable, dans l'espoir d'identifier de nouveaux mécanismes et cibles thérapeutiques pour avancer dans la compréhension et le traitement de ce syndrome.

Mon projet de thèse s'est concentré sur les trois objectifs spécifiques suivants :

1. L'étude des interactions réciproques entre le recyclage des purines et le système DAergique chez la drosophile. Nous avons étudié l'effet de perturbations génétiques du système purinergique sur le système dopaminergique et inversement, en utilisant des drosophiles mutantes pour l'Aprt ou surexprimant cette enzyme, des drosophiles déficientes en DA dans le SNC et des mutants de récepteurs de la DA et de l'adénosine.

2. L'analyse des conséquences d'un déficit en Aprt sur la longévité, le métabolisme des purines et sur divers comportements (moteur, sommeil, épilepsie). Comme l'HGPRT n'a pas d'homologue chez la drosophile, nous avons émis l'hypothèse qu'un déficit en Aprt, seule enzyme de la voie de recyclage des purines chez cet organisme, pourrait avoir des conséquences comparables à celles induites par l'absence d'HGPRT chez l'Homme.

3. La construction de drosophiles transgéniques exprimant l'HGPRT humaine native ou une forme mutante pathogène de cette enzyme associée à la MLN dans le SNC. Les conséquences de ces expressions sur des marqueurs du système DAergique et sur les comportements moteurs ont été analysées.

Les résultats de ces différentes études sont regroupés au sein de deux articles en voie de soumission qui sont présentés dans la partie Résultats de ce mémoire

Chapitre II. Matériels et Méthodes

1. Culture des drosophiles

Les drosophiles sont élevées en tubes ou bouteilles standard contenant un milieu nutritif composé de farine de maïs (6,7%), de levure (6%), d'agar (2,25%) et d'un antifongique (0,33%, 4-hydroxybenzoate de méthyle ou méthylparabène). Elles sont conservées dans un incubateur à 25°C alternant des cycles lumière/obscurité de 12 h.

Pour certaines expériences, des conditions nutritives particulières ont été appliquées par l'ajout de certains composés :

- pour la normalisation des niveaux d'acide urique, de l'allopurinol (A8003, Sigma Aldrich) a été dilué dans le milieu nutritif standard à 100 µg/ml et les drosophiles ont été placées 5 jours sur ce milieu avant extraction des métabolites.

- pour les expériences de sauvetage de la sensibilité au choc (*bang sensitivity*), de la N⁶-méthyladénosine (m⁶A - QB-1055, Combi-Blocks) et de l'adénosine (ado, A9251, Sigma Aldrich) ont été diluées dans le milieu nutritif à une concentration finale de 500 µM. Les drosophiles ont été exposées à ce milieu soit 5 jours avant le test, soit durant tout le développement larvaire. Dans ce second cas, les lignées parentales ont été placées sur ces milieux enrichis pour pondre leurs œufs afin que la progéniture soit exposée aux différents composés durant tout le développement. Au stade adulte, la progéniture a été collectée et déposée sur un milieu standard jusqu'à 5 jours avant le test, où elle a été de nouveau placée sur un milieu enrichi en ado ou m⁶A aux mêmes concentrations.

- pour les expériences de RT-qPCR après supplémentation d'ado, celle-ci a été diluée dans le milieu nutritif à une concentration finale de 2 mM. Les drosophiles ont été exposées à l'âge adulte durant 48h, avant extraction.

Pour certaines expériences, des conditions d'élevage particulières ont été utilisées. Afin de restreindre temporellement l'expression du gène d'intérêt au stade adulte, le système TARGET utilisant l'outil thermosensible Gal80ts a été employé (McGuire *et al.*, 2003). Les drosophiles ont été élevées à température permissive (18°C), où la protéine

Gal80ts bloque l'activité transcriptionnelle du Gal4, empêchant l'expression du gène d'intérêt. Elles ont ensuite été placées pendant 3 jours avant le test à température restrictive (30°C) afin que le Gal80ts soit inactivé et permette au Gal4 d'induire l'expression du gène d'intérêt.

2. Lignées génétiques utilisées

La lignée Canton-S (aux yeux rouges) a été utilisée comme contrôle des souches mutantes, et la lignée *white*¹¹¹⁸ (*w*¹¹¹⁸) (Oregon-R, aux yeux blancs) a été utilisée comme lignée contrôle pour les croisements.

Le test correspond à la descendance du croisement de femelles vierges « pilote d'expression Gal4 » avec des mâles de la lignée « effectrice UAS ». Le contrôle de la lignée pilote d'expression est obtenu en croisant des femelles vierges « pilote d'expression Gal4 » avec des mâles *w*¹¹¹⁸. Le contrôle de la lignée effectrice est obtenu en croisant des femelles vierges *w*¹¹¹⁸ avec des mâles de la lignée « effectrice UAS ». Par convention, on note par exemple *elav>Aprt* le résultat du croisement *elav-Gal4* x *UAS-Aprt*, signifiant qu'on surexprime l'*Aprt* dans tous les neurones. Les contrôles sont alors notés *elav-Gal4/+* et *UAS-Aprt/+*, le « + » correspondant aux descendants du croisement avec la lignée contrôle sauvage *w*¹¹¹⁸.

Les lignées mutantes, pilotes d'expression et effectrices utilisées dans notre étude sont décrites dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5 : Liste des lignées de drosophiles utilisées

BDSC : Bloomington *Drosophila* Stock CenterVDRC : Vienna *Drosophila* Resource Center

Lignées	Description
AdoR^{KG03964ex} (alias AdoR^{KGex})	Mutant « nul » du récepteur adénosinergique AdoR (BDSC #30868)
Aprt⁵	Mutant « nul » de l'enzyme du recyclage des purines Aprt (BDSC #6882)
Canton-S	Souche sauvage de référence – yeux rouges
damb¹	Mutant du récepteur DAergique de type D ₁ -like DAMB (Selcho <i>et al.</i> , 2009)
Df Aprt (Df(3L)ED4284)	Déficiences recouvrant l'Aprt en 62B4-B12 (BDSC #8056)
Df Aprt (Df(3L)BSC365)	Seconde déficiences recouvrant l'Aprt en 62B7-D3 (BDSC #24389)
w ; UAS-DTHg^{FS±}; ple^{2cl}/TM6B	Lignée permettant d'obtenir les drosophiles déficientes en dopamine par croisement avec la lignée w, Ddc-Gal4; TH-Gal4, ple ^{2cl} /TM6B (Riemensperger <i>et al.</i> , 2011)
dumb² = dDA1^{f02676}	Mutant du récepteur DAergique de type D ₁ dDA1 (Kim <i>et al.</i> , 2003)
w¹¹¹⁸	Souche sauvage contrôle – yeux blancs
Lignées Gal4	Profil d'expression
238Y-Gal4	Corps pédonculés
24B-Gal4	Musculaire
da-Gal4	Ubiquitaire
w, Ddc-Gal4; TH-Gal4, ple^{2cl}/TM6B	Lignée permettant d'obtenir les drosophiles déficientes en dopamine par croisement avec la lignée w ; UAS-DTHg ^{FS±} ; ple ^{2cl} /TM6B (Riemensperger <i>et al.</i> , 2011)
EAAT1-Gal4	Astrocytes exprimant le transporteur EAAT1 (Rival <i>et al.</i> 2004)
elav-Gal4	Pan-neuronal (elav ^{C155} , BDSC #458)
elav-Gal4; UAS-Dcr-2	Pan-neuronal, combiné à un Dicer-2 permettant une meilleure efficacité des ARN _i (BDSC #25750)
MZ0709-Gal4	Glie engainante
NP6510-Gal4	15 neurones DAergiques du groupe PAM (Riemensperger <i>et al.</i> , 2013)
NP6520-Gal4	Glie engainante
R58E02-Gal4	Neurones du groupe PAM (~80%)
R76F05-Gal4	Neurones du groupe PAM
repo-Gal4	Pan-glial (Sepp <i>et al.</i> , 2001)
TH-Gal4	Neurones DAergiques, excepté une majeure partie des neurones du groupe PAM (Friggi-Grelin <i>et al.</i> , 2003a)

<i>TH-Gal4, R58E02-Gal4</i>	Tous les neurones DAergiques (Sun <i>et al.</i> , 2018b)
<i>TRH-Gal4</i>	Neurones sérotoninergiques (Cassar <i>et al.</i> , 2015)
<i>tub-Gal80^{ts}; da-Gal4</i>	Ubiquitaire, permettant une expression temporelle précise (McGuire <i>et al.</i> , 2003)
<i>VT30559-Gal4</i>	Corps pédonculés
Lignées UAS	Fonction
<i>UAS-Aprt^{RNAi}</i>	Inactivation du gène <i>Aprt</i> (VDRC #106836/KK)
<i>UAS-Aprt</i>	Surexpression de l'Aprt (ce travail)
<i>UAS-dDA1^{RNAi}</i>	Inactivation du récepteur DAergique dDA1 (BDSC #55239)
<i>UAS-HPRT-WT</i>	Surexpression de l'HPRT sauvage (ce travail)
<i>UAS-HPRT-I42T</i>	Surexpression de l'HPRT mutée I42T (ce travail)

3. Construction de la lignée permettant la surexpression de l'Aprt

Nous nous sommes dans un premier temps procuré un clone contenant le transgène de drosophile *UAS-Aprt-His* (clone UFO04831) étiqueté par un tag histidine (His) en position C-terminale disponible chez DGRC (*Drosophila Genomics Resource Center*), que nous avons amplifié par transformation bactérienne puis envoyé à la société BestGene Inc. pour insertion dans le génome de la drosophile. Il s'est avéré par la suite que les lignées obtenues, bien qu'exprimant fortement l'ARNm *Aprt-His*, ne surexprimaient pas l'activité de l'enzyme. Nous en avons déduit que le tag histidine (his) en position C-terminale inhibait probablement l'activité de l'Aprt.

Nous avons donc commandé un clone d'ADNc d'Aprt de drosophile non étiqueté (clone BDGP ORF BS15201) chez DGRC, que nous devions cette fois insérer dans un vecteur UAS pour pouvoir le surexprimer chez la drosophile. Le protocole d'*In-Fusion*[®] *HD Cloning Kit* (Takara Bio) a été utilisé selon les instructions du fournisseur. L'insert Aprt (549 paires de bases) a été amplifié en utilisant des oligonucléotides auxquels des sites de restriction ont été ajoutés (Tableau 6). Les fragments PCR ont été insérés dans un vecteur *pUASTattB* (Bischof *et al.*, 2007) pour une insertion à un site précis, et

vérifiées par séquençage (Eurofins Genomics). Le plasmide UAS-Aprt a ensuite été envoyé à BestGene pour insertion dans le génome de drosophile sur le chromosome 2 (site d'insertion attp14).

Tableau 6 : Séquences d'oligonucléotides utilisées pour le clonage de l'UAS-Aprt de drosophile

Gène	Oligonucléotides	Séquences*
<i>Aprt</i>	P1-EcoRI (sens)	5'-AGGGAATTGG GAATTC GTTATCAGTCGACATGAGCCC
<i>Aprt</i>	P2-XbaI (anti-sens)	5'-ACAAAGATCCT CTAGAT CTAGAAAGCTTCAGTACTTAATG

*Les sites de restriction ajoutés sont en gras.

4. Construction des lignées transgéniques HPRT WT et I42T

- Lignées HPRT taggées

Des clones contenant des ADNc humains de l'HPRT native et mutée I42T nous ont été gracieusement envoyés par le Dr. Hyder A. Jinnah (Emory University, GA, USA). L'ADNc HPRT I42T reçu comportant une séquence tag *6xHis-Lumio* en position N-terminale, nous avons dans un premier temps réalisé les constructions avec l'ADNc de l'HPRT WT taggé également.

Les ADNc HPRT WT et I42T humains taggés (711 paires de bases) ont été amplifiés en utilisant des oligonucléotides auxquels des sites de restriction ont été ajoutés (Tableau 7). La séquence en amont du codon d'initiation ATG dans l'oligonucléotide sens a été modifiée pour correspondre à la séquence consensus de drosophile afin de s'assurer du bon démarrage de la traduction. Les fragments PCR ont été insérés dans un vecteur *pUASTattB* (Bischof *et al.*, 2007) pour une insertion au même site, et vérifiées par séquençage. Ces étapes ont été réalisées comme précédemment avec le kit In-Fusion. Les plasmides *UAS-t-HPRT-WT* et *UAS-t-HPRT-I42T* ont ensuite été envoyés à BestGene pour insertion dans le génome de drosophile sur le chromosome 2 (site d'insertion attp40).

Tableau 7 : Séquences d'oligonucléotides utilisées pour le clonage de l'HPRT humaine native et mutée taggées

Gène	Oligonucléotides	Séquences*
HPRT	P1-EcoRI (sens)**	5'- AGGGAATTGG GAATTC GAGATACAAAATGGGTCACC
HPRT	P2-XbaI (anti-sens)	5'- ACAAAGATCCT CTAGAG CTCGGATCCTTATCATTAC

*Les sites de restriction ajoutés sont en gras.

**Les bases modifiées pour correspondre à la séquence consensus initiatrice de la traduction chez la drosophile sont soulignées.

Après analyse des résultats, la séquence Tag *His-Lumio* s'est avérée pouvoir également inhiber l'activité de l'enzyme HGPRT comme nous avons pu l'observer pour l'UAS-Aprt taggé. Nous avons donc recommencé les constructions avec un ADNc de l'HPRT WT reçu non taggé, et nous avons réalisé une mutagenèse dirigée pour obtenir la forme HPRT I42T à partir de la forme HPRT WT.

- Lignées HPRT non taggées

La mutagenèse dirigée a été réalisée grâce au protocole « *Quick Change II Site-Directed Mutagenesis Kit* » (Agilent Technologies) selon les instructions du fournisseur. Les séquences d'oligonucléotides utilisées pour créer la mutation I42T sont présentées dans le tableau 8. L'ADNc obtenu a été amplifié par transformation bactérienne et extrait par mini-prep puis séquencé pour vérification de la bonne mutation.

Les ADNc HPRT WT et I42T non taggés (657 paires de bases) ont ensuite été amplifiés en utilisant des oligonucléotides auxquels des sites de restriction ont été ajoutés (Tableau 8). La séquence en amont du codon d'initiation ATG dans l'oligonucléotide sens a été modifiée pour correspondre à la séquence consensus de drosophile afin de s'assurer du bon démarrage de la traduction, comme précédemment. Les fragments PCR ont été insérés dans un vecteur *pUASTattB* (Bischof *et al.*, 2007) pour une insertion au même site, et vérifiées par séquençage. Les plasmides UAS-HPRT WT et UAS-HPRT I42T non taggés ont ensuite été envoyés à BestGene pour insertion dans le génome de drosophile sur le chromosome 2 (site d'insertion attp40).

Tableau 8 : Séquences d'oligonucléotides utilisées pour le clonage de l'HPRT humaine native et mutée

Gène	Oligonucléotides	Séquences*
<i>HPRT-I42T</i>	P1-T125C (sens)*	5'-CAGTCCTGTCCATAGTTAGTCCATGAGGAATAAACACCCCT
<i>HPRT-I42T</i>	P2-T125C (anti-sens)	5'-AGGGTGTTTATTCTCATGGACTAACTATGGACAGGACTG
<i>HPRT</i>	P1-EcoRI (sens)***	5'- AGGGAATTGGGAATTC AAGAAGGAGATACAAAATGGC
<i>HPRT</i>	P2-XbaI (anti-sens)	5'- ACAAAGATCCTCTAGAGCTCGGATCCTTATCATTAC

*La mutation ajoutée est en rouge.

**Les sites de restriction ajoutés sont en gras.

***Les bases modifiées pour correspondre à la séquence consensus initiatrice de la traduction chez la drosophile sont soulignées.

5. Dosage des activités enzymatiques Aprt et HGPRT

Les mesures d'activités enzymatiques HGPRT et Aprt ont été adaptées à la drosophile d'après les protocoles établis sur les cellules humaines (Cartier & Hamet, 1968 ; Ceballos-Picot *et al.*, 2009). Les cinétiques de transformation suivantes ont été mesurées pour l'HGPRT et l'Aprt, respectivement, grâce à des substrats radioactifs marqués au carbone 14 :



20 drosophiles entières, ou 100 têtes, sont broyées dans 250 µL, ou 200 µL respectivement, de tampon Tris (110 mM) - MgCl₂ (10mM) (pH 7.4), immédiatement congelés à -80°C et gardés à cette température au moins une nuit avant le test. Après 5 min de microcentrifugation à 13 000 g, la quantité de protéine totale de chaque surnageant est mesurée en amont du test grâce au kit *BCA (Bicinchoninic acid protein assay)* (ThermoFisher Scientific) afin de normaliser l'activité enzymatique obtenue. Le milieu réactionnel contient un volume d'extrait de drosophile, équivalent à 200 µg de protéines, dilué dans la solution tampon qsp 150 µl, associé à 25 µl d'une solution radioactive préparée par dilution de 38 µl d'hypoxanthine-C¹⁴ (25 µCi/ml) dans 1 ml d'hypoxanthine froide 1,2 mM pour l'HGPRT, ou 50 µl d'une solution radioactive préparée par dilution de 75 µl d'adénine-C¹⁴ (50 µCi/ml) dans 1 ml d'adénine froide 1,2

mM pour l'Aprt. Les réactions sont effectuées à 37°C et démarrées par l'ajout du cofacteur de la réaction, le PRPP (25 µL, 10 mM). 40 µL du mélange réactionnel est prélevé aux temps 6, 12, 24 et 36 min et placé dans un tube séparé contenant 25 µL d'une solution d'arrêt (HIE pour l'HGPRT : Hypoxanthine 3 mM, IMP 6 mM, EDTA 200 mM ou AAE pour l'Aprt : Adénine 3 mM, AMP 6 mM, EDTA 200 mM) que l'on chauffe 3 min à 95°C pour stopper la réaction. Les échantillons sont déposés sur des bandes de cellulose (papier Whatman 3MM) dont l'extrémité est plongée dans un solvant composé de NH₄OH 28% + EDTA 50 mM. Les différents composés radioactifs sont ainsi séparés par chromatographie verticale pendant environ 1h30. Après séchage des bandes, les substrats et produits sont identifiés sous lampe UV à 254 nm et placés séparément dans des fioles contenant 2 ml de bioscintillant (VWR), un agent permettant la révélation de la radioactivité. Le nombre de désintégrations par minute est compté par un analyseur à scintillation liquide (Tri-Carb 1600 TR, PerkinElmer). Le pourcentage de transformation est ainsi calculé en fonction du temps, et celui-ci est converti en nmol/min/mg de protéine. Etant donné la grande variabilité inter-dosages observée avec cette technique, les données ont été normalisées et exprimées en % d'activité par rapport au génotype contrôle. Les expériences ont été répétées au moins 3 fois pour chaque génotype.

6. Dissection des cerveaux et marquages immunohistochimiques

Les immunomarquages sur cerveaux entiers de drosophile ont été effectués tel que précédemment décrit (Riemensperger *et al.*, 2011). Des cerveaux adultes de 8-10 jours sont disséqués dans une solution de Ringer dépourvu d'ions Ca²⁺ (solution physiologique) et fixés pendant 1 h sous agitation et à température ambiante dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4% diluée dans du PBS 1X (*Phosphate Buffer Saline*). Ils sont ensuite lavés 3 x 20 min au PBS-Triton X-100 0,5% puis incubés 2 h dans une solution de blocage de BSA (*Bovine serum albumine*) 2% diluée dans du PBS-T 0,5% afin de limiter les liaisons non spécifiques. Les cerveaux sont alors mis en présence de l'anticorps primaire dilué dans cette même solution de BSA/PBS-T toute la nuit. Nous

avons ici utilisé un anticorps primaire monoclonal anti-TH de souris (cat. #22941, ImmunoStar, 1:1 000). Après 3x20 min de lavages dans du PBS-T 0,5%, les cerveaux sont incubés avec l'anticorps secondaire durant 2h à température ambiante, sous agitation et à l'abri de la lumière. Nous avons ici utilisé l'anticorps de chèvre anti-souris couplé au fluorophore Alexa 488 (ThermoFisher Scientific, 1:1000). Les cerveaux sont rincés une dernière fois 3 x 20 min au PBS 1X puis montés entre lame et lamelles dans une solution retardant l'extinction de la fluorescence (*Prolong Gold antifade reagent*, ThermoFisher Scientific).

L'immunomarquage de la dopamine a été effectué comme précédemment décrit (Riemensperger *et al.*, 2011 ; Cichewicz *et al.*, 2017). Les cerveaux sont disséqués sur glace dans du PBS 1X et transférés immédiatement pour fixation dans une solution de glutaraldéhyde (1,25%) et de métabisulfite de sodium (1%) dilués dans du PBS. Les tissus sont fixés durant 3-4h sur glace puis lavés 3 x 20 min dans du PBS + 1% de métabisulfite de sodium (solution PM). Une étape de réduction est alors nécessaire avec 1% de tétrahydruroborate de sodium (NaBH_4) durant 40 min à température ambiante. Les cerveaux sont alors lavés sur glace 2 x 20 min avec la précédente solution PM puis 1 x 20 min dans cette même solution à laquelle a été ajouté 0,1% de BSA et 0,3% de Triton X-100 (solution PMBT). L'étape de blocage s'effectue sur toute la nuit dans le PMBT auquel est ajouté 1% de sérum de chèvre. Les cerveaux sont ensuite incubés à 4°C durant 24 à 48h dans l'anticorps primaire monoclonal anti-dopamine de souris (cat #AM001, GemacBio, 1:100) dilué dans le PMBT. Après 3 x 20 min de lavages à température ambiante dans une solution de PBT (PBS, 0,1% BSA, 0,3% Triton, 0,02% NaN_3), les cerveaux sont mis en présence de l'anticorps secondaire anti-souris Alexa 488 (1:200) dilué dans le PBT durant 24h, à l'obscurité et à 4°C. Le lendemain, 2 x 20 min de lavages au PBT sont effectués, puis un dernier sur la nuit. Enfin, après 2 lavages successifs de 5 min dans du PBS, les cerveaux sont montés dans une solution de 2,2'-thiodiethanol 65% (Sigma Aldrich).

Les images ont été acquises grâce à un microscope confocal Nikon A1R en prenant soin de ne pas modifier les paramètres d'acquisition (laser, gain, filtre, pas) pour chaque expérience. Les niveaux d'intensité de fluorescence moyenne du cerveau entier ont été quantifiés en utilisant le logiciel Fiji. Un minimum de 6 cerveaux par génotype a été quantifié au cours d'au moins 3 expériences indépendantes.

7. Extraction d'ARN et reverse transcription-PCR

Pour l'évaluation des niveaux de transcrits par RT-PCR ou RT-qPCR, l'ARN total a été isolé suivant la procédure standard d'extraction à partir de 20 à 30 têtes de drosophiles mâles collectées et broyées dans 600 µl de tampon de lyse QIAzol (Qiagen) grâce à l'appareil Minilys (Bertin Technologies). Les échantillons sont centrifugés 10 min à 12 000 g et à 4°C afin d'enlever les débris cuticulaires. 120 µl de chloroforme sont ajoutés au surnageant récupéré. Après un vif vortex de quelques secondes et 2-3 min à température ambiante, une seconde centrifugation de 15 min à 12 000 g et à 4°C est effectuée. La phase aqueuse en surface est récupérée et 300 µl d'isopropanol y sont ajoutés. Les tubes sont mélangés par 2-3 inversions à la main puis laissés 15 min à température ambiante. Une nouvelle centrifugation de 15 min à 12 000 g et à 4°C permet de récupérer le culot d'ARN. Celui-ci est lavé avec 600 µl d'éthanol 75% que l'on centrifuge 5 min à 7 500 g, 4°C. Cette étape est répétée une fois pour éliminer le plus d'impuretés possibles (traces de phénol, d'isopropanol) puis le culot d'ARN est dissous dans 20 µl d'eau RNase-free. Enfin les échantillons sont chauffés 10 min à 55°C afin d'éliminer les traces d'éthanol restantes, et quantifiés par un appareil Quickdrop (Molecular Devices).

1 µg d'ARN dilué dans 20 µL de volume total a été rétrotranscrit avec le *PrimeScript RT Reagent Kit* (Takara Bio) suivant les recommandations du fournisseur.

La PCR classique a été réalisée par amplification d'au moins 750 ng d'ADNc dans 20 µl finaux de réaction, grâce au kit *PrimeStar Max DNA Polymerase* (Takara Bio) dans

l'appareil Techne Prime Thermal Cycler (Bibby Scientific). Le programme d'amplification comprend 30 cycles d'amplification : 10 sec de dénaturation à 98°C, 10 sec d'hybridation à 55°C et 10 sec d'élongation à 72°C. Après électrophorèse sur gel d'agarose, les niveaux d'expression des produits PCR ont été mesurés par analyse densitométrique en utilisant le logiciel Fiji. Les données ont été normalisées par rapport à l'expression d'un contrôle interne, *rp49* (gène codant pour une protéine ribosomale ubiquitaire chez la drosophile).

La PCR quantitative a été préparée selon les recommandations du kit *LightCycler 480 SYBR Green I Master* (Roche Molecular Diagnostics) dans des plaques de 96 puits et dans l'automate correspondant, le LightCycler 480. Environ 40 ng d'ADN complémentaire est amplifié dans 10 µl finaux de réaction. Le programme d'amplification comprend une étape initiale de pré-incubation de 10 min à 95°C, puis 45 cycles d'amplification (10 sec de dénaturation à 95°C, 10 sec d'hybridation à 55°C et 20 sec d'élongation à 72°C). Une dernière étape permet de générer des courbes de fusion (*melting curves*), indicatrices de qualité des produits PCR (5 sec à 95°C, 1 min à 65°C et une dernière étape continue à 97°C). Les résultats ont été analysés selon la méthode des $2^{-\Delta\Delta Ct}$ et l'expression de chaque gène a été quantifiée relativement à l'expression du gène de référence *rp49* utilisé comme contrôle endogène. Les séquences d'oligonucléotides utilisées sont présentées dans le Tableau 9 ci-dessous.

Tableau 9 : Liste des oligonucléotides utilisés pour les RT-PCR et RT-qPCR

Gènes	Séquences des oligonucléotides
<i>AdoR</i>	(sens) 5'- GGAGAAATTGCGATCGGATGACAC (anti-sens) 5' - TCTTCAGCGAACTCCGAGTGAATG
<i>Aprt</i>	(sens) 5'- AATCAGCGCGGAAGACAAGCTA (anti-sens) 5' - CCACCTTGCCGATGAGTTCAGT
<i>DAT</i>	(sens) 5'- AACAAATAGCATCAGCGACGA (anti-sens) 5' - CAGGTTATGGCACCCCTTACG
<i>dD2R</i>	(sens) 5'- GAGCGCAAGGCCACCAAAACA (anti-sens) 5' - GGGTTCACAAAGCTGTTGATGTAG
<i>dDA1</i>	(sens) 5'- GCGATCGCTTCATCACGGACT (anti-sens) 5' - CCACTGGATCAGTAGGGTAGAG
<i>DAMB</i>	(sens) 5'- GCGGTAGTTGCATAGTGGGAT (anti-sens) 5' - CAAAGAACGTAATGGAGGATG
<i>DTH1</i>	(sens) 5'- GGATCGAAAGCCAACCAAGTG (anti-sens) 5' - CTTGGGGACCAACTGCGCTTTA
<i>en</i>	(sens) 5'- CCCCAAACAGCCAAAGGACA (anti-sens) 5' - TAGGGGATCTGCCCGTTCAT
<i>Ent2</i>	(sens) 5'- ACGGCAAGGGATCAACGTC (anti-sens) 5' - CCGTGCAGCAGGAATATAAAGA
<i>HPRT</i>	(sens) 5'- GAGATACAAAATGGCGACCCGCAGCCCT (anti-sens) 5' - GCTCGGATCCTTATCATTACTAGGCTTTG
<i>rp49</i>	(sens) 5'- GACGCTTCAAGGGACAGTATC (anti-sens) 5' - AAACGCGGTTCTGCATGAG

8. Détection et quantification de l'adénosine

Tests réalisés par le Dr. Sandrine Marie, Cliniques Universitaires Saint-Luc, Bruxelles

Les niveaux d'adénosine ont été déterminés par chromatographie en phase liquide à ultra performance (UPLC). 30 têtes ou 5 mouches entières ont été broyées dans 120 µl de NaCl 0,9% à l'aide d'un appareil Minilys (Bertin Instruments) et congelées à -80°C avant le test. Après 5 min de microcentrifugation, 20 µl d'acide perchlorique à 10% sont ajoutés à 70 µl de surnageant et laissés 5 min sur la glace. Après une nouvelle centrifugation, 20 µl d'une solution de neutralisation (K₂CO₃ et bleu de bromothymol) sont ajoutés au surnageant et centrifugés à nouveau, avant injection de 5 µL. Les

échantillons ont été analysés par UPLC avec détection UV par un Acquity UPLC HSS T3 1,8 μm (2,1x150mm) (Waters Corporation). La phase mobile consiste en un tampon A (30 mM d'acétate d'ammonium, pH 4,0 avec de l'acide heptafluorobutyrique (HPFA) 1 :10 000) et un tampon B (acétonitrile avec HPFA 1 :10 000), avec un débit fixé à 0,3 ml/min. Les conditions chromatographiques sont les suivantes : 3,5 min à 100% du tampon A, 16,5 min à 6,3% du tampon B, 2 min à 100 % du tampon B et 1 min de maintien. Le gradient est ensuite ramené pendant 5 min à 100% du tampon A, rétablissant ainsi les conditions initiales. Les résultats de 3 expériences indépendantes ont été normalisés par rapport à la concentration totale en protéines puis comparés au génotype contrôle.

9. Mesure de la longévité

Les études de longévité ont été effectuées comme précédemment décrit dans l'équipe (Riemensperger *et al.*, 2011). Les drosophiles adultes sont collectées en 24h maximum et maintenues dans des conditions standards de culture à 25°C et en cycle jour/nuit de 12h/12h. Elles sont transférées dans des bouteilles fraîches tous les 2-3 jours et le nombre de mouches survivantes est compté. 3 bouteilles de 50 mouches par génotype ont été testées et l'expérience a été répétée 3 fois.

10. Détection et quantification des métabolites puriques

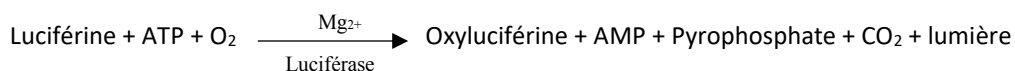
Afin d'extraire les métabolites puriques, 40 têtes de chaque génotype sont tout d'abord broyées dans de l'éthanol à 80%. Ce broyat est ensuite chauffé 3 min à 80°C puis l'éthanol est évaporé à l'aide d'un Speedvac. Les résidus secs sont resuspendus dans de l'eau MilliQ et la quantité de protéines totale pour chaque homogénat est mesurée grâce au kit BCA.

La détection des métabolites puriques est réalisée par HPLC couplée à un détecteur à diodes UV. 20 μl de chaque échantillon sont injectés dans une colonne Nucleosil C18

de 25 cm de long, 4,6 mm de diamètre et 5 µm de taille de particules (Interchim). Un gradient de deux phases mobiles est utilisé, l'une contenant du phosphate de monopotassium à 50 mM (pH=5) et l'autre un mélange d'acétonitrile et d'eau (35%/65%). Le flux de circulation de la phase mobile est fixé à 1 ml/min. 7 longueurs d'onde différentes sont utilisées pour la détection (230, 240, 250, 260, 266, 270 et 280 nm) afin d'obtenir le spectre de chaque composé. Les temps de rétention ainsi que ces spectres nous permettent d'identifier chaque pic du chromatogramme et d'être sûr que ceux-ci correspondent à un métabolite donné. Pour l'analyse, la hauteur maximale de chaque pic a été normalisée par rapport à la quantité de protéines totales puis comparée au génotype contrôle.

11. Dosage de l'ATP par bioluminescence

La quantité d'ATP a été mesurée par bioluminescence grâce à l'*ATP Determination Kit* (A22066, ThermoFisher Scientific), dans un bioluminomètre TriStar 2 Spectrum LB942S (Berthold Technologies). Ce dosage repose sur la réaction suivante, produisant de la lumière en quantité directement proportionnelle à celle d'ATP dans l'échantillon :



Les échantillons ont été préparés comme décrit dans l'article de Fergestad *et al.* (2006). 30 têtes ou 5 thorax de drosophiles mâles sont broyés dans 200 µL de guanidine hydrochloride 6M afin d'inhiber les ATPases. Les homogénats sont chauffés 5 min à 95°C puis centrifugés 5 min à 13000g et 4°C afin de se débarrasser des débris de cuticules. La quantité de protéines totale dans chaque échantillon est mesurée grâce au kit *BCA (Bicinchoninic Acid Protein assay)*. Chaque surnageant est ensuite dilué au 1:500 dans un tampon TE (Tris 10 mM - EDTA 1mM, pH 8), et 10 µL sont déposés dans une plaque 96 puits à fond blanc. 90 µL de solution de réaction standard contenant la D-luciférine, la luciférase, du DTT (dithiothréitol) et du tampon, conformément au protocole du fournisseur, sont ajoutés à chaque puits par l'injecteur et un temps de 15 min est respecté avant lecture de la luminescence. Une courbe

standard est générée en parallèle à partir de concentrations connues d'ATP. Les valeurs obtenues sont normalisées par rapport à la quantité de protéines.

12. Mesure des capacités locomotrices (*SING test*)

Les capacités locomotrices des drosophiles au cours du temps ont été évaluées grâce au test SING (*startle-induced negative geotaxis*) comme précédemment décrit dans l'équipe (Rival *et al.*, 2004 ; Riemensperger *et al.*, 2013). Pour chaque génotype, 50 drosophiles adultes sont réparties en 5 groupes de 10 mouches et placées dans des colonnes transparentes à bout conique d'une longueur de 25 cm et d'un diamètre de 1,5 cm. Un temps de latence de 30 minutes est respecté avant le début de l'expérience pour permettre aux mouches de s'adapter à ce nouvel environnement. Chaque colonne est ensuite testée individuellement en induisant un léger choc à la base de la colonne, auquel les drosophiles répondent de façon naturelle et instinctive en grim pant. Après une minute, les drosophiles ayant atteint au moins une fois le haut de la colonne (22 cm) et les drosophiles étant restées au fond de la colonne (en-dessous de 4 cm) sont comptées. Chaque groupe de mouches est testé 3 fois, à 15 minutes d'intervalle. L'indice de performance (IP) pour chaque colonne est défini par la formule suivante : $\frac{1}{2}[1 + (n_{\text{top}} - n_{\text{bot}})/n_{\text{tot}}]$, où n_{tot} est le nombre total de mouches dans la colonne, n_{top} le nombre de mouches en haut et n_{bot} le nombre de mouches en bas après 1 minute. Ce test a été réalisé à 1, 8, 10 ou 30 jours suivant les expériences. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm SEM des scores obtenus sur minimum 3 expériences indépendantes.

13. Test de locomotion larvaire

Ce test a été réalisé comme récemment décrit dans l'équipe (Lecompte *et al.*, 2019). 5 larves mâles de troisième stade sont testées par génotype. Les mâles sont identifiés grâce à leurs gonades, visibles en position dorsale. Ils sont délicatement placés un par un sur un gel d'agar (2%) maintenus à 25°C, en-dessous duquel se trouve une grille

constituée de carreaux de 2 mm de côté. Après environ 30 secondes d'adaptation jusqu'à ce que la larve parvienne à un mouvement régulier, le nombre de salve péristaltique (contraction musculaire de la paroi du corps) et la distance parcourue par la larve sont comptés durant 5 minutes. Les résultats sont exprimés par la taille du pas, c'est-à-dire la distance parcourue (en mm) divisée par la somme des salves péristaltiques. Les résultats montrent la moyenne de 3 expériences indépendantes.

14. Mesure de l'activité locomotrice spontanée

Les enregistrements d'activité locomotrice spontanée ont été réalisés comme précédemment décrit dans l'équipe (Vaccaro *et al.*, 2017), grâce aux moniteurs d'activité commercialisés par TriKinetics placés dans des incubateurs à 25°C sous lumière blanche standard. Ces moniteurs peuvent contenir jusqu'à 32 tubes en verre (5 x 65 mm) contenant un milieu d'agar (1,5%) et de sucrose (5%) dans lesquels sont placées les drosophiles individuellement. Des faisceaux laser infrarouges traversants chacun des tubes permettent de rapporter l'activité moyenne de chaque mouche. Ces données sont envoyées à intervalles de temps réguliers à un ordinateur relié au système.

Dans ces conditions, des drosophiles mâles âgées de 8 jours sont maintenues 5-6 jours sous cycle lumière/obscurité 12h/12h. Les données sont ensuite analysées grâce au logiciel FaasX (*Fly activity analysis suite*, développé par Michel Boudinot, Institut de Neurobiologie Alfred-Fessard, Gif-sur-Yvette) tel que décrit précédemment (Klarsfeld *et al.*, 2003). Les histogrammes représentent la distribution journalière de l'activité des drosophiles par tranche de 30 minutes, et moyennés pour 32 individus par génotype au cours de 4-5 cycles de 24 h. La quantification représente la moyenne d'activité de 3 expériences indépendantes en fonction du jour et de la nuit.

15. Mesure et analyse du sommeil

Expériences réalisées par le Dr. Laurent Seugnet, Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon

Les mesures de sommeil ont été enregistrées grâce au système de faisceau infrarouge Trikinetics précédemment décrit, ou au système vidéo DART (*Drosophila Arousal Tracking*) (Faville *et al.*, 2015). Des femelles vierges de 2-4 jours sont placées dans les tubes en verre Trikinetics contenant de la nourriture standard et leurs mouvements sont enregistrés pendant 5 jours, dans des conditions de cycle lumière/obscurité de 12h/12h et 50-60% d'humidité. Le sommeil est défini par des périodes d'immobilité de plus de 5 minutes (Dubowy & Sehgal, 2017). Il a été calculé par une macro Excel pour les données de faisceau infrarouge et avec le logiciel DART pour les données vidéo. Chaque expérience comprenait au moins 14 mouches par génotype et a été répétée 2 à 3 fois avec des groupes de mouches indépendants.

16. Test de sensibilité au choc (*bang sensitivity*)

Le test de bang-sensitivité (BS) est communément utilisé chez la drosophile pour modéliser des comportements épileptiques (Howlett *et al.*, 2013). En effet, les drosophiles mutantes sensibles aux chocs mécaniques intenses tombent sur leur face dorsale et alternent des phases de paralysie et d'épilepsie avant de parvenir après un certain temps à se remettre sur leurs pattes.

Pour chaque génotype, 50 drosophiles adultes de 30 jours sont divisées en 5 groupes de 10 mouches et placées dans des tubes vides. Après 20-25 minutes d'habituation, chaque tube est vortexé 10 sec à 2 500 rpm et le temps de rétablissement de chaque mouche sur ses pattes est calculé. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm SEM des temps obtenus dans au moins 3 expériences indépendantes.

17. Quantification de la dopamine

Les niveaux de dopamine cérébrale ont été déterminés par HPLC comme précédemment décrit (Hardie & Hirsh, 2006 ; Riemensperger *et al.*, 2011). Après cryoanesthésie, 10 cerveaux mâles sont rapidement disséqués sur un bloc froid dans une solution de Ringer dépourvu d'ions Ca^{2+} et déposés dans des tubes de lyse contenant 100 μL de tampon citrate-acétate à 50 mM (pH 4.5). Ils sont ensuite broyés 100 sec grâce aux billes de céramiques contenues dans ces tubes qui sont très rapidement secoués dans l'appareil Minilys (Bertin Instruments). Les homogénats sont alors filtrés par centrifugation sur une membrane nylon 0,2 μm (VWR) avant injection.

La concentration en DA a été déterminée par HPLC couplée à une détection électrochimique. Les échantillons sont élués par une phase mobile composée de 21% d'acétonitrile, d'une solution tampon de citrate-acétate à 50 mM (pH 4.5) et d'acide décanesulfonate à 4 mM. Le flux de circulation de la phase mobile est maintenu à 0,3 ml/min et le potentiel entre l'électrode de référence et l'électrode de travail est fixé à +800 mV. Après séparation dans une colonne C18 (Thermo Scientific Hypersil ODS), la DA entre dans le détecteur électrochimique à un certain temps de rétention pour y être oxydée. La réaction d'oxydoréduction produit des électrons libérés à la contre-électrode. Le détecteur capte alors ce courant électrique qui est corrélé linéairement à la concentration du composé chargé dans l'HPLC.

Une gamme standard a été d'abord réalisée à partir de 3 concentrations de DA pure diluée (100, 300 et 500 pg/ μL) dans de l'acide citrique afin d'identifier et quantifier les pics sur le chromatogramme. Cette gamme permet de tracer une courbe étalon de l'aire du pic en fonction de la concentration en dopamine. 3 injections de 20 μL chacune (l'équivalent de 2 cerveaux) sont ensuite effectuées pour chaque échantillon. L'aire de chaque pic repérée au temps de rétention de la DA (environ 10 min dans les conditions expérimentales) est utilisée pour déterminer la concentration en DA des

échantillons inconnus. Les résultats expriment les moyennes obtenues sur au moins 3 homogénats de cerveaux différents pour chaque génotype.

18. Statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel GraphPad Prism 6. Afin de comparer deux génotypes ou conditions entre eux, le test de Student a été utilisé. Pour comparer trois ou plus de génotypes/conditions, le test one-way ANOVA a été employé, suivi du test de comparaisons multiples de Tukey-Kramer ou Sidak (comparaison par paires). Les expériences de longévité ont été comparées par le test du logrank. Les barres d'erreur des figures représentent les erreurs standards de la moyenne (SEM). Les différences ont été considérées comme significatives pour des valeurs de p inférieures à 5%, représentées comme suit : $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$. La mention « ns » signifie non significatif.

Chapitre III. Résultats

Article 1

Interactions entre la voie de recyclage des purines et le système dopaminergique chez *Drosophila melanogaster*

Dans cette première étude, nous avons analysé les conséquences d'un déficit en Aprt sur les marqueurs DAergiques de la drosophile et, inversement, les effets d'altérations du système DAergique sur l'activité Aprt. Nous avons montré que la perte d'activité Aprt entraîne une augmentation du niveau de transcription des marqueurs DAergiques tels que la TH, la DA et les récepteurs dDA1 et DAMB. Inversement, des altérations du système DAergique central provoquent une diminution de l'expression et de l'activité Aprt. De plus, nous avons mis en évidence qu'un déficit en Aprt entraîne une réduction des niveaux d'adénosine et une augmentation de l'expression du transporteur d'adénosine Ent2, et qu'un mutant du récepteur de l'adénosine AdoR présente une diminution d'activité Aprt et une augmentation de marqueurs DAergiques. Ceci suggère que l'activité Aprt inhibe physiologiquement l'expression des marqueurs DAergiques neuronaux via une stimulation de la signalisation du récepteur AdoR. En conclusion, nos résultats démontrent l'existence d'une étroite régulation homéostatique entre la voie de recyclage des purines et le système DAergique dans le cerveau de drosophile. Ces nouvelles connaissances fournissent de nouvelles perspectives pour la compréhension des mécanismes neuropathologiques induits par la perte de l'HGPRT chez les patients atteints de la MLN.

Contribution personnelle : dans cet article, j'ai réalisé les expériences de RT-qPCR ainsi que les immunomarquages de la TH et de la DA sur cerveaux entiers. J'ai adapté le dosage enzymatique radioisotopique de l'Aprt sur des extraits de drosophiles, initialement mis en place pour des tissus humains et effectué les dosages d'activité Aprt. J'ai construit la lignée UAS-Aprt par clonage et transformation bactérienne. Rébecca Fima, une étudiante en stage que j'ai co-encadrée, m'a apporté son aide pour

Résultats

certaines expériences sur les mutants AdoR. Notre collaboratrice le Dr Sandrine Marie, Cliniques Universitaires Saint-Luc, a réalisé le dosage de l'adénosine par UPLC.

Interactions between the Purine Salvage Pathway and the Dopaminergic System in *Drosophila melanogaster*

Céline Petitgas^{1,2}, Rebecca Fima¹, Sandrine Marie³, Irène Ceballos-Picot^{2,4}, Serge Birman^{1,*}

¹ Genes Circuits Rhythms and Neuropathology, Brain Plasticity Unit, CNRS, ESPCI Paris, PSL Research University, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France

² Metabolomic and Proteomic Biochemistry Laboratory, Necker-Enfants Malades Hospital, AP-HP, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris, France

³ Laboratory of Metabolic Diseases, Cliniques Universitaires Saint-Luc, Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium

⁴ Paris-Descartes University, Sorbonne Paris Cité University, 12 rue de l'École de Médecine, 75006 Paris, France

*Author for correspondence: serge.birman@espci.fr

Key words:

Adenine phosphoribosyltransferase (Apt) – Adenosine receptor (AdoR) – Dopaminergic system - *Drosophila melanogaster* - Lesch-Nyhan disease – Mushroom body - Purine salvage pathway

Abstract

Adenine phosphoribosyltransferase (APRT) and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) are two enzymes involved in purine salvage pathway in humans. HGPRT-inactivating mutations are associated with Lesch-Nyhan disease (LND), a rare neurological disorder in children, characterized by dystonia and compulsive self-injury. LND patients show markedly reduced dopamine (DA) levels in basal ganglia, but the mechanism linking HGPRT deficiency and DA loss has not been elucidated to date. Here we analyzed the relations between purine recycling and the DA system in *Drosophila*. The only purine-recycling enzyme in this organism is the APRT ortholog Aprt. We have found a striking inverse correlation between Aprt activity and the brain expression of major DA synthesis and receptor genes. Furthermore, we show evidence that Aprt controls the DA system in flies through enhanced adenosine receptor (AdoR) signaling. Because APRT is overexpressed in humans when HGPRT is suppressed, these data provide new insights to better understand LND neuropathological mechanisms.

Introduction

Lesch-Nyhan disease (LND) is a rare neurometabolic X-linked disorder triggered by mutations in the *HPRT1* gene that encodes hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) (Lesch and Nyhan 1964, Seegmiller et al. 1967). This enzyme converts hypoxanthine and guanine into IMP and GMP, respectively, and so plays a central role in the purine salvage pathway, together with adenine phosphoribosyltransferase (APRT) that transforms adenine into AMP. This route allows the recovery of free purine bases derived from diet or the degradation of nucleic acids and nucleotides, thus avoiding the energy cost of *de novo* purine biosynthesis. The metabolic consequences of HGPRT deficiency is an overproduction of uric acid in the blood (hyperuricemia), which can cause gout, tophi, nephrolithiasis and renal failure, but can readily be treated with xanthine oxidase inhibitors such as allopurinol or febuxostat (Kelley et al. 1967, Torres et al. 2007, Lahaye et al. 2014). However, children affected by LND also unexpectedly develop severe neurological impairments that include dystonia, choreoathetosis, spasticity and a dramatic compulsive self-injurious behavior (Nyhan 1997, Jinnah et al. 2006, Torres and Puig 2007, Schretlen et al. 2005, Madeo et al. 2019). They have a developmental delay from 3 to 6 months after birth and most of them can never walk or even sit without support. These neurological symptoms are not ameliorated by hyperuricemia treatment (Torres et al. 2007, Jinnah et al. 2010, Madeo et al. 2019). Importantly, it has been shown that the clinical severity of the disease inversely correlates to the enzymatic activity of HGPRT (Fu and Jinnah 2012, Fu et al. 2014): less than 2% of residual activity corresponds to the full LND phenotype, 2-10% leads to an intermediate neurological phenotype without self-injury, and more than 10% protects patients from neurobehavioral troubles and triggers only symptoms related to hyperuricemia. These two last groups are named Lesch-Nyhan variants (Jinnah et al. 2010).

The causes of the neurobehavioral impairments in LND are still not fully elucidated and it remains challenging to understand and cure this dramatic disease (Fu et al. 2014, Bell et al. 2016). It has been noticed early on that the loss of HGPRT activity induces dopamine (DA) deficits and decreases dopaminergic neuronal density in the

basal ganglia, an effect likely to be involved in the neurobehavioral impairments of LND patients (Baumeister and Frye 1985, Jinnah et al. 1994, Visser et al. 2000, Nyhan 2000, Saito and Takashima 2000). Indeed, post-mortem analysis of LND brains revealed a 70–90% decrease in the levels of DA, its biosynthesis enzymes tyrosine hydroxylase (TH) and DOPA decarboxylase, and its metabolite homovanillic acid in the striatum (Lloyd et al. 1981). Further *in vivo* studies by positron-emission tomography (PET) using dopaminergic tracers confirmed a constant reduction (>40%) in DA storage and DOPA decarboxylase activity (Ernst et al. 1996) as well as in DA transporter abundance (Wong et al. 1996) in the same brain region. Such a stable DA deficit at any age and the failure of treatments with L-DOPA/carbidopa to mitigate the symptoms (Visser et al. 2011, Bell et al. 2016) suggested that this defect is caused by a neurodevelopmental rather than a neurodegenerative process (Lewers et al. 2008, Ceballos-Picot et al. 2009, Göttle et al. 2014), unlike DA neuron loss in Parkinson's disease. Others neurotransmitter systems seem in contrast to be unaffected or results are controversial (Bell et al. 2016).

Although a decrease in DA levels has been found in HGPRT knockout rodents, they do not show neurobehavioral defects comparable to those observed in LND patients (Finger et al. 1988, Jinnah et al. 1993, Jinnah et al. 1994, Meek et al. 2016), thus limiting investigations to find potential therapeutic molecules. Pharmacological models have been developed by injecting the dopaminergic neurotoxin 6-hydroxydopamine into newborn rat brains, which showed self-mutilation behavior in response to L-DOPA or DA agonist administration in adulthood. However, they have limited utility for LND since they do not reproduce the basic genetic impairment (Breese et al. 1990, Knapp and Breese 2016, Bell et al. 2016).

New *in vivo* models are critically needed, therefore, to study LND pathogenesis and find therapeutic molecules. The fruit fly *Drosophila melanogaster* present many advantages for translational studies and drug discovery (Fernández-Hernández et al. 2016, Perrimon et al. 2016, Papanikolopoulou et al. 2019). It has been widely used to model human diseases, including neurodegenerative disorders such as Alzheimer's, Huntington's or Parkinson's diseases (Jaiswal et al. 2012, McGurk et al. 2015, Dung and

Thao 2018, Nagoshi 2018), as well as neurodevelopmental disorders such as Angelman, Rett or Fragile X syndromes (Gatto and Broadie 2011). Although the importance of this invertebrate model for studying rare human genetic diseases is now recognized (Ori  l and Lasko 2018), a *Drosophila* LND model has not yet been developed to our knowledge. This is probably due to the fact that no HGPRT activity is present in flies, as has been long recognized (Miller and Collins 1973, Becker 1974a, 1974b and our unpublished observations). However, purine recycling can still occur through the activity of the conserved Aprt enzyme (Johnson et al. 1987), which seems, therefore, to be the only recycling enzyme of the purine salvage pathway in *Drosophila*.

The dopaminergic neurotransmitter system is well conserved in flies and in many ways functionally comparable to that of mammals (Yamamoto and Seto 2014, Kasture et al. 2018). Mutant adult flies that have no DA in their brain are viable and present specific behavioral defects such as extended sleep time, reduced locomotor activity and impairment in startle-induced locomotion (Riemensperger et al. 2011, Cichewicz et al. 2017). They were qualified as “masochistic” for their aberrant tendency to prefer the shock-associated odor after aversive olfactory conditioning (Riemensperger et al. 2011), a striking phenotype that might be reminiscent of the self-injurious behavior associated with DA-deficiency in LND patients.

Here we have investigated a potential link between the purine salvage pathway and the dopaminergic system in *Drosophila*, by studying the consequences of Aprt deficiency and overexpression on dopaminergic molecular phenotypes and, conversely, the effects of alterations in the dopaminergic system on Aprt activity. We also provide genetic and pharmacological evidence that signaling through the adenosine receptor AdoR constitutes a probable mechanistic link between these two systems. Our results show that the homeostatic relation between DA neurotransmission and purine recycling has been conserved in *Drosophila*, and suggest that this new model could be useful to better understand the neuropathology of LND patients.

Results

Ap_{rt} controls DA neurotransmission in the *Drosophila* brain

Purine synthesis through *de novo* or recycling pathways has been essentially conserved between *Drosophila* and humans, except for the striking lack of HGPRT enzyme activity or homologous gene in the fly (Becker 1974a, 1974b and our unpublished observations) (Fig. S1A, B). Homozygous mutants of the enzymes involved in *de novo* purine synthesis are developmentally lethal (Holland et al. 2011). In contrast, a null mutation in the *Ap_{rt}* gene, *Ap_{rt}⁵*, yields viable homozygotes that develop and survive until and during the adult stage. The *Ap_{rt}⁵* allele has been originally generated by chemical mutagenesis followed by selection of flies resistant to purine toxicity (Johnson and Friedman, 1981, 1983). We have confirmed a strong reduction in *Ap_{rt}* enzyme activity in heterozygous *Ap_{rt}⁵/+* flies and its absence in the homozygous mutant (Fig. S2).

In order to investigate if a disruption of the purine salvage pathway can induce a perturbation of the DA system in *Drosophila*, we performed TH immunostaining on dissected adult brains from wild-type and *Ap_{rt}* mutant flies. Surprisingly, the global TH protein level appeared higher by 17.5% in the *Ap_{rt}⁵* mutants ($p < 0.01$) (Fig. 1A, B). A strong increase was particularly noted in the mushroom body (MB) (47.4%, $p = 0.012$) (Fig. 1A, C), a structure that receives dense dopaminergic projections and is known to be involved in learning and memory, sleep regulation and locomotion control in *Drosophila* (Artiushin and Sehgal 2017, Cognigni et al. 2018, Sun et al. 2018). Moreover, DA immunostaining carried out on whole-mount dissected brains revealed a significantly increased level of this neurotransmitter in *Ap_{rt}⁵* flies when measured over the entire brain (by 17.0% on average, $p < 0.01$) (Fig. 1D, E), but not specifically in the MB or another part of the brain.

To verify these observations with another method, we have assayed by RT-qPCR *TH* transcript levels in wild-type and *Ap_{rt}⁵* mutant heads, focusing on the nervous system isoform *DTH1* (Birman et al. 1994; Friggi-Grelin et al. 2003). Consistent with the immunostaining results, we observed an increase in *DTH1* mRNA level by 54.5% on average ($p < 0.01$) in *Ap_{rt}⁵* mutant heads compared to wild-type flies (Fig. 2A). In order

to have a more complete view of the DA system alterations induced by *Appt* deficiency, we looked at the expression level of other dopaminergic marker genes in this mutant. We focused on three *Drosophila* receptors that are activated only by DA and homologous to vertebrate DA receptors (Mustard et al. 2005): the D₁ receptor ortholog dDA1/Dop1R1 and D₁-like DAMB/Dop1R2 that are both positively coupled to cAMP formation, and the D₂ receptor ortholog dD2R/Dop2R that is negatively coupled to cAMP formation. Remarkably, the level of *dDA1* and *DAMB* mRNAs were elevated by 57.8% ($p < 0.001$) and 37.6% ($p < 0.01$) on average compared to wild-type flies in *Appt*⁵ mutants, respectively, while *dD2R* expression was in contrast not significantly affected (Fig. 2B). Transcript levels of the DA transporter *DAT* were not different in the two fly strains, and the same was true for *engrailed (en)*, a transcription factor which is known to be involved in the early differentiation of DA neurons in mammals and elevated in HGPRT-deficient human cultured cells (Ceballos-Picot et al. 2009) (Fig. S3). These results indicate that *Appt* deficiency enhances the DA neurotransmitter system in the *Drosophila* brain by increasing specifically the expression of TH and two DA receptors, dDA1 and DAMB, that are both positively coupled to cAMP formation. This occurs in particular and prominently at synaptic connections between dopaminergic and MB neurons, where these two DA receptors are known to be enriched (Han et al. 1996; Kim et al. 2003).

To analyze conversely the effect of an overexpression of *Appt* on TH expression, we generated a *UAS-Appt* strain. Using this line, ubiquitous overexpression of *Appt* with the *da-Gal4* driver increased *Appt* mRNA level by around 15 times and *Appt* activity by 80 times in whole flies (Fig. S4A, B). Interestingly, we found that *DTH1* mRNA level was consistently decreased in the heads of these *da>Appt* flies by about 20-25% compared to the driver and effector only controls (Fig. 2C). Therefore, neuronal TH expression decreases when *Appt* level increases, and it is on the opposite increased in an *Appt* mutant. These results indicate a strong regulation of DA synthesis and signaling by the purine recycling pathway in the *Drosophila* brain.

DA system disruption reduces Aprt expression and activity

We then wondered whether a defect in the DA neurotransmitter system could reciprocally affect Aprt activity. To determine if the lack of DA triggers alterations in the purine salvage pathway, we measured Aprt activity in adult flies that have no DA in the brain (Riemensperger et al. 2011) and found that it is strikingly decreased by 72.7% on average in these flies as compared to wild-type controls ($p < 0.001$) (Fig. 3A). Similarly, the *dDA1* mutant allele *dumb*², but not the DAMB mutant *damb*¹, showed reduced Aprt activity by 55.2% compared to wild-type controls ($p < 0.001$) (Fig. 3A). While the DA-deficient flies also showed a strong reduction in *Aprt* transcript level, by 52.7% on average ($p < 0.01$), no such alteration could be detected in *damb*¹ mutants, as expected, but surprisingly not in *dumb*² mutants either (Fig. 3B). This suggests that the decreased Aprt activity in *dumb*² background mainly results from posttranscriptional regulation or, alternatively, that genetic compensation following long-term dDA1 disruption maintains *Aprt* transcription at a normal level in *dumb*² mutants, as previously reported in other systems (Rossi et al. 2015; Housden et al. 2017).

To go further, we knocked down dDA1 expression using a *UAS-dDA1*^{RNAi} line that decreases dDA1 expression to about 30% of the controls when co-expressed with the RNAi booster *Dcr-2* using the pan-neuronal *elav-Gal4* driver (Fig. S5). Interestingly, downregulating *dDA1* in all neurons significantly decreased Aprt activity by about 35% compared to the driver and effector RNAi controls (Fig. 3C) and it also led to a similar reduction in Aprt transcript level (Fig. 3D). So, the lack of dDA1 DA receptor signaling can decrease both Aprt expression and activity, and the apparent discrepancy between dDA1 mutation and knockdown likely involves a genetic compensation mechanism.

Moreover, inactivating dDA1 selectively in all MB intrinsic neurons using the *238Y-Gal4* driver, also led to a reduced Aprt activity in brain by about 25% ($p < 0.05$) (Fig. 3E), indicating that a significant proportion of brain Aprt activity is associated with the MB. Overall, these experiments show that preventing DA signaling, either by a loss of DA synthesis or a downregulation of the DA receptor dDA1, leads to a suppression of Aprt activity.

Loss of *Appt* activity decreases adenosine level and increases *Ent2* expression

Our findings to this point indicated the existence of a prominent homeostatic regulation between the DA system and the purine salvage pathway in the *Drosophila* brain. This prompted us to search for the mechanistic link between these two systems, by focusing on purinergic signaling as the prime suspect, because it is known to interact closely with DA neurotransmission in the mammalian brain. *Appt* catalyzes the conversion of adenine into AMP, and AMP breakdown by 5'-nucleotidase produces adenosine. We therefore suspected that adenosine level could be reduced in the absence of *Appt* activity, leading to alterations in adenosine neurotransmission. Consistent with this, we were able to detect by UPLC a significant decrease in adenosine level either in whole flies (61.0% on average, $p < 0.01$) or in heads (48.0%, $p < 0.05$) in *Appt*⁵ mutants (Fig. 4A).

We then looked at the consequences of this reduction on molecular components of purinergic signaling in flies. Only one adenosine receptor has been characterized in *Drosophila*, named *AdoR*, and three putative Equilibrative nucleoside transporters (*Ent1-3*) have been identified (Sankar et al. 2002) but only one, *Ent2*, showed nucleoside transport activity (Machado et al. 2007). Interestingly, *Ent2* has been shown to be enriched in the MB and its transcript level to be highly elevated in *AdoR* mutant flies (Knight et al. 2010). In *Appt*⁵ background, we also observed a strong increase in *Ent2* mRNAs (2.3 fold higher than wild-type flies, $p < 0.001$), but no noticeable effect on *AdoR* transcript level (Fig. 4B). The increased expression of *Ent2* in *Appt*⁵ mutants could correspond to a compensatory response to adenosine shortage and the resulting lower stimulation of *AdoR* signaling.

Effects of *AdoR* deficiency on the expression of *Appt* and dopaminergic markers

AdoR is highly expressed in adult heads and its ectopic overexpression leads to early larval lethality (Dolezelova et al. 2007). However, a null mutant of this receptor, *AdoR*^{KGex}, in which the entire coding sequence was deleted, is fully viable in adult stage (Wu et al. 2009). The function of this receptor has not been extensively studied in *Drosophila*, in particular with regard to its potential interactions with the DA system

and DA receptors, as occurs in mammals (Franco et al. 2000, Kim and Palmiter 2008). However, a previous study performed in fly larvae showed that an increase in astrocytic Ca^{2+} signaling can silence DA neuron activity through AdoR stimulation on dopaminergic neurons, by a mechanism potentially involving the breakdown of released astrocytic ATP into adenosine (Ma et al. 2016).

We have examined the consequences of a complete lack of AdoR on the purine recycling and DA systems in flies. For that, we quantified transcript levels of *Aprt* and different DA markers in *AdoR*^{KGex} mutant heads. We found that *Aprt* transcripts were decreased by 29.5% on average ($p < 0.001$) (Fig. 4C, left panel), and *Aprt* activity was decreased even more by 78.4% ($p < 0.001$) (Fig. 4C, right panel) in *AdoR*^{KGex} mutants compared to wild-type flies. This suggests that lack of AdoR downregulates this recycling enzyme both at the transcriptional and translational levels. Although *dDA1* and *dD2R* expressions were not significantly affected by the absence of a functional adenosine receptor, *TH* (*DTH1*) and *DAMB* transcripts were increased by 45.4% ($p < 0.001$) and 32.0% ($p < 0.01$) on average, respectively (Fig. 4D). Note that the increase in *DTH1* and *DAMB* expression were in the same proportion in *AdoR*^{KGex} and *Aprt*⁵ mutant heads (see Fig. 2A, B). The elevated *DTH1* expression level in *AdoR*^{KGex} mutants indicates that AdoR could have an inhibitory action on *TH* expression.

AdoR signaling represses TH expression

To verify this hypothesis, we have supplemented the dietary medium with adenosine to induce AdoR desensitization by prolonged exposure to high extracellular levels of its agonist (Mundell and Kelly 2011), in order to monitor effects on *DTH1* expression. As expected, 2 mM adenosine in food induced a strong increase in *AdoR* transcript levels that reached 68.2% on average ($p < 0.05$) after 48 h of administration (Fig. 5A), consistent with the hypothesis that the AdoR receptor was desensitized in these conditions. Furthermore, we have found that *DTH1* transcript level was also significantly increased by 33.1% ($p < 0.01$) in wild-type flies fed with adenosine-supplemented medium, compared to flies with normal food diet (Fig. 5B). Therefore, *DTH1* transcription is increased following AdoR desensitization, which suggests that

AdoR signaling normally inhibits TH expression level and from there DA synthesis in *Drosophila*.

Discussion

Conservation of the purine salvage pathway in *Drosophila* except for HGPRT

The purine salvage pathway is an essential component of cell metabolism in all organisms, from bacteria to humans, that allows the recovery of free purine bases derived from diet or the degradation of nucleic acids and nucleotides, thus avoiding the energy cost of *de novo* purine synthesis (Nyhan 2014). The two recycling enzymes involved in this pathway in mammals are adenine phosphoribosyltransferase (APRT) and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT). In humans, inherited mutations in *HPRT1* strongly increase uric acid levels while complete or nearly complete HGPRT deficiencies trigger LND characterized by dramatic neurobehavioral impairments and self-injurious behavior (Jinnah et al. 2006, Torres and Puig 2007). In contrast, *APRT* null mutations do not affect the nervous system but trigger the formation of 2,8-dihydroxyadenine crystals in blood that can lead to irreversible loss of renal function if not diagnosed and treated for example by allopurinol (Bollée et al. 2010, Bollée et al. 2012, Harambat et al. 2012).

Previous studies on the purine recycling pathway in *Drosophila* go back about 40 years (Becker 1974a, 1974b, 1978, 1980, Johnson et al. 1980a, 1980b, 1980c, Johnson and Friedman 1981, 1983) with essentially no more work performed since then. Compared to humans, the purine *de novo* synthesis and degradation pathways have been largely conserved in flies, except that, as in nearly all species, *Drosophila* express urate oxidase to degrade uric acid into allantoin (Friedman 1973, Wallrath et al. 1990), an enzyme that has been lost only in humans and some great apes (Varela-Echavarria et al. 1988, Alvarez-Lario and Macarr n-Vicente 2010). Similarly, enzymes of the purine salvage pathway have been largely conserved in flies, including Aprt which recycles adenine into AMP, adenosine kinase (AK) which converts adenosine into AMP, adenosine deaminase (ADA) which produces inosine from adenosine and purine nucleoside phosphorylase (PNP) which transforms in mammals hypoxanthine,

guanine and xanthine into inosine, guanosine and xanthosine, respectively and reciprocally (see Fig. S1).

However, we could not identify an HGPRT homologue in the *Drosophila* genome or detect HGPRT-like enzymatic activity in tissue extracts (Petitgas et al., unpublished). This confirmed earlier studies who showed that either housefly ovaries (Miller and Collins 1973) or *Drosophila* cell lines and tissue extracts (Becker 1974a, 1974b) were deficient in HGPRT activity. At variance with mammals and humans, it appears therefore that *Drosophila* and probably other insects are unable to recycle guanine and hypoxanthine through the salvage pathway. Indeed, it has been reported that in the housefly, there is no significant incorporation of radiolabeled hypoxanthine or guanine into nucleic acids, whereas 8-[¹⁴C]-adenine was readily incorporated into the adenine and guanine nucleobases of ovarian DNA (Miller and Collins 1973). This shows that the lack of HGPRT is not compensated by another enzymatic pathway and suggests that adenine is the only purine base that can be efficiently recycled in flies. *Aprt* is therefore the only purine-recycling enzyme in *Drosophila*.

Purine recycling through *Aprt* regulates expansion of the DA system

We have found that an *Aprt* mutation increases brain levels of TH and DA, and the expression of two DA receptors, dDA1 and DAMB. Conversely, ubiquitous *Aprt* overexpression significantly reduced TH expression level. Surprisingly, the effects induced by *Aprt* inactivation on DA neurotransmission in *Drosophila* (i.e. increase in TH and DA) appear to be opposite to those induced by HGPRT deficiency in mammals (i.e. loss of DA and dopaminergic markers in the basal ganglia). However, several earlier publications have shown that the lack of HGPRT activity in LND patients triggers an increase in APRT activity in erythrocytes and liver, but also in the putamen, caudate nucleus, thalamus and cortex (Rosenbloom et al. 1967, Greene et al. 1970, Shin-Buehring et al. 1980, Lloyd et al. 1981). This suggests that the loss of DA in LND patients could result at least in part from a secondary increase in APRT activity consequent to HGPRT deficiency. In line with this assumption, *Aprt* overexpression

should lead to a decrease in DA synthesis, as we have observed in our model. This hypothesis has not yet been tested in rodent models to our knowledge.

Furthermore, while a decrease in DA level is robust in LND, TH downregulation is in contrast controversial. Some studies did not find any decrease in TH immunoreactivity in the substantia nigra of LND patients (Saito et al. 1999) or in HPRT-deficient mice (Jinnah et al. 1994). These authors suggested that DA deficits in the striatum could result from loss of nigrostriatal axonal projections and not to decrease in DA synthesis. Moreover, an upregulation of D₁ and D₂ receptors has been observed in the putamen of LND patients (Saito et al. 1999). Such a DA receptor supersensitivity, possibly induced by the lower presynaptic DA activity, was proposed to play a role in the self-injurious behavior. Indeed, neonatal 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-treated rats exhibited stereotypies and self-mutilation after L-DOPA administration, and this last behavior was completely blocked by D₁, and not D₂, antagonist application (Breese et al. 1984, 1990).

In our study, we also found increased expression of the DA receptors *dDA1* and *DAMB* in *Aprt* mutant heads, but this increase could not be related to a reduced presynaptic DA activity since TH and DA are also increased in this condition. One possibility is that *Aprt* deficiency increases TH and DA receptor levels independently. Indeed in a previous study, we have shown that an increase in neuronal *TH* expression in otherwise wild-type *Drosophila* induced on the opposite a marked decrease in *DAMB* expression (Cassar et al. 2015). Therefore, an increase in *TH* expression can be associated either with a decrease or an increase in *DAMB* expression, depending on the presence or absence of *Aprt* activity, respectively. As discussed below, our current results suggest that the mechanisms by which *Aprt* controls both *TH* and *DAMB* expression depend on AdoR signaling in different cells. In mammals, purine recycling also appears to influence significantly development of the DA system. Cultured mouse DA neurons lacking HGPRT showed dysregulation of transcription and signaling factors normally involved in the early differentiation of midbrain DA neurons (Lewers et al. 2008), an observation that was supported by further studies (Ceballos-Picot et al. 2009, Guibinga et al. 2010, Kang et al. 2011, Guibinga et al. 2012, Torres and Puig,

2015). Therefore, in *Drosophila* like in mammals, purine recycling is an intrinsic regulatory process of particular importance for expression of the molecular phenotype of DA neurons.

Appt activity and expression reciprocally depend on DA signaling

In order to study the consequences of alterations in the DA system on the purine salvage pathway in *Drosophila*, we measured Appt expression in the brain of neural TH-deficient flies, which completely lack DA in the adult brain (Riemensperger et al. 2011), and found a strong decrease, both in enzymatic activity and transcript level. We have also investigated the consequences for Appt expression of downregulation of the DA receptors dDA1 and DAMB, whose expression is increased in *Appt* mutants. Appt activity was found to be strongly reduced in *dDA1* (*dumb*²), but not in *DAMB*, (*damb*¹) mutant flies, whereas its transcript level appeared unaltered in these mutants. As stated above, genetic compensation could explain the discrepancy between the effects on Appt activity and mRNA levels in *dumb*² mutants. Indeed, we observed a similar decrease in Appt activity and transcript level by RNAi knock-down of *dDA1* in all neurons. Moreover, downregulating dDA1 selectively in the MB also led to a significant reduction in Appt activity in head extracts. One explanation could be that with very few dDA1 receptors active at the synapse, the signaling pathway involved in the induction of Appt expression would be absent or highly reduced. This indicates that DA and the dDA1 signaling pathway is required for a regular Appt expression, and so plays a central role in the control of purine recycling in the fly brain, and specifically in the MB.

Overall, our first set of results showed that the Appt enzyme controls DA synthesis in *Drosophila* while it requires DA/dDA1-mediated signaling for a normal induction of its brain activity. Appt catalyzes the transformation of adenine into AMP, and AMP breakdown by 5'-nucleotidase then produces adenosine. Hence, without any active Appt enzyme, one could expect adenosine level to be reduced. This is exactly what we observed in Appt-deficient flies. We have therefore investigated the role of adenosine in the homeostatic correlation between DA neurotransmission and Appt activity.

The regulation of TH expression by *Aprt* is likely mediated by the adenosine receptor *AdoR*

Adenosine is a well-known neuromodulator, released both by neurons and astrocytes, which plays important roles in the regulation of several neurotransmitter systems in the brain (Sachdeva and Gupta 2013). This nucleoside is involved in many motor and cognitive processes, such as sleep-wake cycles, anxiety, depression, epilepsy, learning and memory, or drug addiction (Soliman et al. 2018). In normal metabolic conditions, adenosine is present at low concentrations in the extracellular space and is highly regulated, either taken up by cells by nucleoside transporters and incorporated into ATP stores or deaminated by adenosine deaminase into inosine. In mammals, several nucleoside transporters mediate the uptake of adenosine into cells, named equilibrative and concentrative nucleoside transporters (ENTs and CNTs, respectively) (Gray et al. 2004, Boswell-Casteel and Hays 2017, Pastor-Anglada and Pérez-Torras 2018). Pathological events like hypoxia or ischemia induce ATP or directly adenosine release, leading to a strong increase in extracellular adenosine in the striatum and hippocampus (Dale and Frenguelli 2009, Sperlagh and Vizi 2011).

Such information prompted us to look at the effects of *Aprt* deficiency on the only adenosine receptor in flies, *AdoR*, and the known adenosine transporter, *Ent2*. While we did not observe any alteration in *AdoR* expression in *Aprt* mutants, *Ent2* transcript levels were increased more than 2-fold. Interestingly, one paper reported a strong increase in *Ent2* transporter expression in *AdoR* mutant flies (Knight et al. 2010). This suggests that *AdoR* signaling is less activated in *Aprt*-deficient flies compared to controls. The decrease in adenosine we observed in *Aprt* mutants also supports this hypothesis. The fact that *AdoR* expression was not affected in these conditions suggests that one of the roles of *AdoR* is to inform the cells about the external adenosine concentration and accordingly to regulate *Ent2* expression level.

To go further, we have shown that the absence of *AdoR* induced an increase in *DTH1* and *DAMB* mRNA levels and a decrease in *Aprt* expression and activity. The decrease in *Aprt* is likely related to the strong increase in *Ent2* in the absence of *AdoR* (Knight et al. 2010), which should lead to higher adenosine influx and then *Aprt*

downregulation by a feedback mechanism. It is also interesting to note that the increase in *DTH1* and *DAMB* expression in *AdoR* mutants were in the same range as those observed in *Aprt*-deficient flies. Hence, we can speculate that the elevated *DTH1* and *DAMB* transcript levels in *Aprt* mutants might result from a decrease in AdoR stimulation in these flies, induced by a lower adenosine level. This leads to the conclusion that in normal conditions AdoR would silence TH expression. Although this has never been directly demonstrated in flies, a previous study proposed that octopamine and tyramine can silence DA neurons through a mechanism requiring AdoR, presumably through ATP release from astrocytes and its further breakdown into adenosine (Ma et al. 2016).

In the rat striatum, it has been shown that adenosine transiently modulates DA release (Ross and Venton, 2015), and, more specifically, application of adenosine or selective A₁ adenosine receptor agonists decreased striatal extracellular DA levels, and conversely, selective A₁ antagonists like caffeine increased it (Okada et al. 1996). Here, we demonstrate that the administration of a high amount of adenosine increased *AdoR* expression, indicating that the receptor is probably desensitized or internalized, as expected according to anterior publications (Böhm et al. 1997, Francikowski et al. 2016). Moreover, we show a significant increase in *TH* expression level in these conditions. This indicates that AdoR has an inhibitory action on DA neurons and limits dopaminergic system expansion in *Drosophila*.

A mechanistic scheme is proposed in Fig. 6 that recapitulates the regulations we have described between the DA system, *Aprt* activity and AdoR signaling, which are summarized in the legend to this figure. These regulations as we found take place primarily, but not only, at synapses between the DA and MB neurons in the *Drosophila* brain, suggesting that purine recycling could also play an essential role in the diverse functions of the MB in behavior control, in agreement with previous work (Knight et al. 2010) and our unpublished observations (Petitgas et al. in preparation).

A putative role for adenosine signaling in LND

It has been previously proposed that adenosine could be a mediator of some of the neurological features of LND pathogenesis (Visser et al., 2000). Indeed, some studies showed that adenosine transport is decreased in peripheral blood lymphocytes of LND patients (Torres et al. 2004), as well as A_{2A} adenosine receptor mRNA and protein levels (García et al. 2009, García et al. 2011). In a murine HPRT knockout model of LND, expression of the adenosine A_1 receptor was found to be strongly increased and that of A_{2A} slightly decreased, while the expression of A_{2B} was not affected (Bertelli et al. 2006). Chronic administration of high doses of caffeine, which acts as an antagonist of adenosine receptors in the mammalian brain, caused a self-injurious behavior in rats (Miñana et al. 1984, Jinnah et al. 1990). Moreover, central injection of an adenosine agonist is sufficient to prevent self-mutilation induced by dopamine agonist administration in neonatally 6-OHDA lesioned rats (Criswell et al. 1988). Our new model highlights a role for adenosine and adenosine receptors in the mechanism linking the purine salvage pathway and the DA system. This might be a new strategy to explore in the cure of LND.

In conclusion, although the most probable origin of neurological troubles in LND is a strong and consistent reduction in DA synthesis in the basal ganglia, little is known about the link between HGPRT deficiency and the DA system. Here, we have studied the relation between purine recycling and the DA system in *Drosophila*. We have shown that the modulation of Aprt activity, the only enzyme of the purine salvage pathway in this organism, affects several dopaminergic markers, and that, conversely, alterations in the DA system impacts Aprt activity. We also found evidence that regulation of DA neurotransmission by Aprt is at least in part mediated through a modulation of adenosine receptor signaling. These new insights could help to understand better the neuropathological mechanisms triggered by HGPRT deficiency in LND patients and indicate new therapeutic targets to progress in the cure of this dramatic disease.

Materials and Methods

Drosophila culture and strains

Flies were raised at 25°C on standard corn meal-yeast-agar medium supplemented with an antifungal (methylhydroxybenzoate), under a 12:12h light:dark cycle. For adenosine supplementation, adenosine (A9251, Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA) was diluted in standard food medium at 2 mM and 8-day-old wild-type males flies were transferred on this medium during 48 h before RNA extraction. The following fly strains were used: Canton-S as a wild-type control, *Aprt*⁵ (Johnson and Friedman, 1983) obtained from the Bloomington *Drosophila* Stock Center (BDSC) (line #6882), *w; UAS-DTHg^{FS±}; ple^{2cl}/TM6B* and *w, Ddc-Gal4; TH-Gal4, ple^{2cl}/TM6B* that were crossed to generate brain DA-deficient flies as previously described (Riemensperger et al. 2011), *dumb*² (alias *dDA1^{f02676}*) (Kim et al. 2003, Pitmon et al. 2016) kindly provided by Dr. Tim J. Lebestky (Williams College, Williamstown MA, USA), *damb*¹ (Selcho et al. 2009, Cassar et al. 2015), *AdoR^{KG03964ex}* (Wu et al. 2009) here named *AdoR^{KGex}* (BDSC #30868), *UAS-dDA1^{RNAi}* (BDSC #55239), and the following driver lines: *238Y-Gal4*, *da-Gal4*, *elav-Gal4* (*elav^{C155}*), and *elav-Gal4; UAS-Dcr-2* (BDSC #25750).

To generate a *UAS-Aprt* strain, the In-Fusion HD Cloning Kit (Takara Bio, Kyoto, Japan) has been used according to the manufacturer's instructions. The 549-bp *Aprt* insert was PCR amplified from the BDGP ORF clone BS15201 (*Drosophila* Genomics Resource Center, Bloomington, IN, USA) using primers with added restriction sites (Table S1). After digestion with EcoRI and XbaI, the *Aprt* cDNA was subcloned into the *pUASTattB* vector (Bischof et al. 2007) and the insertion verified by sequencing (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany). The construction was sent to BestGene (Chino Hills, CA, USA) for *Drosophila* germline transformation into the attP14 docking site on the 2d chromosome. The *UAS-Aprt* line yielding the strongest expression was selected and used in the experiments.

Quantitative reverse transcription PCR

For RT-qPCR, total RNA was isolated by standard procedure from 20-30 heads of 8-day-old males collected on ice and lysed in 600 µl QIAzol Lysis Reagent (Qiagen,

Venlo, Netherlands). 1 µg total RNA was reverse transcribed using oligo d(T) primers (PrimeScript RT Reagent Kit, Takara Bio, Kyoto, Japan). Approximately 40 ng of the first strand cDNA was amplified in 10 µl of reaction mixture using the LightCycler 480 SYBR Green I Master reaction mix (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) and a LightCycler 480 Instrument (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). The program cycles included a 10-min preincubation step at 95°C, 40 cycles of amplification (10 s denaturation at 95°C, 10 s annealing at 55°C, 20 s elongation at 72°C), followed by a melting curves analysis for PCR product identification. Data were normalized to amplification level of the ribosomal protein *rp49/RpL32* transcripts as internal control. The genes analyzed and primer sequences used for PCR are indicated in Table S2.

Appt activity assay

APRT enzyme activity was assessed in *Drosophila* by adapting methods previously established for human cells (Cartier and Hamet 1968, Ceballos-Picot et al. 2009). 20 whole male flies or 100 heads, were homogenized in 250 µl or 200 µl, respectively, on 110 mM Tris-10 mM MgCl₂ pH 7.4 (Tris-MgCl₂ buffer), immediately frozen and kept at least one night at -80°C. After 5 min of centrifugation at 13,000 g, the total protein content of each supernatant was measured with the Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) to normalize activity level. The composition of the reaction medium was: 50 µl of a solution of the radioactive solution made with 75 µl of 50 µCi/ml [¹⁴C]-adenine diluted in 1 ml of 1.2 mM cold adenine, and 200 µg protein of the fly extract diluted in Tris-MgCl₂ buffer to 150 µl. The kinetics of [¹⁴C]-adenine conversion to AMP was monitored at 37°C and started by adding 25 µl of the cosubstrate 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP) at 10 mM. After 6, 12, 24 and 36 min, 40 µl of each reaction mixture was transferred in a tube containing 25 µl of AAE solution (3 mM adenine, 6 mM AMP, 200 mM EDTA) and incubated 3 min at 95°C to stop the reaction. The different radioactive compounds were separated by paper chromatography on Whatman 3MM strips using 28% NH₄OH, 50 mM EDTA as solvent for about 1h30. Then, the substrates and products were visualized under an UV lamp at 254 nm and placed separately in vials in 2 ml of

Scintran (VWR, Radnor, PA, USA). The radioactivity in disintegrations per minute (dpm) was measured in a Packard Tri-Carb 1600 TR liquid scintillation analyzer (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). The percentage of substrate transformation as a function of time was converted into nmol/min/mg protein, and finally normalized to wild-type control values.

Immunohistochemistry

Adult brains of 8-10 day-old flies were dissected in ice-cold Ca^{2+} -free *Drosophila* Ringer's solution and processed for whole-mount anti-TH or anti-DA immunostaining as previously described (Riemensperger et al. 2011, Cichewicz et al. 2017). The primary antibodies used were mouse monoclonal anti-TH (1:1000, cat. n° 22941, ImmunoStar, Hudson, WI, USA) and mouse monoclonal anti-DA (1:100, cat. n° AM001, GemacBio, Saint-Jean-d'Illac, France). The secondary antibody was goat anti-mouse conjugated to Alexa Fluor 488 (1:1000, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Brains were mounted with antifade reagent, either Prolong Gold (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) or, alternatively, 65% 2,2'-thiodiethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) (Cichewicz et al. 2017) for DA staining. Images were acquired on a Nikon A1R confocal microscope with identical laser, filter and gain settings for all samples in each experiment. Immunofluorescence intensity levels were quantified using the Fiji software. Experiments were repeated independently at least 3 times on 4 to 6 brains per genotype.

Adenosine assay

Adenosine was determined by Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC). 5 whole flies or 30 heads were homogenized in 120 μl 0.9% (w/v) NaCl using a Minilys apparatus (Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux, France) and frozen at -80°C . After unfreezing and 5 min of microcentrifugation, 20 μl of 10% perchloric acid were added to 70 μl of the supernatant and the mixture was left for 5 min on ice. After a new centrifugation, 20 μl of a neutralization solution (made by mixing 3 volumes of 3 M K_2CO_3 with 1 volume of 6.4 mM NaOH containing 0.4 mg/ml bromothymol blue) were added and the mixture was centrifuged again before injection (5 μl). Samples were analyzed with a UV diode-array detector on an Acquity UPLC HSS T3 column (1,8

µm, 2.1 x 150mm) (Waters Corporation, Milford, MA, USA). The mobile phases consisted in Buffer A (30 mM ammonium acetate, pH 4.0 with 1:10,000 heptafluorobutyric acid (HPFA)) and Buffer B (acetonitrile with 1:10,000 HPFA), using a flow rate of 0.3 ml/min. Chromatographic conditions were: 3.5 min 100% Buffer A, 16.5 min up to 6.3% Buffer B, 2 min up to 100% Buffer B, and 1 min 100% Buffer B. The gradient was then returned over 5 min to 100% Buffer A, restoring the initial conditions. Results were normalized to protein levels for each sample.

Statistics

Statistical analyses were performed with the Prism 6 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). The Student's *t*-test was used to compare two genotypes or conditions, and one-way or two-way ANOVA with Tukey's or Sidak's *post-hoc* multiple comparison tests for three or more conditions. Results are presented as mean \pm SEM. Probability values in all figures: **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Tim J. Lebestky for *Drosophila* stocks and Drs Laurent Seugnet and Thomas Riemensperger for helpful discussion. This work was supported by fundings from PSL Research University and ESPCI Paris to SB and Institut de France to ICP. CP was recipient of PhD fellowships from Lesch-Nyhan Action (LNA) association, Malaury association and Labex MemoLife.

Authors contributions

Céline Petitgas: Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Writing—original draft, Writing—review and editing; Rebecca Fima, Investigation; Sandrine Marie: Investigation, Methodology; Irène Ceballos-Picot: Conceptualization, Supervision, Validation, Funding acquisition, Writing—original draft, Writing—review and editing; Serge Birman: Conceptualization, Supervision, Validation, Project administration, Funding acquisition, Writing—original draft, Writing—review and editing

References

- Alvarez-Lario, B., and Macarron-Vicente, J., 2010. « Uric acid and evolution ». *Rheumatology* 49 (11): 2010-15. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq204>.
- Artiushin, G., and Amita S., 2017. « The *Drosophila* circuitry of sleep-wake regulation ». *Current Opinion in Neurobiology* 44: 243-50. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.03.004>.
- Baumeister, A.A., and Frye, G.D., 1985. « The biochemical basis of the behavioral disorder in the Lesch-Nyhan syndrome ». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 9 (2): 169-78. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(85\)90043-0](https://doi.org/10.1016/0149-7634(85)90043-0).
- Becker, J.-L., 1974a. « Purine metabolism pathways in *Drosophila* cells growth “in vitro”: phosphoribosyl transferase activities ». *Biochimie* 56 (5): 779-81. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(74\)80051-9](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(74)80051-9).
- Becker, J.-L., 1974b. « Purine metabolism in *Drosophila melanogaster* cells in culture in vitro: purine interconversion [in French]. » *Biochimie* 56 (9): 1249-53. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(74\)80018-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(74)80018-0).
- Becker, J.-L., 1978. « Regulation of purine biosynthesis in cultured *Drosophila melanogaster* cells: I. Conditional activity of hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransferase and 5-nucleotidase ». *Biochimie* 60 (6): 619-25. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(78\)80780-9](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(78)80780-9).
- Becker, J.-L., 1980. « Regulation of purine biosynthesis in cultured *Drosophila melanogaster* cells: II. Relationships between hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl transferase and 5'-nucleotidase ». *Biochimie* 62 (10): 665-70. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(80\)80023-X](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(80)80023-X).
- Bell, S., Kolobova, I., Crapper, L., and Ernst, C., 2016. « Lesch-Nyhan syndrome: models, theories, and therapies ». *Molecular Syndromology* 7 (6): 302-11. <https://doi.org/10.1159/000449296>.
- Bertelli, M., Cecchin, S., Lapucci, C., Jacomelli, G., Jinnah, H.A., Pandolfo, M., and Micheli, V., 2006. « Study of the adenosinergic system in the brain of HPRT knockout mouse (Lesch-Nyhan disease) ». *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 373 (1-2): 104-7. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.05.013>.
- Birman, S., Morgan, B., Anzivino, M., and Hirsh, J., 1994. « A novel and major isoform of tyrosine hydroxylase in *Drosophila* is generated by alternative RNA processing. » *Journal of Biological Chemistry* 269 (42): 26559-67.
- Bischof, J., Maeda, R.K., Hediger, M., Karch, F., and Basler, K., 2007. « An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific PhiC31 integrases ».

Proceedings of the National Academy of Sciences 104 (9): 3312-17.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0611511104>.

Böhm, S.K., Grady E.F., and Bunnett, N.W., 1997. « Regulatory mechanisms that modulate signaling by G-protein-coupled receptors ». *Biochemical Journal* 322 (1): 1-18. <https://doi.org/10.1042/bj3220001>.

Bollée, G., Dollinger, C., Boutaud, L., Guillemot, D., Bensman, A., Harambat, J., Deteix, P., Daudon, M., Knebelmann, B., and Ceballos-Picot, I., 2010. « Phenotype and genotype characterization of adenine phosphoribosyltransferase deficiency ». *Journal of the American Society of Nephrology* 21 (4): 679-88.

<https://doi.org/10.1681/ASN.2009080808>.

Bollée, G., Harambat, J., Bensman, A., Knebelmann, B., Daudon, M., and Ceballos-Picot, I. 2012. « Adenine phosphoribosyltransferase deficiency ». *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 7 (9): 1521-27.

<https://doi.org/10.2215/CJN.02320312>.

Boswell-Casteel, R.C., and Hays, F.A., 2017. « Equilibrative nucleoside transporters-a review ». *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 36 (1): 7-30.

<https://doi.org/10.1080/15257770.2016.1210805>.

Breese, G.R., Baumeister, A.A., McCown, T.J., Emerick, S.G., Frye, G.D., Crotty, K., and Mueller, R.A., 1984. « Behavioral differences between neonatal and adult 6-hydroxydopamine-treated rats to dopamine agonists: relevance to neurological symptoms in clinical syndromes with reduced brain dopamine ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 231 (2): 343-54.

Breese, G.R., Criswell, H.E., Duncan, G.E., and Mueller, R.A., 1990. « A dopamine deficiency model of Lesch-Nyhan disease—the neonatal-6-OHDA-lesioned rat ». *Brain Research Bulletin* 25 (3): 477–484. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(90\)90240-Z](https://doi.org/10.1016/0361-9230(90)90240-Z).

Cartier, P., and Hamet, M., 1968. « Determination of the purine phosphoribosyl transferase activity of human red cells [in French]. » *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 20 (2): 205-14. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(68\)90152-6](https://doi.org/10.1016/0009-8981(68)90152-6).

Cassar, M., Issa, A.-R., Riemensperger, T., Petitgas, C., Rival, T., Coulom, H., Iche-Torres, M., Han, K.-A., and Birman, S., 2015. « A dopamine receptor contributes to paraquat-induced neurotoxicity in *Drosophila* ». *Human Molecular Genetics* 24 (1): 197-212.

<https://doi.org/10.1093/hmg/ddu430>.

Ceballos-Picot, I., Mockel, L., Potier, M.-C., Dauphinot, L., Shirley, T.L., Torero-Ibad, R., Fuchs, J., and Jinnah, H.A., 2009. « Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase regulates early developmental programming of dopamine neurons: implications for Lesch-Nyhan disease pathogenesis ». *Human Molecular Genetics* 18 (13): 2317-27.

<https://doi.org/10.1093/hmg/ddp164>.

Cichewicz, K., Garren, E.J., Adiele, C., Aso, Y., Wang, Z., Wu, M., Birman, S., Rubin, G.M., and Hirsh, J., 2017. « A new brain dopamine-deficient *Drosophila* and its pharmacological and genetic rescue ». *Genes, Brain and Behavior* 16 (3): 394-403. <https://doi.org/10.1111/gbb.12353>.

Cognigni, P., Felsenberg, J., and Waddell, S., 2018. « Do the right thing: neural network mechanisms of memory formation, expression and update in *Drosophila* ». *Current Opinion in Neurobiology* 49: 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.12.002>.

Criswell, H., Mueller, R.A., and Breese, G.R., 1988. « Assessment of purine-dopamine interactions in 6-hydroxydopamine-lesioned rats: evidence for pre- and postsynaptic influences by adenosine ». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 244 (2): 493-500.

Dale, N., and Frenguelli, B.G., 2009. « Release of adenosine and ATP during ischemia and epilepsy ». *Current Neuropharmacology* 7 (3): 160-79. <https://doi.org/10.2174/157015909789152146>.

Dolezelova, E., Nothacker, H.-P., Civelli, O., Bryant, P.J., and Zurovec, M., 2007. « A *Drosophila* adenosine receptor activates cAMP and calcium signaling ». *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37 (4): 318-29. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.12.003>.

Dung, V.M., and Thao, D.T.P., 2018. « Parkinson's disease model ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1076: 41-61. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0529-0_4.

Ernst, M., Zametkin, A.J., Matochik, J.A., Pascualvaca, D., Jons, P.H., Hardy, K., Hankerson, J.G., Doudet, D.J., and Cohen, R.M., 1996. « Presynaptic dopaminergic deficits in Lesch–Nyhan disease ». *New England Journal of Medicine* 334 (24): 1568–1572. <https://doi.org/10.1056/NEJM199606133342403>.

Fernández-Hernández, I., Scheenaard, E., Pollarolo, G., and Gonzalez, C., 2016. « The translational relevance of *Drosophila* in drug discovery ». *EMBO Reports* 17 (4): 471-72. <https://doi.org/10.15252/embr.201642080>.

Finger, S., Heavens, R.P., Sirinathsinghji, D.J., Kuehn, M.R., and Dunnett, S.B., 1988. « Behavioral and neurochemical evaluation of a transgenic mouse model of Lesch–Nyhan syndrome ». *Journal of the Neurological Sciences* 86 (2-3): 203-13. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(88\)90099-8](https://doi.org/10.1016/0022-510x(88)90099-8).

Francikowski, J., Baran, B., Płachetka-Bożek, A., Krzyżowski, M., and Augustyniak, M., 2016. « Caffeine effects on AdoR mRNA expression in *Drosophila melanogaster* ». *Open Life Sciences* 11 (1): 244-49. <https://doi.org/10.1515/biol-2016-0034>.

Franco, R., Ferré, S., Agnati, L., Torvinen, M., Ginés, S., Hillion, J., Casadó, V., Lledó, P.-M., Zoli, M., Lluís, C., et al., 2000. « Evidence for adenosine/dopamine receptor

interactions: indications for heteromerization ». *Neuropsychopharmacology* 23: S50–S59. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00144-5](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00144-5).

Friedman, T.B., 1973. « Observations on the regulation of uricase activity during development of *Drosophila melanogaster* ». *Biochemical Genetics* 8 (1): 37–45. <https://doi.org/10.1007/bf00485555>.

Friggi-Grelín, F., Iché M., and Birman, S., 2003. « Tissue-specific developmental requirements of *Drosophila* tyrosine hydroxylase isoforms ». *Genesis* 35 (3): 260–69. <https://doi.org/10.1002/gene.1082>.

Fu, R., Ceballos-Picot, I., Torres, R.J., Larovere, L.E., Yamada, Y., Nguyen, K.V., Hegde, M., Visser, J.E., Schretlen, D.J., Nyhan, W.L., et al., 2014. « Genotype-phenotype correlations in neurogenetics: Lesch-Nyhan disease as a model disorder ». *Brain* 137 (5): 1282–1303. <https://doi.org/10.1093/brain/awt202>.

Fu, R., and Jinnah, H.A., 2012. « Genotype-phenotype correlations in Lesch-Nyhan disease: moving beyond the gene ». *Journal of Biological Chemistry* 287 (5): 2997–3008. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.317701>.

García, M.G., Puig, J.G., and Torres, R.J., 2012. « Adenosine, Dopamine and Serotonin Receptors Imbalance in Lymphocytes of Lesch-Nyhan Patients ». *Journal of Inherited Metabolic Disease* 35 (6): 1129–35. <https://doi.org/10.1007/s10545-012-9470-5>.

García, M.G., Puig, J.G., and Torres, R.J., 2009. « Abnormal adenosine and dopamine receptor expression in lymphocytes of Lesch–Nyhan patients ». *Brain, Behavior, and Immunity* 23 (8): 1125–31. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.07.006>.

Gatto, C.L., and Broadie K., 2011. « *Drosophila* modeling of heritable neurodevelopmental disorders ». *Current Opinion in Neurobiology* 21 (6): 834–41. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.04.009>.

Göttle, M., Prudente, C.N., Fu, R., Sutcliffe, D., Pang, H., Cooper, D., Veledar, E., Glass, J.D., Gearing, M., Visser, J.E., et al., 2014. « Loss of dopamine phenotype among midbrain neurons in Lesch-Nyhan disease ». *Annals of Neurology* 76 (1): 95–107. <https://doi.org/10.1002/ana.24191>.

Gray, J.H., Owen, R.P., and Giacomini, K.M., 2004. « The concentrative nucleoside transporter family, SLC28 ». *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 447 (5): 728–34. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1107-y>.

Greene, M.L., Boyle, J.A., and Seegmiller, J.E., 1970. « Substrate stabilization: genetically controlled reciprocal relationship of two human enzymes ». *Science* 167 (3919): 887–89. <https://doi.org/10.1126/science.167.3919.887>.

Guibinga, G.-H., Hrustanovic, G., Bouic, K., Jinnah, H.A., and Friedmann, T., 2012. « MicroRNA-mediated dysregulation of neural developmental genes in HPRT

deficiency: clues for Lesch-Nyhan disease? » *Human Molecular Genetics* 21 (3): 609-22.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddr495>.

Guibinga, G.-H., Hsu, S., and Friedmann, T., 2010. « Deficiency of the housekeeping gene hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) dysregulates neurogenesis ». *Molecular Therapy* 18 (1): 54-62.
<https://doi.org/10.1038/mt.2009.178>.

Han, K.-A., Millar, N.S., Grotewiel, M.S., and Davis, R.L., 1996. « DAMB, a novel dopamine receptor expressed specifically in *Drosophila* mushroom bodies ». *Neuron* 16 (6): 1127-35. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80139-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80139-7).

Harambat, J., Bollée, G., Daudon, M., Ceballos-Picot, I., and Bensman, A., 2012. « Adenine phosphoribosyltransferase deficiency in children ». *Pediatric Nephrology* 27 (4): 571-79. <https://doi.org/10.1007/s00467-011-2037-0>.

Holland, C., Lipsett, D.B., and Clark, D.V., 2011. « A link between impaired purine nucleotide synthesis and apoptosis in *Drosophila Melanogaster* ». *Genetics* 188 (2): 359-67. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.124222>.

Housden, B.E., Muhar, M., Gemberling, M., Gersbach, C.A., Stainier, D.Y.R., Seydoux, G., Mohr, S.E., Zuber, J., and Perrimon, N., 2017. « Loss-of-function genetic tools for animal models: cross-species and cross-platform differences ». *Nature Reviews. Genetics* 18 (1): 24-40. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.118>.

Jaiswal, M., Sandoval, H., Zhang, K., Bayat, V., and Bellen, H.J., 2012. « Probing mechanisms that underlie human neurodegenerative diseases in *Drosophila* ». *Annual Review of Genetics* 46: 371-96. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155456>.

Jinnah, H.A., Ceballos-Picot, I., Torres, R.J., Visser, J.E., Schretlen, D.J., Verdu, A., Larovere, L.E., Chen, C.-J., Cossu, A., Wu, C.-H., et al., 2010. « Attenuated variants of Lesch-Nyhan disease ». *Brain* 133 (3): 671-89. <https://doi.org/10.1093/brain/awq013>.

Jinnah, H.A., Page, T., and Friedmann, T., 1993. « Brain purines in a genetic mouse model of Lesch-Nyhan Disease ». *Journal of Neurochemistry* 60 (6): 2036-45.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb03488.x>.

Jinnah, H.A., Visser, J.E., Harris, J.C., Verdu, A., Larovere, L., Ceballos-Picot, I., Gonzalez-Alegre, P., Neychev, V., Torres, R.J., Dulac, O., et al. 2006. « Delineation of the motor disorder of Lesch-Nyhan disease ». *Brain* 129 (Pt 5): 1201-17.
<https://doi.org/10.1093/brain/awl056>.

Jinnah, H.A., Wojcik, B.E., Hunt, M., Narang, N., Lee, K.Y., Goldstein, M., Wamsley, J.K., Langlais, P.J., and Friedmann, T., 1994. « Dopamine deficiency in a genetic mouse model of Lesch-Nyhan disease ». *The Journal of Neuroscience* 14 (3): 1164-75.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-03-01164.1994>.

- Jinnah, H.A., Gage, F.H., and Friedmann, T., 1990. « Animal models of Lesch-Nyhan syndrome ». *Brain Research Bulletin* 25 (3): 467-75. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(90\)90239-V](https://doi.org/10.1016/0361-9230(90)90239-V).
- Johnson, D.H., and Friedman, T.B., 1983. « Purine-resistant *Drosophila melanogaster* result from mutations in the adenine phosphoribosyltransferase structural gene ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80 (10): 2990-94. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.10.2990>.
- Johnson, D.H., Edström, J.-E., Burnett, J.B., and Friedman, T.B., 1987. « Cloning of a *Drosophila melanogaster* adenine phosphoribosyltransferase structural gene and deduced amino acid sequence of the enzyme ». *Gene* 59 (1): 77-86. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90268-X](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90268-X).
- Johnson, D.H., and Friedman, T.B., 1981. « Purine resistant mutants of *Drosophila* are adenine phosphoribosyltransferase deficient ». *Science* 212 (4498): 1035-36. <https://doi.org/10.1126/science.212.4498.1035>.
- Johnson, M.M., Nash, D., and Henderson, J.F., 1980a. « Metabolism of adenosine in larvae of *Drosophila melanogaster* ». *Comparative Biochemistry and Physiology* 66B (4): 549-53. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(80\)90247-3](https://doi.org/10.1016/0305-0491(80)90247-3).
- Johnson, M.M., Nash, D., and Henderson, J.F., 1980b. « Metabolism of guanine and guanosine in larvae of *Drosophila melanogaster* ». *Comparative Biochemistry and Physiology* 66B (4): 563-67. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(80\)90249-7](https://doi.org/10.1016/0305-0491(80)90249-7).
- Johnson, M.M., Nash, D., and Henderson, J.F., 1980c. « Purine metabolism in larvae of *Drosophila melanogaster* fed radioactive hypoxanthine, inosine or formate ». *Comparative Biochemistry and Physiology* 66B (4): 555-61. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(80\)90248-5](https://doi.org/10.1016/0305-0491(80)90248-5).
- Kang, T.H., Guibinga, G.-H., and Friedmann, T., 2011. « HPRT deficiency coordinately dysregulates canonical Wnt and presenilin-1 signaling: a neuro-developmental regulatory role for a housekeeping gene? » Édité par Mark Mattson. *PLoS One* 6 (1): e16572. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016572>.
- Kasture, A.S., Hummel, T., Sucic, S., and Freissmuth, M., 2018. « Big lessons from tiny flies: *Drosophila Melanogaster* as a model to explore dysfunction of dopaminergic and serotonergic neurotransmitter systems ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (6): pii: E1788. <https://doi.org/10.3390/ijms19061788>.
- Kelley, W.N., Rosenbloom, F.M., Henderson, J.F., and Seegmiller, J.E., 1967. « A specific enzyme defect in gout associated with overproduction of uric acid ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 57 (6): 1735-39. <https://doi.org/10.1073/pnas.57.6.1735>.

- Kim, D.S., and Palmiter, R.D., 2008. « Interaction of dopamine and adenosine receptor function in behavior: studies with dopamine-deficient mice ». *Frontiers in Bioscience* 13 (janvier): 2311-18. <https://doi.org/10.2741/2845>.
- Kim, Y.-C., Lee, H.-G., Seong, C.-S., and Han, K.-A., 2003. « Expression of a D1 dopamine receptor dDA1/DmDOP1 in the central nervous system of *Drosophila Melanogaster* ». *Gene Expression Patterns* 3 (2): 237-45. [https://doi.org/10.1016/S1567-133X\(02\)00098-4](https://doi.org/10.1016/S1567-133X(02)00098-4).
- Knapp, D.J., and Breese, G.R., 2016. « The use of perinatal 6-hydroxydopamine to produce a rodent model of Lesch-Nyhan disease ». *Current Topics in Behavioral Neurosciences* 29: 265-77. https://doi.org/10.1007/7854_2016_444.
- Knight, D., Harvey, P.J., Iliadi, K.G., Klose, M.K., Iliadi, N., Dolezelova, E., Charlton, M.P., Zurovec, M., and Boulianne, G.L., 2010. « Equilibrative nucleoside transporter 2 regulates associative learning and synaptic function in *Drosophila* ». *Journal of Neuroscience* 30 (14): 5047-57. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6241-09.2010>.
- Lahaye, C., Augé, F., Soubrier, M., and Ceballos-Picot, I., 2014. « New mutation affecting hypoxanthine phosphoribosyltransferase responsible for severe tophaceous gout ». *The Journal of Rheumatology* 41 (6): 1252-54. <https://doi.org/10.3899/jrheum.131168>.
- Lesch, M., and Nyhan W.L., 1964. « A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function ». *The American Journal of Medicine* 36 (4): 561-70. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(64\)90104-4](https://doi.org/10.1016/0002-9343(64)90104-4).
- Lewers, J.C., Ceballos-Picot, I., Shirley, T.L., Mockel, L., Egami, K., and Jinnah, H.A., 2008. « Consequences of impaired purine recycling in dopaminergic neurons ». *Neuroscience* 152 (3): 761-72. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.10.065>.
- Lloyd, K.G., Hornykiewicz, O., Davidson, L., Shannak, K., Farley, I., Goldstein, M., Shibuya, M., Kelley, W.N., and Fox, I.H., 1981. « Biochemical evidence of dysfunction of brain neurotransmitters in the Lesch-Nyhan syndrome ». *New England Journal of Medicine* 305 (19): 1106-11. <https://doi.org/10.1056/NEJM198111053051902>.
- Ma, Z., Stork, T., Bergles, D.E., and Freeman, M.R., 2016. « Neuromodulators signal through astrocytes to alter neural circuit activity and behaviour ». *Nature* 539 (7629): 428-32. <https://doi.org/10.1038/nature20145>.
- Machado, J., Abdulla, P., Hanna, W.J.B., Hilliker, A.J., and Coe, I.R., 2007. « Genomic analysis of nucleoside transporters in *Diptera* and functional characterization of *DmENT2*, a *Drosophila* equilibrative nucleoside transporter ». *Physiological Genomics* 28 (3): 337-47. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00087.2006>.
- Madeo, A., Di Rocco, M., Brassier, A., Bahi-Buisson, N., De Lonlay, P., and Ceballos-Picot, I., 2019. « Clinical, biochemical and genetic characteristics of a cohort of 101

- French and Italian patients with HPRT deficiency ». *Molecular Genetics and Metabolism* 127 (2): 147-57. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.06.001>.
- McGurk, L., Berson, A., and Bonini, N.M., 2015. « *Drosophila* as an *in vivo* model for human neurodegenerative disease ». *Genetics* 201 (2): 377-402. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.179457>.
- Meek, S., Thomson, A.J., Sutherland, L., Sharp, M.G.F., Thomson, J., Bishop, V., Meddle, S.L., Gloaguen, Y., Weidt, S., Singh-Dolt, K., et al., 2016. « Reduced levels of dopamine and altered metabolism in brains of HPRT knock-out rats: a new rodent model of Lesch-Nyhan Disease ». *Scientific Reports* 6 (mai): 25592. <https://doi.org/10.1038/srep25592>.
- Miller, S., and Collins, J.M., 1973. « Metabolic purine pathways in the developing ovary of the housefly, *Musca domestica* ». *Comparative Biochemistry and Physiology* 44B (4): 1153-63. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(73\)90267-8](https://doi.org/10.1016/0305-0491(73)90267-8).
- Miñana, M.D., Portolés, M., Jordá, A., and Grisolia, S., 1984. « Lesch-Nyhan syndrome, caffeine model: increase of purine and pyrimidine enzymes in rat brain ». *Journal of Neurochemistry* 43 (6): 1556-60. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1984.tb06078.x>.
- Mundell, S., and Kelly, E., 2011. « Adenosine receptor desensitization and trafficking ». *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1808 (5): 1319-28. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.06.007>.
- Mustard, J.A., Beggs, K.T., and Mercer, A.R., 2005. « Molecular biology of the invertebrate dopamine receptors ». *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 59 (3): 103-17. <https://doi.org/10.1002/arch.20065>.
- Nagoshi, E., 2018. « *Drosophila* models of sporadic Parkinson's disease ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (11): 3343. <https://doi.org/10.3390/ijms19113343>.
- Nyhan, W.L., 1997. « The recognition of Lesch-Nyhan syndrome as an inborn error of purine metabolism ». *Journal of Inherited Metabolic Disease* 20 (2): 171-78. <https://doi.org/10.1023/A:1005348504512>.
- Nyhan, W.L., 2000. « Dopamine function in Lesch-Nyhan disease. » *Environmental Health Perspectives* 108 (Suppl 3): 409-11. <https://doi.org/10.1289/ehp.00108s3409>.
- Nyhan, W.L., 2014. « Nucleotide synthesis via salvage pathway ». In *ELS*, édité par John Wiley & Sons Ltd. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001399.pub3>.
- Okada, M., Mizuno, K., and Kaneko, S., 1996. « Adenosine A1 and A2 receptors modulate extracellular dopamine levels in rat striatum ». *Neuroscience Letters* 212 (1): 53-56. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12780-4](https://doi.org/10.1016/0304-3940(96)12780-4).

Oriel, C., and Lasko, P., 2018. « Recent developments in using *Drosophila* as a model for human genetic disease ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (7): 2041. <https://doi.org/10.3390/ijms19072041>.

Papanikolopoulou, K., Mudher, A., and Skoulakis, E., 2019. « An assessment of the translational relevance of *Drosophila* in drug discovery ». *Expert Opinion on Drug Discovery* 14 (3): 303-13. <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1569624>.

Pastor-Anglada, M., and Pérez-Torras, S., 2018. « Emerging roles of nucleoside transporters ». *Frontiers in Pharmacology* 9: 606. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00606>.

Perrimon, N., Bonini, N.M., and Dhillon, P., 2016. « Fruit flies on the front line: the translational impact of *Drosophila* ». *Disease Models & Mechanisms* 9 (3): 229-31. <https://doi.org/10.1242/dmm.024810>.

Pitmon, E., Stephens, G., Parkhurst, S.J., Wolf, F.W., Kehne, G., Taylor, M., and Lebestky, T., 2016. « The D1 family dopamine receptor, DopR, potentiates hind leg grooming behavior in *Drosophila* ». *Genes, Brain and Behavior* 15 (3): 327-34. <https://doi.org/10.1111/gbb.12264>.

Riemensperger, T., Isabel, G., Coulom, H., Neuser, K., Seugnet, L., Kume, K., Iche-Torres, M., Cassar, M., Strauss, R., Preat, T., et al., 2011. « Behavioral consequences of dopamine deficiency in the *Drosophila* central nervous system ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (2): 834-39. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010930108>.

Rosenbloom, F.M., Kelley, W.N., Miller, J., Henderson, J.F., and Seegmiller, J.E., 1967. « Inherited disorder of purine metabolism. Correlation between central nervous system dysfunction and biochemical defects ». *JAMA* 202 (3): 175-77. <https://doi.org/10.1001/jama.202.3.175>.

Ross, A.E., and Venton, B.J., 2015. « Adenosine transiently modulates stimulated dopamine release in the caudate-putamen via A1 receptors ». *Journal of Neurochemistry* 132 (1): 51-60. <https://doi.org/10.1111/jnc.12946>.

Rossi, A., Kontarakis, Z., Gerri, C., Nolte, H., Hölper, S., Krüger, M., and Stainier, D.Y.R., 2015. « Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns ». *Nature* 524 (7564): 230-33. <https://doi.org/10.1038/nature14580>.

Sachdeva, S., and Gupta, M., 2013. « Adenosine and its receptors as therapeutic targets: an overview ». *Saudi Pharmaceutical Journal* 21 (3): 245-53. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.011>.

Saito, Y., Ito, M., Hanaoka, S., Ohama, E., Akaboshi, S., and Takashima, S., 1999. « Dopamine receptor upregulation in Lesch-Nyhan syndrome: a postmortem study ». *Neuropediatrics* 30 (2): 66-71. <https://doi.org/10.1055/s-2007-973462>.

- Saito, Y., and Takashima, S., 2000. « Neurotransmitter changes in the pathophysiology of Lesch–Nyhan syndrome ». *Brain and Development* 22 (septembre): S122-31.
[https://doi.org/10.1016/S0387-7604\(00\)00143-1](https://doi.org/10.1016/S0387-7604(00)00143-1).
- Sankar, N., Machado, J., Abdulla, P., Hilliker, A.J., and Coe, I.R., 2002. « Comparative genomic analysis of equilibrative nucleoside transporters suggests conserved protein structure despite limited sequence identity ». *Nucleic Acids Research* 30 (20): 4339-50.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkf564>.
- Schretlen, D.J., Ward, J., Meyer, S.M., Yun, J., Puig, J.G., Nyhan, W.L., Jinnah, H.A., and Harris, J.C., 2005. « Behavioral aspects of Lesch-Nyhan disease and its variants ». *Developmental Medicine and Child Neurology* 47 (10): 673-77.
<https://doi.org/10.1017/S0012162205001374>.
- Seegmiller, J.E., Rosenbloom, F.M., and Kelley, W.N., 1967. « Enzyme defect associated with a sex-linked human neurological disorder and excessive purine synthesis ». *Science (New York, N.Y.)* 155 (3770): 1682-84.
<https://doi.org/10.1126/science.155.3770.1682>.
- Selcho, M., Pauls, D., Han, K.-A., Stocker, R.F., and Thum, A.S., 2009. « The role of dopamine in *Drosophila* larval classical olfactory conditioning ». *PloS One* 4 (6): e5897.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005897>.
- Shin-Buehring, Y.S., Osang, M., Wirtz, A., Haas, B., Rahm, P., and Schaub, J., 1980. « Prenatal diagnosis of Lesch-Nyhan syndrome and some characteristics of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase and adenine phosphoribosyltransferase in human tissues and cultivated cells ». *Pediatric Research* 14 (6): 825-29. <https://doi.org/10.1203/00006450-198006000-00010>.
- Soliman, A.M., Fathalla, A.M., and Moustafa, A.A., 2018. « Adenosine role in brain functions: pathophysiological influence on Parkinson's disease and other brain disorders ». *Pharmacological Reports* 70 (4): 661-67.
<https://doi.org/10.1016/j.pharep.2018.02.003>.
- Sperlágh, B., and Vizi, S., 2011. « The role of extracellular adenosine in chemical neurotransmission in the hippocampus and basal ganglia: pharmacological and clinical aspects ». *Current Topics in Medicinal Chemistry* 11 (8): 1034-46.
<https://doi.org/10.2174/156802611795347564>.
- Sun, J., Xu, A.Q., Giraud, J., Poppinga, H., Riemensperger, T., Fiala, A., and Birman, S., 2018. « Neural control of startle-induced locomotion by the mushroom bodies and associated neurons in *Drosophila* ». *Frontiers in Systems Neuroscience* 12 (mars): 6.
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2018.00006>.
- Torres, R.J., and Puig, J.G., 2015. « Hypoxanthine deregulates genes involved in early neuronal development. Implications in Lesch-Nyhan disease pathogenesis ». *Journal of*

Inherited Metabolic Disease 38 (6): 1109-18. <https://doi.org/10.1007/s10545-015-9854-4>.

Torres, R.J., Deantonio, I., Prior, C., and Puig, J.G., 2004. « Adenosine transport in peripheral blood lymphocytes from Lesch-Nyhan patients ». *Biochemical Journal* 377 (Pt 3): 733-39. <https://doi.org/10.1042/BJ20031035>.

Torres, R.J., Prior, C., and Puig, J.G., 2007. « Efficacy and safety of allopurinol in patients with hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency ». *Metabolism* 56 (9): 1179-86. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2007.04.013>.

Torres, R.J., and Puig, J.G., 2007. « Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome ». *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2 (1): 48. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-2-48>.

Varela-Echavarría, A., Cañedo, L., and Barrera-Saldaña, H.A., 1988. « Human uricase loss: an evolutionary gain against disease ». In *Cell Function and Disease*, édité par L. E. Cañedo, L. E. Todd, L. Packer, et J. Jaz, 219-23. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0813-3_19.

Visser, J.E., Bär, P.R., and Jinnah, H.A., 2000. « Lesch–Nyhan disease and the basal ganglia ». *Brain Research Reviews* 32 (2–3): 449-75. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(99\)00094-6](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(99)00094-6).

Visser, J.E., Schretlen, D.J., Bloem, B.R., and Jinnah, H.A., 2011. « Levodopa is not a useful treatment for Lesch-Nyhan disease ». *Movement disorders* 26 (4): 746-49. <https://doi.org/10.1002/mds.23478>.

Wallrath, L.L., Burnett, J.B., and Friedman, T.B., 1990. « Molecular characterization of the *Drosophila melanogaster* urate oxidase gene, an ecdysone-repressible gene expressed only in the malpighian tubules. » *Molecular and Cellular Biology* 10 (10): 5114-27. <https://doi.org/10.1128/MCB.10.10.5114>.

Wong, D.F., Harris, J.C., Naidu, S., Yokoi, F., Marengo, S., Dannals, R.F., Ravert, H.T., Yaster, M., Evans, A., Rousset, O., et al., 1996. « Dopamine transporters are markedly reduced in Lesch-Nyhan disease *in vivo* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (11): 5539-43. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.11.5539>.

Wu, M.N., Ho, K., Crocker, A., Yue, Z., Koh, K., and Sehgal, A., 2009. « The effects of caffeine on sleep in *Drosophila* require PKA activity, but not the adenosine receptor ». *The Journal of Neuroscience* 29 (35): 11029-37. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1653-09.2009>.

Yamamoto, S., and Seto, E.S., 2014. « Dopamine dynamics and signaling in *Drosophila*: an overview of genes, drugs and behavioral paradigms ». *Experimental Animals* 63 (2): 107–119. <https://doi.org/10.1538/expanim.63.107>.

Figures

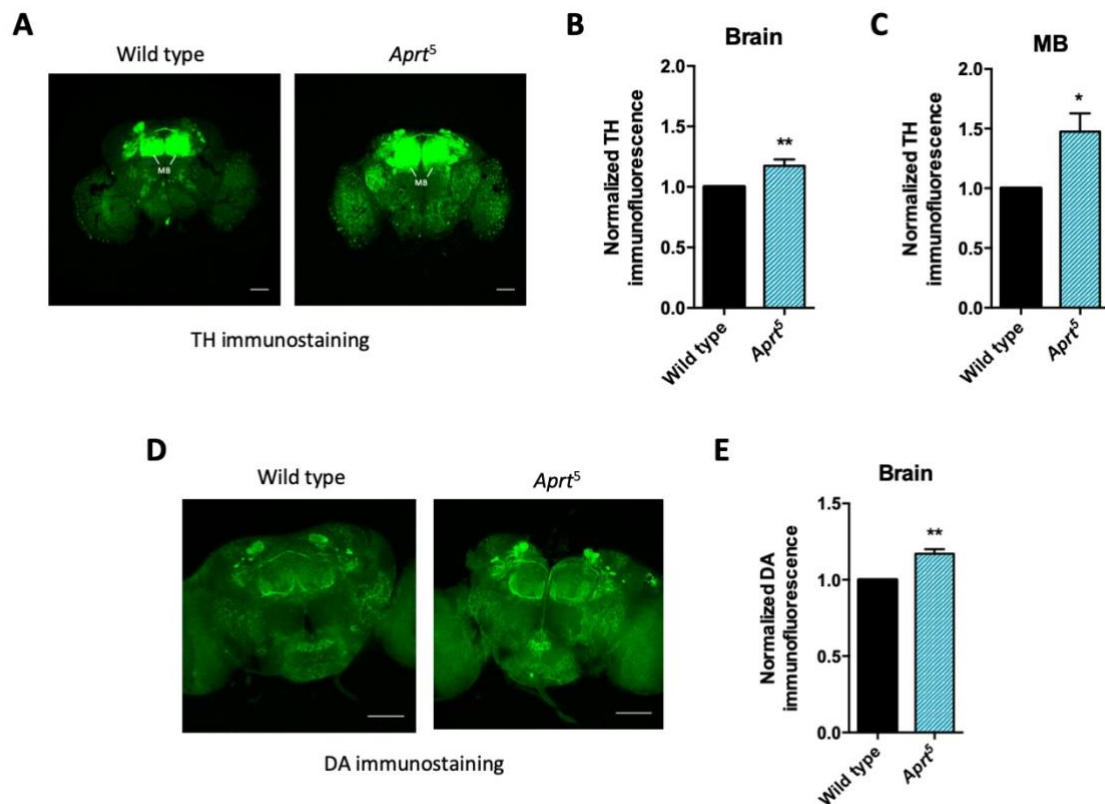


Figure 1. *Aprt* deficiency increases TH and DA synthesis in the *Drosophila* brain. (A) Representative confocal projections of TH-immunostained whole-mount adult brains from wild-type flies and *Aprt⁵* mutants. MB: mushroom body. Scale bars: 100 μ m. (B, C) Quantification of TH immunofluorescence intensity normalized to the controls either in the entire brain (B) or the MB area (C), showing that TH protein levels are increased in *Aprt⁵* mutants. 4 to 6 brains were dissected per experiment and genotype, and 6 independent experiments were performed. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (D) Representative confocal projections of DA immunostained whole-mount adult brains of wild type and *Aprt⁵* mutants. Scale bars: 100 μ m. (E) Quantification of DA immunofluorescence intensity over the entire brain showed an increase in DA content in *Aprt⁵* mutants compared to wild-type controls. 6 brains were dissected per experiment and genotype, and 3 independent experiments were performed. ** $p < 0.01$.

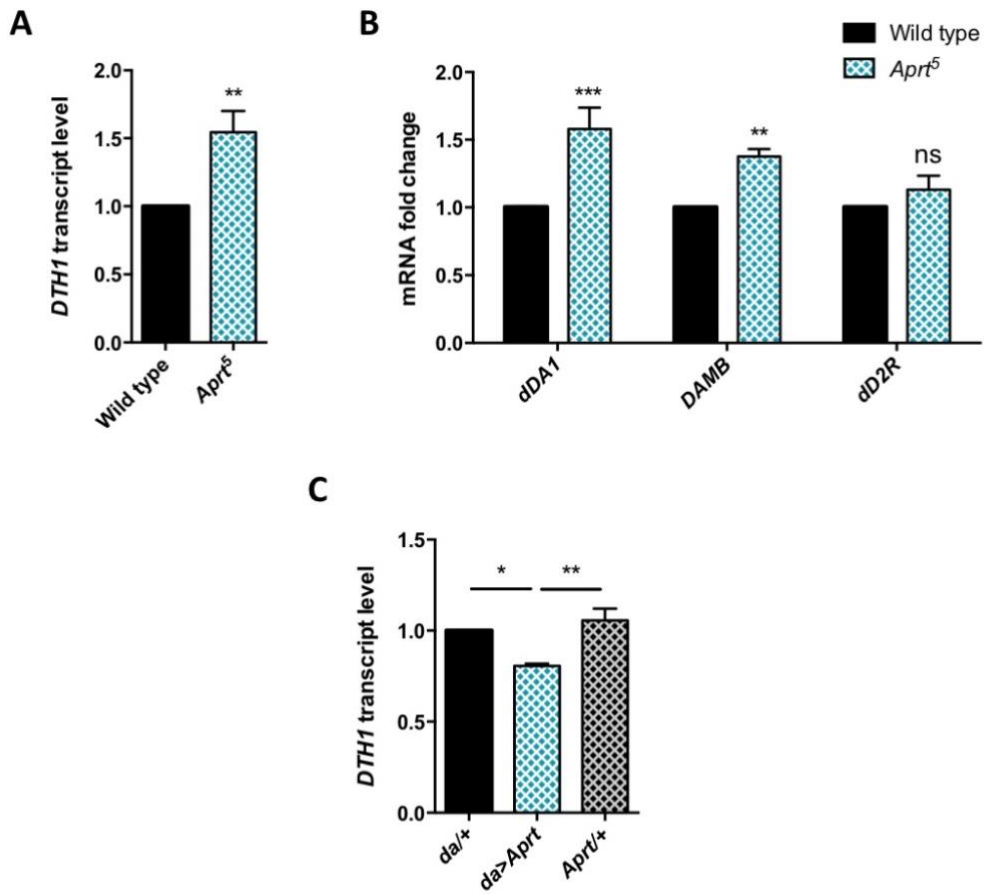


Figure 2. *Aprt* mutation increases transcript levels of dopaminergic marker genes. (A) mRNA levels of *DTH1*, the neural form of TH, are markedly increased in *Aprt*⁵ mutant heads compared to wild-type flies. Results of 6 independent RT-qPCR experiments carried out on 3 to 4 different RNA extractions from 20-30 male heads per genotype. ** $p < 0.01$. (B) RT-qPCR experiments revealed increased expression of the DA receptors *dDA1* and *DAMB*, but not significantly *dD2R*, in *Aprt*⁵ mutant heads. Results of 4 to 6 independent experiments performed on 3 to 4 RNA extractions from 20-30 male heads per genotype. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: not significant. (C) Conversely, overexpressing *Aprt* in all cells with the *da*-Gal4 driver (*da>Aprt*) reduced mRNA level of the neural form of TH, *DTH1*, in heads, as compared to the driver (*da*/+) and effector (*Aprt*/+) controls. Mean of 3 independent experiments performed on 3 different RNA extractions from 20-30 male fly heads, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

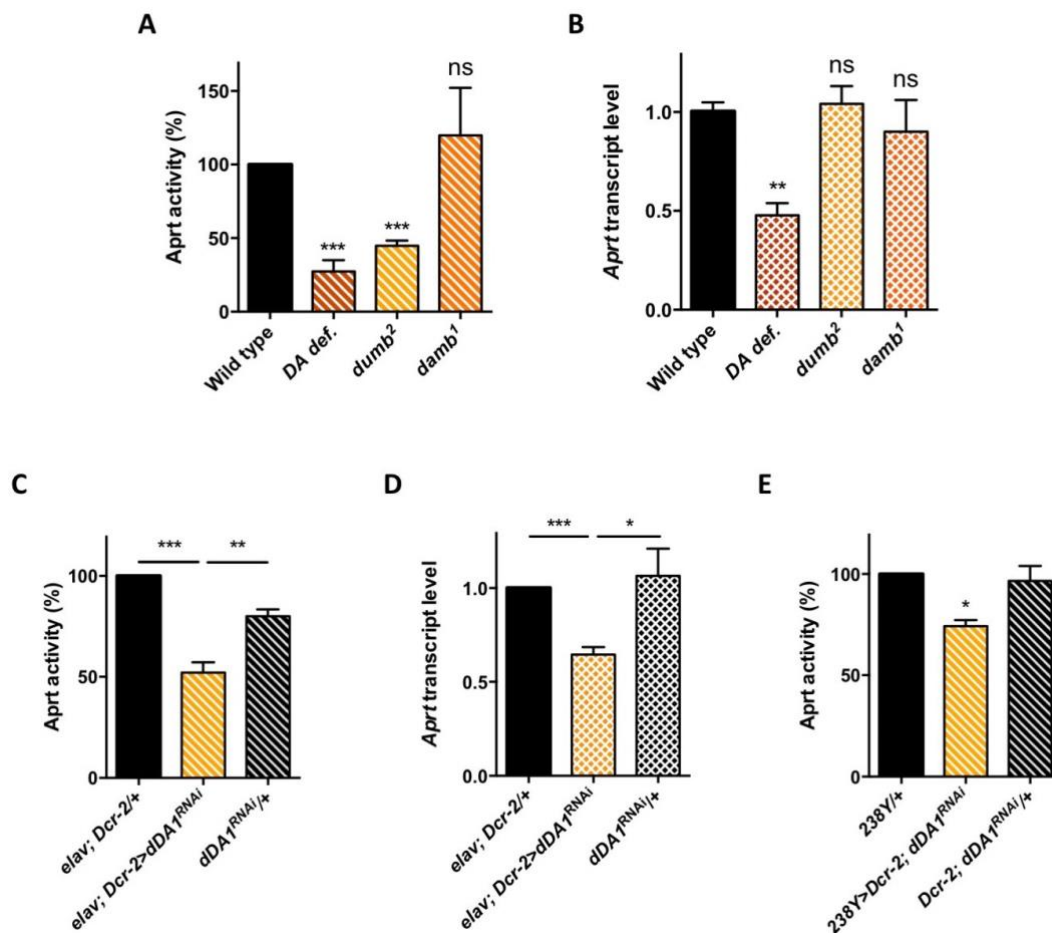


Figure 3. Alterations in DA synthesis or DA receptor expression decrease Aprt activity. (A) Compared to wild-type controls, adult DA-deficient flies (*DA def.*) as well as dDA1 DA receptor mutants (*dumb²*) show markedly decreased Aprt activity. In contrast, mutants of the DA receptor DAMB (*damb¹*) appear to have normal Aprt level. Results of 3 to 5 independent experiments carried out on extracts from 15 males per genotype. ** $p < 0.001$, ns: not significant. (B) Adult DA-deficient flies also show markedly decreased *Aprt* transcript levels, whereas the dDA1 and DAMB mutations apparently did not alter *Aprt* expression. Mean of 3-4 independent experiments performed on 3-4 different RNA extractions from 20-30 male fly heads, ** $p < 0.01$, ns: not significant. (C - D) RNAi-mediated inactivation of the DA receptor dDA1 in all neurons (*elav; Dcr-2>dDA1^{RNAi}*) induced a significant reduction in Aprt activity (C) and transcript level (D), as compared to the driver (*elav; Dcr-2/+*) and effector (*dDA1^{RNAi}/+*) only controls. Results of 3 independent experiments performed on extracts from 20 whole male flies for Aprt activity and mean of 4 independent experiments performed on 4 different RNA extractions from 20-30 male fly heads for Aprt expression. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (E) RNAi-mediated knocking-down of dDA1 in all MB intrinsic neurons (*238Y>Dcr-2; dDA1^{RNAi}*) also induced a significant reduction in Aprt activity, as compared to the driver (*elav; Dcr-2/+*) and effector (*dDA1^{RNAi}/+*) controls. Results of 3 independent experiments performed on extracts from 100 heads. * $p < 0.05$.

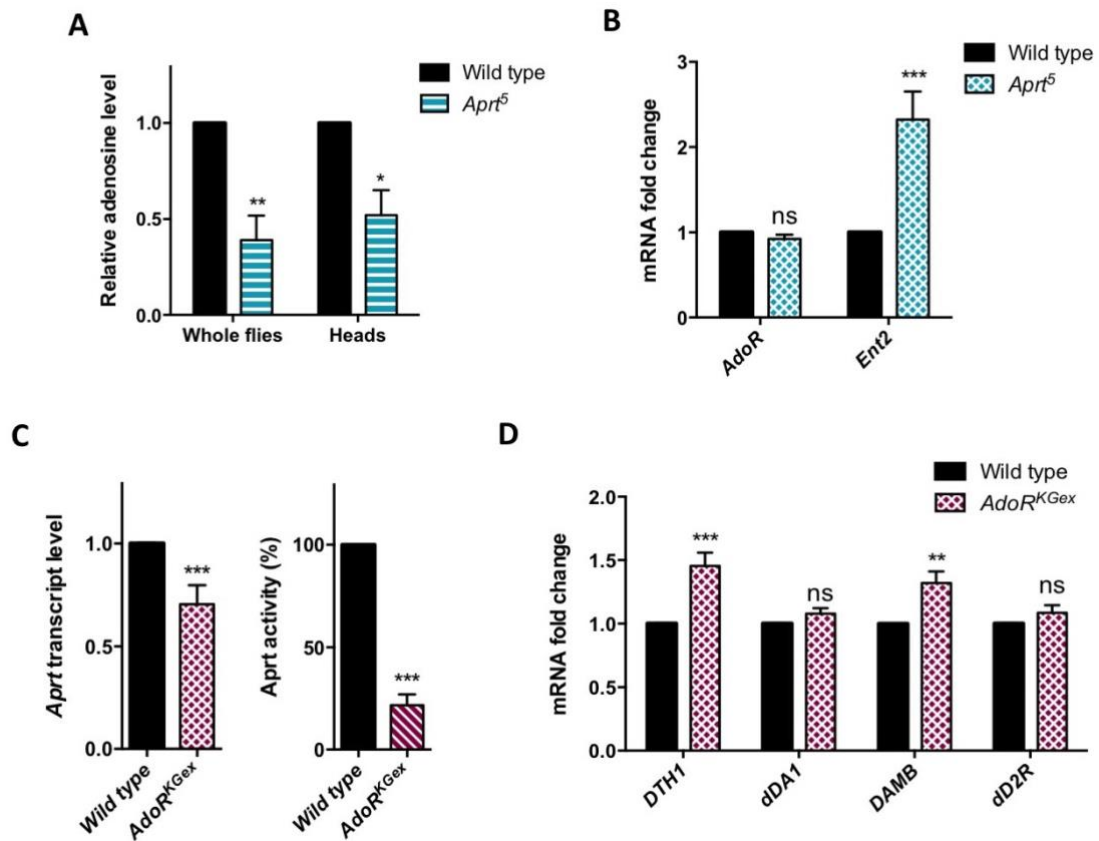


Figure 4. Adenosine signaling links the purine salvage pathway and the DA system in *Drosophila*. (A-B) Impacts of the lack of *Apt* activity on the adenosinergic system. (A) Adenosine level was measured by UPLC in whole flies or heads of *Apt⁵* flies: compared to the wild type, adenosine level appeared significantly reduced in heads and whole body of the mutants. Results of 3 independent experiments performed with 5 males or 30 heads per genotype in triplicates. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (B) *Apt⁵* mutation did not affect *AdoR* expression but induced a marked increase in adenosine transporter *Ent2* mRNA abundance. 3-6 different RNA extractions were performed on 20-30 male heads. Results of 3 to 6 independent experiments. *** $p < 0.001$, ns: not significant. (C-D) Effect of *AdoR* deficiency on the expression of *Apt* and dopaminergic genes. (C) Null *AdoR^{KGex}* mutants show decreased *Apt* expression (left panel) and a stronger decrease in *Apt* activity (right panel). (D) Compared to wild-type flies, levels of *DTH1* and *DAMB* mRNAs are increased in *AdoR^{KGex}* mutants, but not those of *dDA1* and *dD2R*. Results of RT-qPCR are mean of 4 independent experiments carried out on different RNA extractions from 20-30 male heads per genotype. *Apt* activity was determined in 3 independent experiments performed on 20 males per genotype. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: not significant.

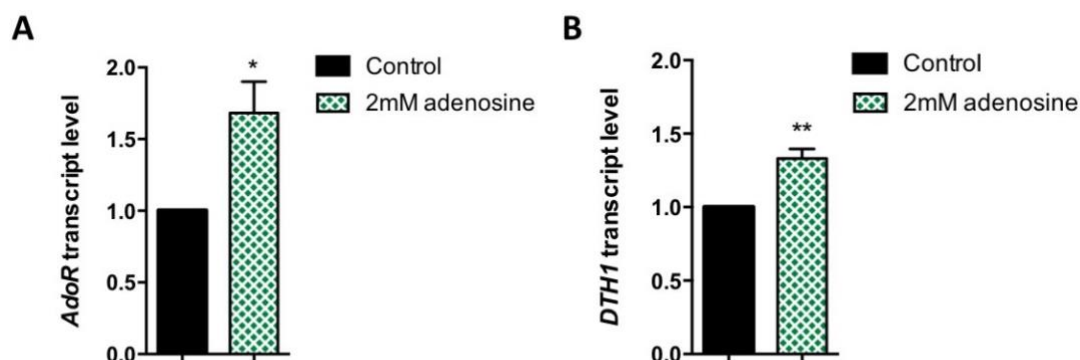


Figure 5. Supplementation with adenosine increases *AdoR* and *TH* transcription. (A) *AdoR* mRNA levels in heads of wild-type flies maintained for 48 h on standard medium (control) or medium supplemented with 2 mM adenosine. *AdoR* transcription is strongly increased by prolonged exposure to high extracellular levels of its agonist, most likely as a feedback response to receptor desensitization. (B) In these conditions, *DTH1* transcript levels are also significantly increased, suggesting that *AdoR* signaling normally inhibits TH expression. 3 or 4 independent RNA extractions were carried out on 20-30 male heads of each condition and 3 or 4 independent real-time PCR determinations were done per RNA sample. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

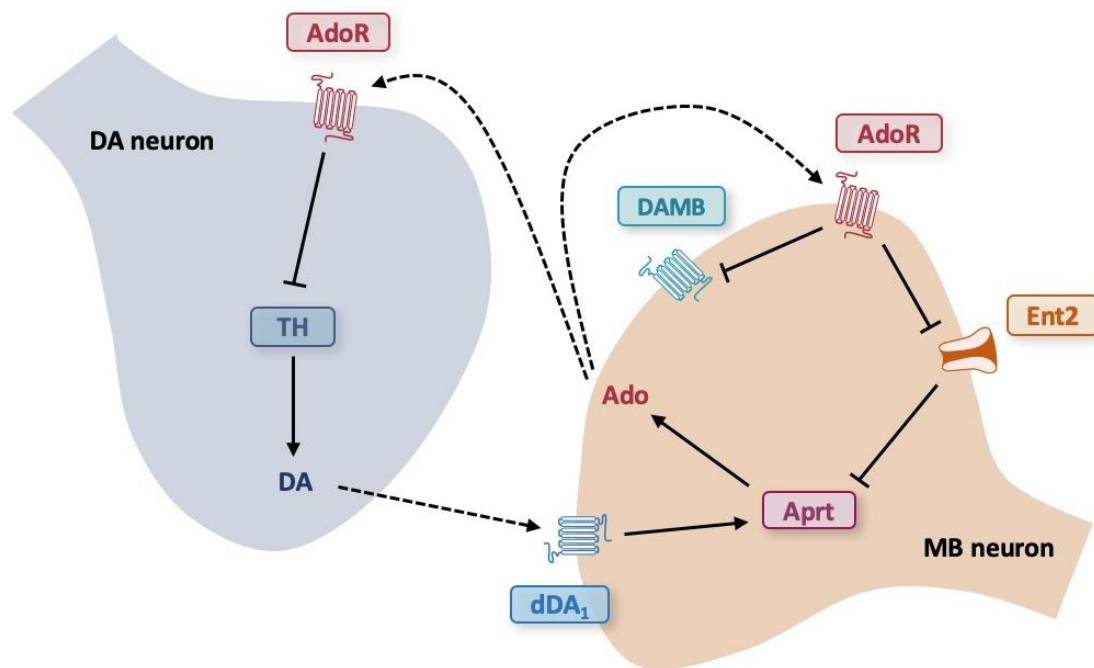
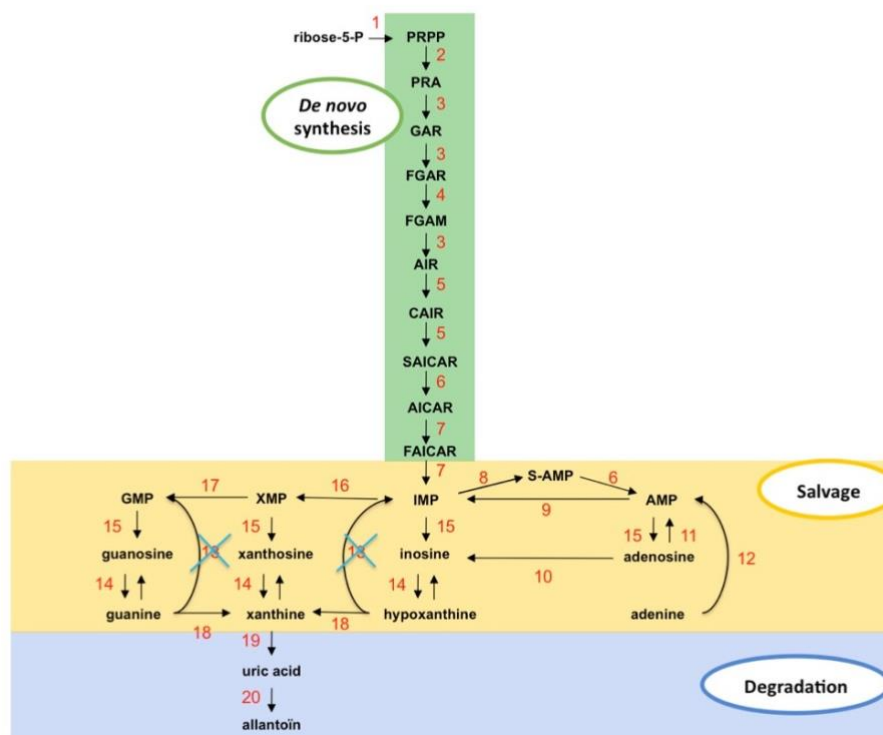


Figure 6. Proposed mechanistic links between the DA system, Appt activity and adenosine signaling in *Drosophila* mushroom body. Our results indicate that signaling through the DA receptor dDA₁ increases Appt expression and activity in the MB, where this DA receptor is enriched, and probably in other brain neurons as well. A higher Appt activity should increase the production and release of adenosine (Ado), which can then activate AdoR in DA and MB neurons. In DA neurons, we provide evidence that AdoR has an inhibitory action on TH expression level, which could explain why we found that TH expression increased in the absence of Appt activity and, conversely, decreased upon Appt overexpression. MB neurons express the adenosine transporter Ent2 and this transporter is strongly upregulated in AdoR mutants (Knight et al. 2010). AdoR could act as a sensor of adenosine by its regulation of Ent2 expression in order to give a constant tone of adenosine inside the neuron. We have shown that Appt expression and activity is decreased while expression of the DA receptor DAMB is increased in AdoR mutants. A higher Ent2 expression would lead to more adenosine uptake and a downregulation of Appt through negative feedback by the end-product. When Appt activity is absent, adenosine level is reduced, leading to lower stimulation of AdoR, and as a consequence an elevation of Ent2 and DAMB expression, which we also observed in *Appt* mutants.

Supplementary figures

A



B

	Enzyme	Human	Drosophila	% Similarity	% Identity
1.	PRPS	PRPS1	CG6767	94	88
2.	GPAT	PPAT	Prat	74	61
2.	GPAT	PPAT	Prat2	75	61
3.	GARS/AIRS/GART	GART	Gart/ade3	65	48
4.	FGAMS	PFAS	Pfas/ade2	64	50
5.	AIRC/SAICARS	PAICS	Paics/ade3	74	59
6.	ADSL	ADSL	AdSL	80	68
7.	ATIC	ATIC	CG11089	83	71
8.	ADSS	ADSS2	AdSS	76	63
9.	AMPD	AMPD1	AMPdeam	71	54
10.	ADA	ADA	Ada	41	25
11.	ADK	ADK	AdenoK	68	52
12.	APRT	APRT	Aprt	65	46
13.	HGPRT	HPRT1	/	/	/
14.	PNP	PNP	CG16758	68	51
15.	5-NT	NTSC2	CG32549	72	60
16.	IMPDH	IMPDH1	raspberry	83	69
17.	GMPS	GMPS	burgundy	76	59
18.	GDA	GDA	DhpD	58	43
19.	XDH/XO	XDH	rosy	68	52
20.	UO	/	Uro	/	/

Figure S1. Purine metabolism pathways in *Drosophila*. (A) Diagram of the purine biosynthesis and degradation pathways in *Drosophila melanogaster*, based on sequence homology with the human genes. (B) Sequence similarity between the human and *Drosophila* homologs. Note the lack of urate oxidase (UO, #20) in humans, due to a primate-specific loss of this gene, and the fact that human HGPRT (#11) does not have any homolog in *Drosophila*. This indicates that *Appt* is the only recycling enzyme of the purine salvage pathway in this organism.

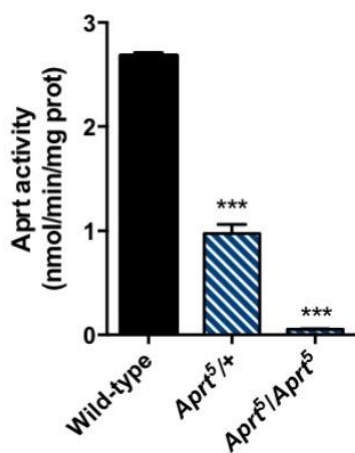


Figure S2. Absence of *Appt* enzymatic activity in the *Appt*⁵ mutant. *Appt* activity was assayed on whole adult fly extracts, showing that it is strongly reduced in heterozygous *Appt*^{5/+} mutants, and absent in homozygous *Appt*⁵ flies. The fact that it is more than 2-fold decreased in heterozygous flies argues for a dominant negative effect of the mutation. ****p* < 0.001.

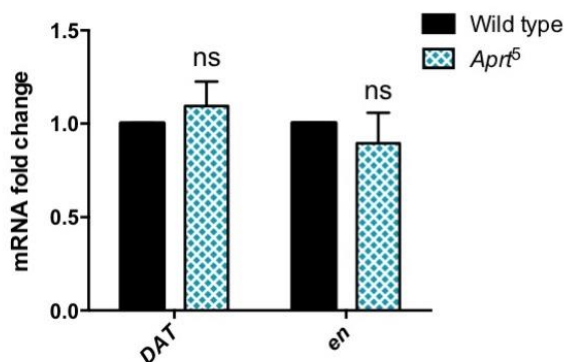


Figure S3. No effect of *Appt*⁵ mutation on *DAT* and *en* expression. Expression level of the DA transporter (*DAT*) and the transcription factor engrailed (*en*) appeared unaltered in *Appt*⁵ mutant heads. Results of 3 to 6 independent experiments performed on 3 to 4 RNA extractions from 20-30 male heads per genotype. ns: not significant.

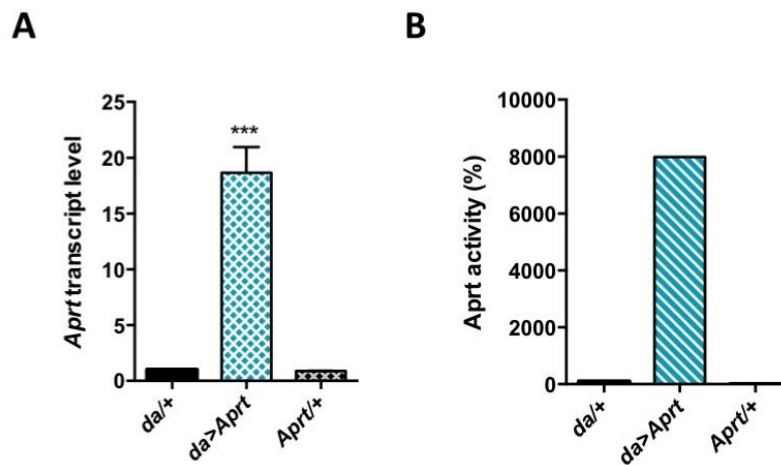


Figure S4. Transgenic expression of *Drosophila* Aprt. (A) *UAS-Aprt* strains were generated to allow for *Aprt* overexpression. Upon ubiquitous expression with the *da-Gal4* driver (*da>Aprt* flies), *Aprt* mRNA level was found to be increased 18 times in heads compared to the driver (*da/+*) and effector (*Aprt/+*) controls. (B) *Aprt* activity was increased as much as 80 times in whole body of the same flies compared to the two controls.

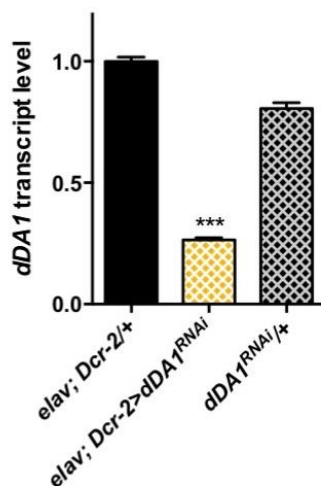


Figure S5. Control of RNAi-mediated downregulation of *dDA1* receptor expression. Inactivating the DA receptor *dDA1* by RNAi in all neurons, in the presence of the RNAi booster *Dcr-2* (*elav; Dcr-2>dDA1^{RNAi}*), efficiently decreased *dDA1* transcript levels by 73.6 and 67.3% compared to the driver (*elav; Dcr-2/+*) and effector RNAi (*dDA1^{RNAi}/+*) only controls, respectively. *** $p < 0.001$.

Gene	Primers	Sequences*
<i>Aprt</i>	P1-EcoRI (forward)	5'-AGGGAATTGG GAATTC GTTATCAGTCGACATGAGCCC
<i>Aprt</i>	P2-XbaI (reverse)	5'-ACAAAGATCCT CTAGAT CTAGAAAGCTTTCAGTACTTAATG

*The added restriction sites are in bold type

Table S1. Primers used to amplify *Aprt* cDNA

Genes	Primer sequences
<i>AdoR</i>	(forward) 5'- GGAGAAATTGCGATCGGATGACAC (reverse) 5'- TCTTCAGCGAACTCCGAGTGAATG
<i>Aprt</i>	(forward) 5'- AATCAGCGCGGAAGACAAGCTA (reverse) 5'- CCACCTTGCCGATGAGTTCAGT
<i>DAT</i>	(forward) 5'- AACAAATAGCATCAGCGACGA (reverse) 5'- CAGGTTATGGCACCTTACG
<i>dD2R</i>	(forward) 5'- GAGCGCAAGGCCACCAAAACA (reverse) 5'- GGGTTCACAAAGCTGTTGATGTAG
<i>dDA1</i>	(forward) 5'- GCGATCGCTTCATCACGGACT (reverse) 5'- CCACTGGATCAGTAGGGTAGAG
<i>DAMB</i>	(forward) 5'- GCGGTAGTTGCATAGTGGGAT (reverse) 5'- CAAAGAACGTAATGGAGGATG
<i>DTH1</i>	(forward) 5'- GGATCGAAAGCCAACCAAGTG (reverse) 5'- CTTGGGGACCAACTGCGCTTTA
<i>en</i>	(forward) 5'- CCCCAAACAGCCAAAGGACA (reverse) 5'- TAGGGGATCTGCCCCTTCAT
<i>Ent2</i>	(forward) 5'- ACGGCAAGGGATCAACGTC (reverse) 5'- CCGTGCAGCAGGAATATAAAGA
<i>rp49</i>	(forward) 5'- GACGCTTCAAGGGACAGTATC (reverse) 5'- AAACGCGGTTCTGCATGAG

Table S2. Primers used for RT-qPCR experiments

Article 2

Vers un nouveau modèle invertébré de la maladie de Lesch-Nyhan ? Etudes des perturbations métaboliques et neurocomportementales induites par un déficit du recyclage des purines chez la drosophile

Dans cette deuxième étude, nous avons eu pour but de développer de nouveaux modèles de la MLN chez la drosophile. Comme l'HGPRT est absente chez la drosophile, nous avons émis l'hypothèse qu'une absence d'Aprt pourrait avoir en partie des conséquences similaires à une absence d'HGPRT sur le cerveau humain. Nous avons ainsi observé qu'un mutant de l'Aprt présente des anomalies comparables à celles associées à un déficit en HGPRT chez l'Homme, notamment une réduction de la durée de vie, une augmentation des niveaux d'acide urique, des problèmes locomoteurs, des altérations du sommeil et un comportement convulsif. Plus précisément, certains effets semblent être spécifiquement liés à l'expression de l'Aprt dans les neurones, tandis que d'autres concernent également les cellules gliales. Nous avons également montré que l'administration d'allopurinol normalise les niveaux d'acide urique comme chez les patients LN, et que celle d'adénosine ou de N6-méthyladénosine pendant le développement permet de sauver le phénotype épileptique. Enfin, l'expression d'une forme mutante pathogène de l'HGPRT humaine (I42T) dans le SNC entraîne un déficit locomoteur précoce, un comportement convulsif et une diminution des taux de DA cérébrale, en comparaison aux drosophiles exprimant la forme sauvage de l'HGPRT. Ces nouveaux modèles pourraient s'avérer d'une aide précieuse dans la compréhension du rôle du recyclage des purines dans le cerveau et des mécanismes neuropathologiques de la MLN, et potentiellement dans la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques, dans l'espoir de guérir un jour cette maladie dramatique.

Contribution personnelle : dans cet article, j'ai réalisé toutes les expériences de longévité, de géotaxie négative, de locomotion larvaire, de mesure de l'activité

Résultats

locomotrice spontanée, de sensibilité au choc, de RT-qPCR, d'activités enzymatiques (Aprt et HGPRT) et de mesure des taux de DA par HPLC. J'ai adapté le protocole de dosage de l'ATP par bioluminescence, des composés puriques par HPLC et des activités enzymatiques par radioactivité sur des extraits de drosophiles. J'ai également construit les lignées UAS-HPRT-WT et I42T taggées ou non par clonage et transformation bactérienne. Marion Strehaiano et Joana Dagorret, deux étudiantes en stage que j'ai co-encadrées, m'ont apporté leur aide pour certaines expériences sur les lignées transgéniques. Le Dr Ali Mteyrek a contribué à la mise en place du dosage de la DA par HPLC. Notre collaborateur le Dr Laurent Seugnet, Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, a réalisé les expériences de mesure du sommeil.

Towards an invertebrate model of Lesch-Nyhan Disease? Study of Metabolic and Neurobehavioral Disturbance Induced by Purine Recycling Deficiency in *Drosophila*

Céline Petitgas^{1,3}, Laurent Seugnet², Ali Mteyrek¹, Marion Strehaiano¹, Joana Dagorret¹, Baya Chérif-Zahar¹, Irène Ceballos-Picot^{3,4}, Serge Birman^{1,*}

¹Genes Circuits Rhythms and Neuropathology, Brain Plasticity Unit, CNRS, ESPCI Paris, PSL Research University, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France

²Integrated Physiology of the Brain Arousal Systems (WAKING), Lyon Neuroscience Research Centre, INSERM/CNRS/UCBL1, Lyon, France

³Metabolomic and Proteomic Biochemistry Laboratory, Necker-Enfants Malades Hospital, AP-HP, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris, France

⁴Paris-Descartes University, Sorbonne Paris Cité University, 12 rue de l'École de Médecine, 75006 Paris, France

*Author for correspondence: serge.birman@espci.fr

Keys words: Adenine phosphoribosyltransferase (APRT) – *Drosophila melanogaster* – Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) – Lesch-Nyhan disease – Locomotion control – Purine salvage pathway – Seizure behavior – Sleep regulation – Uric acid

Abstract

Lesch-Nyhan disease (LND) is a rare genetic disorder induced by a deficiency in hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT), an enzyme involved in the purine salvage pathway. LND leads in early age to hyperuricemia and severe neurobehavioral disturbances such as dystonia, spasticity and compulsive self-injury, associated with a lack of dopamine (DA) in the basal ganglia. To date, no treatment is available for these neurological manifestations and no animal model recapitulates all the defects observed in LND patients. Here we have tried to develop new models to study LND in the fruit fly *Drosophila*. Because no HGPRT activity is present, the only purine-recycling enzyme is adenine phosphoribosyltransferase (Aprt) in this organism, so we assumed that Aprt deficiency in the fly could have in part similar consequences as an absence of HGPRT in the human brain. We observed that *Aprt*-null *Drosophila* mutants indeed showed defects comparable to those associated with HGPRT deficiency in humans, including increased uric acid levels, reduced lifespan, locomotor impairments, seizure behavior (bang-sensitivity) and sleep alterations. Interestingly, some of these effects seem to be specifically related to the expression of Aprt in neurons while others also involve glia. We have found that ingestion of allopurinol normalized uric acid levels in these mutants, as in LND patients, and that administration of adenosine or *N*⁶-methyladenosine during development fully rescued the epilepsy-like behavior. Intriguingly, we also report that the expression of a pathogenic mutant form of human HGPRT (I42T), but not the wild-type enzyme, in fly neurons resulted in early locomotor defects, seizure behavior and a decrease in cerebral DA levels. Overall, these new models in *Drosophila* should prove valuable to investigate the role of purine recycling in the brain and the neuropathological mechanisms of LND, and potentially discover new therapeutic target to cure this dramatic disease.

Introduction

The purine salvage pathway is an essential component of cell metabolism that allows the recovery of free purine bases derived from diet or the degradation of nucleic acids and nucleotides, thus avoiding the energy cost of *de novo* purine synthesis (Nyhan et al. 2014). Energy-intensive tissues, such as heart muscle cells and brain neurons, extensively use this pathway to maintain their purine levels (Ipata 2011, Johnson et al. 2019). The two main recycling enzymes involved in the salvage pathway in mammals are hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) which converts hypoxanthine and guanine into IMP and GMP, respectively, and adenine phosphoribosyltransferase (APRT) which converts adenine into AMP.

Whereas APRT deficiency in humans only lead to 2,8-dihydroxyadenine crystals formation in kidney, which can be fatal but is readily prevented by allopurinol treatment (Bollée et al. 2012, Harambat et al. 2012), inactivating mutations in HGPRT induce Lesch-Nyhan disease (LND), a rare neurometabolic X-linked recessive disorder with dramatic consequences for child development (Lesch and Nyhan 1964, Seegmiller et al. 1967). The metabolic consequence of HGPRT deficiency is an overproduction of uric acid in the blood (hyperuricemia) that can lead to gout, tophi or nephrolithiasis (Sass et al. 1965, Kelley et al. 1967). However, children also develop severe neurological impairments, such as dystonia, choreoathetosis, spasticity, and a dramatic compulsive self-injurious behavior (Nyhan 1997, Jinnah et al. 2006, Torres and Puig 2007, Schretlen et al. 2005, Madeo et al. 2019). They have a developmental delay from 3 to 6 months after birth and most of them never walk or even sit without support. Xanthine oxidase inhibitors, as febuxostat or allopurinol, are automatically given to patients after diagnosis to decrease their uric acid levels, preventing them from the formation of urate crystals in kidney, which can lead to renal failure (Kelley et al. 1967, Torres et al. 2007, Lahaye et al. 2014). Unfortunately, these medications don't show any changes in the neurological view (Torres et al. 2007, Jinnah et al. 2010, Madeo et al. 2019). Thus, there is no cure available to abrogate the neurobehavioral troubles.

Importantly, the clinical severity of symptoms in LND appears to be inversely correlated to the activity of the enzyme (Fu and Jinnah 2012, Fu et al. 2014). The full

LND phenotype which is the most severe corresponds to mutations that leave less than 2% of residual activity, whereas 2-10% of activity leads to an intermediate phenotype with various neurological abnormalities but without self-injury, and more than 10% protects from the neurobehavioral troubles and only implies symptoms related to hyperuricemia. These two last groups are named Lesch-Nyhan variants (Jinnah et al. 2010).

To date, the causes of the neurobehavioral troubles in LND are still not elucidated and it remains challenging to understand and cure this dramatic disease (Jinnah et al. 2010, Bell et al. 2016). The more favoured hypotheses involve a dysfunction of the basal ganglia, and particularly of its dopaminergic pathways (Baumeister and Frye 1985, Visser 2000, Nyhan 2000, Saito and Takashima, 2000, Egami et al. 2007). Indeed, analyses of LND patient brains revealed a marked loss of dopamine (DA) levels (Lloyd et al. 1981, Ernst et al. 1996) and DA transporters (Wong et al. 1996) specifically in the basal ganglia, but the mechanisms linking HGPRT activity and the DA system are still under investigation. DA deficits have been reported in HGPRT knockout rodents, but these animal models do not show any neurobehavioral defects (Finger et al. 1988, Dunnett et al. 1989, Jinnah et al. 1993, Jinnah et al. 1994, Meek et al. 2016), thus limiting the chance to find potential therapeutic molecules. Pharmacological models have been developed by injecting the dopaminergic neurotoxin 6-hydroxydopamine into neonatally rat brains, which induced a self-mutilation behavior in response to DA agonist administration in adulthood. However, these models are also of limited utility as they do not reproduce the basic genetic impairment of LND (Breese et al. 1990, Knapp et al. 2016, Bell et al. 2016).

Efficient new *in vivo* models are therefore critically needed to study LND pathogenesis and find efficient therapeutic molecules. The fruitfly *Drosophila melanogaster* has been widely used to model major neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's, Huntington's or Parkinson's diseases (Jaiswal et al. 2012, McGurk et al. 2015, Dung and Thao 2018, Nagoshi 2018), as well as heritable neurodevelopmental disorders such as Angelman, Rett or Fragile X syndromes (Gatto and Broadie 2011). This invertebrate model presents many advantages for

translational studies and drug discovery (Fernández-Hernández et al. 2016, Perrimon et al. 2016, Papanikolopoulou et al. 2019), and its relevance for studying rare human genetic diseases is now recognized (Oriel and Lasko 2018). However, a *Drosophila* LND model has not yet been developed to our knowledge, probably because this insect does not express any HGPRT activity, as has been long recognized (Becker 1974a, 1974b). However, an ortholog of the enzyme adenine phosphoribosyltransferase (APRT), named *Appt*, has been conserved in flies (Johnson et al. 1987). This enzyme seems to be the only enzyme of the purine salvage pathway in *Drosophila* and many insects. It is therefore possible that part of the functions of human HGPRT, and in particular those essential for nervous system development and physiology, were endorsed by *Appt* in *Drosophila*.

Here, in order to investigate whether purine recycling disruption in *Drosophila* could have similar consequences as lack of HGPRT activity in humans, we have studied the effects of *Appt* deficiency on purine metabolism, lifespan and various behaviors, including spontaneous and startle-induced locomotion, sleep and bang-sensitivity. We provide evidence that *Appt* expression prolongs lifespan and prevents seizure, and is required for many aspects of adult life in *Drosophila*, being of particular importance in neurons and in some cases in glial cells. We also show that the expression of a LND-associated mutant form of HGPRT, but not the wild-type enzyme, in *Drosophila* neurons, decreased brain DA level and induced neurobehavioral impairments similar to those of *Appt* mutant flies. Therefore, these new models in *Drosophila* show neurological symptoms, at variance with rodent models and comparably to what is observed in LND patients. They could prove valuable to study the link between purine recycling deficiency and brain functioning, and pave the way towards new improvements in the cure of this dramatic disease.

Results

***Drosophila* lacking *Appt* activity have a shortened lifespan**

One major aim of our study was to evaluate the significance of purine recycling for brain development and activity in *Drosophila*. We have therefore started by

analyzing the phenotypes induced by a deficiency in *Appt*, as it is the only recycling enzyme of the purine salvage pathway in this organism (Fig. S1). Flies carrying a null mutation in the *Appt* gene, *Appt*⁵, develop and live apparently normally during the adult stage. This allele has been originally generated by chemical mutagenesis followed by selection of flies resistant to purine toxicity (Johnson and Friedman, 1981, 1983). Because *Appt* mRNA can be detected by RT-PCR in this mutant and the corresponding coding sequence do not show any point-nonsense but only missense mutations (data not shown), it is likely that the mutant protein is expressed. We have verified, therefore, by enzymatic assay that the *Appt*⁵ protein is inactive (Table S3). We have also confirmed that no HGPRT enzyme activity can be detected in *Drosophila* extracts (Table S3) as previously established (Becker 1974a, 1974b). Because LND patients have a shortened life expectancy, we examined the effect of *Appt* mutation on *Drosophila* lifespan. This revealed that homozygous *Appt* mutants have a significantly reduced longevity (Fig. 1A): the median lifespan was about 38 days for *Appt* mutants against 50 days for wild-type flies ($p < 0.001$).

Higher uric acid level in *Appt* mutants is normalized by allopurinol

In LND, the direct consequence of HGPRT deficiency on metabolism is an accumulation of hypoxanthine and guanine that leads to an overproduction of uric acid (Harkness et al. 1988, Fu et al. 2015). To determine the effects of *Appt* deficiency on fly purine metabolism, we analyzed head extracts from *Appt*⁵ mutants compared to wild-type flies by HPLC to assay the levels of nucleotides, nucleosides and purines. Interestingly, we observed that uric acid level was consistently increased by 24.6% in average in *Appt*⁵ mutant heads ($p < 0.01$) (Fig. 1B). As for LND patients, we tried to normalize uric acid level in flies by administrating allopurinol in the food diet. Allopurinol is an analog of hypoxanthine and a competitive inhibitor of xanthine oxidase, an enzyme that catalyzes the oxidation of xanthine into uric acid. Administration of allopurinol during 5 days at a concentration of 100 µg/ml decreased uric acid levels to a normal concentration range in *Appt*⁵ mutant heads (Fig. 1B). These results indicate that the lack of *Appt* activity in flies increases uric acid levels and this

metabolic disturbance can be prevented by allopurinol, quite similarly to HGPRT deficit in humans.

Aprt deficiency affects startle-induced locomotion in young adult flies

LND patients present dramatic motor disorders that prevent them for walking at an early age. To examine whether a deficiency in the purine salvage pathway can induce early motor disturbance in flies, we first looked at spontaneous locomotion in 3rd-instar *Aprt*⁵ larvae and did not find any impairment. The locomotor stride, corresponding to the distance traveled during one peristaltic wave (Lecompte et al. 2019), was not different in size between the mutant and wild-type flies, indicating that larval muscular contraction is normal (Fig. S2). We then monitored the performance of adult *Aprt*-null mutants in startle-induced negative geotaxis (SING), a paradigm that is widely used to estimate climbing performance and locomotor reactivity (Feany and Bender, 2000, Friggi-Grelin et al. 2003, Riemensperger et al. 2013, Sun et al. 2018). Strikingly, *Aprt* mutants showed a very early SING defect starting from 1 day after eclosion (d a. E.) (PI = 0.73, $p < 0.001$) that was more pronounced at 8 d a. E (PI = 0.51, $p < 0.001$), and then locomotor performance did not decline significantly until 30 d a. E. (Fig. 1C). Hemizygous *Aprt*⁵/*Df(3L)ED4284* or *Aprt*⁵/*Df(3L)BSC365* flies in which the mutation was placed over two partially overlapping small genomic deficiencies that covers *Aprt* and a few neighbour genes, also displayed a SING defect at 10 d a. E. (PI = 0.71 and 0.68, respectively, $p < 0.01$) (Fig. S3).

To confirm the effect of *Aprt* deficiency on SING behavior, we used an *UAS-Aprt*^{RNAi} line that removed more than 95% of *Aprt* activity when expressed in all cells with *da-Gal4* (Table S3). Remarkably, an ubiquitous expression of this RNAi reproduced the early SING defect of the *Aprt*-null mutant (PI = 0.62 at 10 d a. E., $p < 0.001$) (Fig. 1D). Next, to address for a specific role of *Aprt* during adulthood in locomotor behavior, we used the thermosensitive gene *Gal80*^{ts} to downregulate *Aprt* only in adult stage (McGuire et al. 2003). *tub-Gal80*^{ts}; *da-Gal4*>*Aprt*^{RNAi} flies raised at permissive temperature (18°C) where Gal4 expression is suppressed did not show any locomotor impairment (Fig. 1E, black bars). However, after being transferred for 3 days

(between 7 and 10 d a. E.) at a restrictive temperature (30°C) that inactivates Gal80, the same flies demonstrated a similar SING defect as *Aprt*⁵ mutants (PI = 0.63, $p < 0.001$) (Fig. 1E). This indicates that adult-specific inactivation of *Aprt* is sufficient to alter SING performance in *Drosophila*.

SING behavior depends on *Aprt* expression in specific brain neurons and glial cells

In order to identify the neural cells in which *Aprt* is required for SING locomotor behavior, we first used the *elav-Gal4* and *repo-Gal4* drivers to inactivate *Aprt* either in all neurons or all glial cells, respectively. Surprisingly, we observed a similar locomotor impairment with both drivers, slightly smaller than for the ubiquitous inactivation (PI = 0.68 and 0.72, respectively, $p < 0.05$) (Fig 2A, B), suggesting that *Aprt* is required both in neurons and glia to ensure a normal SING performance in young flies.

Because DA neurons are known to play an important role in the control of SING behavior (Friggi-Grelin et al. 2003, Riemensperger et al. 2011, Riemensperger et al. 2013, Sun et al. 2018), we first looked at the effects of *Aprt* inactivation in these neurons with *TH-Gal4*, but this did not induce significant impairments (Fig. S4A). This driver strongly expresses in all brain DA neurons except a large part of the protocerebral anterior medial (PAM) dopaminergic cluster where it labels only 12 DA neurons out of about 90 in total (Friggi-Grelin et al. 2003, Mao and Davis 2009, Pech et al. 2013). It has been shown previously in our laboratory that inhibiting DA synthesis in a subset of 15 DA neurons within the PAM cluster with the *NP6510-Gal4* driver was sufficient to alter SING performance in aging flies (Riemensperger et al. 2013). Indeed, inactivating *Aprt* with the *TH-Gal4*, *R58E02-Gal4* double driver, which labels all DA neurons including the PAM (Sun et al. 2018), induced a quite similar locomotor impairment as did pan-neuronal expression (PI = 0.72, $p < 0.001$) (Fig. 2C). Targeting only the PAM cluster (*R58E02>Aprt*^{RNAi}) reproduced the same effect (PI = 0.74, $p < 0.001$) (Fig. 2D), and this result was confirmed by using 2 other PAM drivers (*NP6510-Gal4* - only 15 neurons - and *R76F05-Gal4*) (Fig. S4B, C). This strongly argues for a requirement of *Aprt* in PAM dopaminergic neurons for a normal SING behavior.

Because PAM DA neurons innervate the horizontal lobes of the mushroom bodies (MB) (Riemensperger et al. 2013), and because this structure has been shown to be involved in the control of startle-induced locomotion (Sun et al. 2018), we also inactivated *Aprt* in MB neurons with *238Y-Gal4* that strongly expresses in all MB lobes (Aso et al. 2009). This driver did induce a locomotor reactivity impairment (PI = 0.70, $p < 0.01$) (Fig. 2E), and the same result was found with *VT30559-Gal4*, which is a very specific driver for MB intrinsic neurons (Plaçais et al. 2017) (Fig. S4D). In contrast, inhibiting *Aprt* in serotonergic neurons with the *TRH-Gal4* driver did not induced a SING defect (Fig. S4E). Therefore, the SING behavior depends specifically on *Aprt* expression in the PAM DA and MB neurons.

As inactivating *Aprt* in all glial cells also impaired locomotor behavior, we next searched for the glial subtypes involved in this phenotype. By using *EAAT1-Gal4*, which drives expression in a subset of astrocytes (Rival et al. 2004), we observed a significant impairment in climbing abilities (PI = 0.56, $p < 0.01$) (Fig. 2F), whereas *MZ0709-Gal4* (Doherty et al. 2009) or *NP6520-Gal4* (Awasaki et al. 2008) that selectively target the ensheathing glia did not induce such a locomotor defect (Fig. S4F-G). Therefore, *Aprt* activity also modulates SING through its expression in astrocytes. Finally, we have tried to rescue the SING defect of *Aprt*⁵ mutant flies by expressing active *Aprt* enzyme in neurons or glial cells. We did observe a partial rescue of this behavior when *Aprt* was expressed in all neurons (Fig. 2G) (PI = 0.70 vs. 0.52 for both controls, $p < 0.05$), but not in astrocytes (Fig. S4H). This suggests that neuronal, and not glial, *Aprt* expression is sufficient to ensure a partly functional SING behavior.

***Aprt* is required in neurons to regulate the sleep/wake cycle**

Both DA neurons and the mushroom body are known to be regulators of sleep in *Drosophila* (Dubowy and Sehgal 2017). Because *Aprt* deficiency affects the function of these neurons in SING regulation, this prompted us to monitor the sleep pattern of *Aprt* mutants. As usual, a sleep bout was defined as 5 min or more of fly immobility. We found that *Aprt*⁵ mutants slept significantly less than wild-type flies and that it was the case both during day and night (Fig. 3A, B). Compared to controls, *Aprt*-deficient

flies did not show any difference in spontaneous locomotor activity during the day, as quantified by the number of infra-red beam cuts (events) per 30 min, but they showed a 26.2% increase in activity during the night ($p < 0.001$) (Fig. 3C and S5). This suggests that they move slower than wild-type flies but are more active at night. These mutants indeed showed a reduced speed during waking (Fig. 3D) and a smaller average sleep bout duration (Fig. 3E), indicating that their sleep was more fragmented. The reduced speed does not seem to be caused by a failure in energetic metabolism, because we could not detect a different ATP level in head and thorax of the *Appt* mutants compared to wild-type flies (Fig. S6).

Interestingly, RNAi-mediated downregulation of *Appt* selectively in neurons (*elav>Appt^{RNAi}* flies) also significantly decreased sleep duration during day and night (Fig. 3F), whereas glial-only expression (*repo>Appt^{RNAi}*) had no effect (Fig. S7A). Expressing the RNAi in both neurons and glia (*elav; repo>Appt^{RNAi}*) had similar effects as in neurons alone (Fig. S7B). Quantification of total, day and night sleep in these experiments are shown in Fig. 3G, S7C and S7D, respectively. These results strongly suggest that *Appt* expression is required selectively in neurons for a normal sleep pattern in *Drosophila*.

***Appt* mutants show epilepsy-like behavior**

A number of *Drosophila* mutants with disrupted metabolism show increased susceptibility to seizure and paralysis following strong mechanical or electrophysiological stimulation (Fergestad et al. 2006, Parker et al. 2011a, Kroll et al. 2015). These mutants are called bang-sensitive (BS) and commonly used as a model of epileptic behavior (Song and Tanouye 2008). Here we have carried out this test on *Appt*-deficient flies to determine if a disruption in purine metabolism could trigger a similar BS phenotype. We observed that aged *Appt* mutants (30 d a. E.) recovered slowly after a strong mechanical stimulation (10 s on a vortex). It took these flies 17.3 s on average to recover and get back on their legs compared to 2.5 s or less for wild-type flies of the same age ($p < 0.01$) (Fig. 4A). Some mutants appeared completely paralyzed as they did not spontaneously recover unless we interfered by moving the tube, so

their recovery time could not be scored. Hemizygous flies containing the *Appt* mutation over two different genomic deficiencies (*Df(3L)ED4284* and *Df(3L)BSC365*) also showed a BS behavior, with an average recovery time of 28.9 s and 33.2 s, respectively ($p < 0.001$) (Fig. S8A).

We downregulated *Appt* by RNAi in all cells with the *da-Gal4* driver to test if this could replicate the BS behavior. As shown in Fig. 4B, *da>Appt^{RNAi}* flies at 30 d a. E. displayed an increased sensitivity to mechanical shock quite similar to that of the *Appt* mutants (22.7 s on average compared to 1.55 and 0.72 s for the driver and effector controls, respectively ($p < 0.05$)). However, inactivating *Appt* only in neurons (*elav-Gal4*), glial cells (*repo-Gal4*) or muscles (*24B-Gal4*) did not induce a BS phenotype (Fig. S8B-D), which suggests that *Appt* has to be inactivated in several cell types to induce this behavior. Finally, in contrast to the SING defect, we observed that adult-specific *Appt* inactivation in all cells also did not trigger a BS behavior (Fig. 4C), indicating that the high sensitivity of aged *Appt* mutants to mechanical stimulation is apparently a late consequence from a developmental defect.

Adenosine or N⁶-methyladenosine administration prevents seizure in *Appt* mutants.

One advantage of disease models in *Drosophila* is that they can be used successfully for *in vivo* drug screening (Fernández-Hernández et al. 2016, Perrimon et al. 2016). Here we have administered several compounds related to purine metabolism to see if they can rescue the SING and BS behaviors observed in *Appt⁵* flies. The first drug we tested is allopurinol, which is able to rescue increased uric acid level in these mutants (see Fig. 1B). Several experiments carried out by feeding this compound at the same concentration used for uric acid normalization (100   g/ml), either in adults 5 days before the test or throughout all developmental stages, did not alter the defects in SING and BS tests observed in the *Appt* mutants (data not shown). Similarly in humans, it has been shown that the daily intake of allopurinol, even from birth, does not mitigate the neurological impairments in LND patients (Marks et al. 1968, Torres et al. 2007, Jinnah et al. 2010, Madeo et al. 2019).

Then, we tried to supplement *Aprt* mutants with various purine compounds, including adenine, hypoxanthine, adenosine and *N*⁶-methyladenosine (*m*⁶A), at 100 or 500 μ M, either only 5 days before the test in adult stage or throughout larval development plus 5 days before the test. None of these drugs was able to rescue the SING defect in these conditions (data not shown). In contrast and interestingly, administration of 500 μ M adenosine or *m*⁶A during development fully rescued the BS phenotype of *Aprt*⁵ mutants (Fig. 4D-E). These results indicate that different mechanisms underpin SING alteration and BS behavior in *Aprt* mutants and provide a further evidence that the bang-sensitivity, in particular, is caused by a developmental defect.

Neuronal expression of mutant HGPRT induces early locomotor defects and seizure behavior

In order to develop another *Drosophila* model that would be as close as possible to LND conditions, we have generated new transgenic lines to express ectopically in living flies either the wild-type human HGPRT or a pathogenic LND-associated mutant form of this protein (I42T), both isoforms being inserted at the same genomic anchor site. Two series of transgenic lines were generated with or without a polyhistidine-lumio tag at the N-terminal site, designated *UAS-t-HPRT* and *UAS-HPRT*, respectively. These lines were validated by RT-PCR, showing that they express at similar levels (Fig. 5A-B). Enzyme assays on adult extracts of flies expressing the wild-type form *HPRT-WT* in all cells showed HGPRT enzyme activity, while no or a residual activity was detected in *Drosophila* expressing the mutant form *HPRT-I42T* as well as in driver or effector only controls (Fig. 5A-C and Table S4). Note that the expression of *HPRT-WT* induced a stronger enzymatic activity (>4 times more) compared to the tagged *t-HPRT-WT* isoform, suggesting that the presence of the tag inhibited HGPRT activity or, alternatively, that it decreased enzyme stability as has been reported for other recombinant proteins (Booth et al. 2018).

We next analyzed the consequences of human HPRT expression in SING and BS behaviors, focusing on the effect of the untagged enzymes that preserve their normal

structure. Very interestingly, the pan-neuronal expression of the mutant *HPRT-I42T* isoform, but not of *HPRT-WT*, specifically induced a significant early locomotor defect at 15 d a. E. (Fig. 5D) ($PI = 0.71$, $p < 0.01$) and a striking bang-sensitivity behavior at 30 d a. E. (Fig. 5E) (2.3 s average recovery time vs. 0.64 and 0.31 s for driver and effector only controls, $p < 0.001$). Because LND patients have a prominent DA deficiency, we measured the DA content in the brain of these flies by HPLC assays. We noted that DA level appeared reduced in the *HPRT-I42T*-expressing flies, but this effect was not statistically significant, possibly because of the high variability between samples. In contrast, we found a significant decrease in DA level (by 29%, $p < 0.05$) in the brain of flies expressing the tagged *t-HPRT-I42T* isoform, compared to both controls and flies expressing *t-HPRT-WT* (Fig. 5G). Therefore, whereas wild-type HGPRT expression appears to be innocuous in *Drosophila*, we have found that the neuronal expression of a pathogenic HGPRT isoform with residual enzymatic activity triggers neurobehavioral impairments similar to those of *Aprt* mutant flies and seems to affect the brain DA system in a comparable way to the deficiency observed in LND patients.

Discussion

Since a long time, several studies attempted to develop animal models of LND through HGPRT mutation in mice and rats in order to understand better the cause of the disease and test potential therapeutic treatments (Jinnah et al. 1993, Engle et al 1996, Meek et al. 2016). Unfortunately, none of these attempts has provided a model that recapitulates the full LND syndrome, and particularly its behavioral defects. To date, the causes of the neurobehavioral impairments in LND are therefore not elucidated (Fu et al. 2014, Bell et al. 2016). Here we have tried to develop new models of this disease in *Drosophila*, a useful organism for genetic and pharmacological studies. A potential drawback was that the gene encoding HGPRT has no homolog in the fly genome. To overcome that, we used two different strategies. First, because *Aprt* seems to be the only enzyme of the purine salvage pathway in *Drosophila*, we hypothesized that it could have analogous functions, both for purine homeostasis and behavior control, as HGPRT in humans. We then studied the metabolic and

neurobehavioral consequences of a full deficiency in this enzyme. Second, we have endeavored to express wild-type human HGPRT and a pathogenic mutant form of this protein in *Drosophila* neurons to analyze their effects on the same parameters in living flies.

Lifespan and metabolic defects of *Aprt* mutant flies mimic effects of HGPRT deficiency

Flies that carry a homozygous null-mutation in *Aprt* develop normally and live until the adult stage. Furthermore, a previous study reported that heterozygous *Aprt*/+ flies have an extended lifespan (Stenesen et al. 2013). Therefore, we first studied the consequences of full *Aprt* deficiency on adult lifespan. We observed that homozygous *Aprt*⁵ mutant have in contrast a significantly reduced longevity compared to wild-type flies, which is reminiscent of the reduced lifespan expectancy in LND (generally less than 40 years of age for properly cared patients). Stenesen et al. (2013) have demonstrated that dietary supplementation with adenine, the substrate of *Aprt*, prevented the longevity extension conferred by AMP synthesis mutation or dietary restriction. This suggests that longevity depends on an accurate regulation of adenine levels. It is possible that adenine could accumulate to toxic levels during aging in homozygous *Aprt* mutants, explaining their shorter lifespan. Moreover, we can also speculate that AMP, the product of *Aprt*, will be decreased in the absence of a functional *Aprt*, and as a consequence, AMP kinase (AMPK) would be less activated. Multiple publications explored the role of AMPK in lifespan regulation (Sinnott and Brenman 2016) and it has been demonstrated in *Drosophila* that inactivating AMPK by RNAi in adult fat body or adult muscles reduces lifespan (Stenesen et al. 2013), as well as its ubiquitous inactivation under starvation (Johnson et al. 2010).

In human HGPRT deficiencies, several conjugated parameters lead to an overproduction of uric acid, which can have dramatic consequences if not properly treated. In particular, the absence of HGPRT activity induces an accumulation of hypoxanthine and guanine, resulting from the lack of recycling and acceleration of *de novo* purine synthesis. These two purine bases are degraded into uric acid as an end-

product (Harkness et al. 1988, Fu et al. 2015). Here, we have similarly observed an increase in uric acid level in *Drosophila Aprt* mutant heads. In insects, the end-product of purine catabolism is not uric acid, as in humans, but allantoin (see Fig. S1). However, urate oxidase, the enzyme which converts uric acid into allantoin, is expressed selectively in the Malpighi tubules, an excretory organ that forms the pre-urine in flies (Wallrath et al. 1990). Hence, it could be expected to observe an accumulation of uric acid in the hemolymph if the purine salvage pathway is impaired. Interestingly, we could reduce uric acid to physiological levels in *Aprt* mutants by feeding them with allopurinol, a xanthine oxidase inhibitor that is used to decrease uric acid level and protect against renal failure in LND patients.

Cell-specific requirement of *Aprt* for motor responses in young flies

We observed that *Aprt*-null adult flies showed a strikingly reduced ability in the SING test, which monitors locomotor reactivity to startle and climbing performance. This defect was obvious at an early age, starting from 1 d a. E. The mutant locomotor performance continued to decrease until 8 d a. E. and then appeared to stabilize up to 30 d a. E. Remarkably, this phenotype was clearly different from the defects usually found in *Drosophila* Parkinson's disease (PD) models, in which the locomotor decline arises with ageing at around 25 d a. E. and then decreases steadily (Feany and Bender 2000, Riemensperger et al. 2013, Issa et al. 2018). Such a behavioral defect in newly eclosed *Aprt*-deficient flies could be reminiscent of the early onset of dramatic motor symptoms in LND patients, which most often appear from 3-6 months of age (Jinnah et al. 2006). Interestingly, we were also able to induce an impairment in startle-induced locomotion by inactivating *Aprt* during 3 days in adult wild-type flies, suggesting that the mutant phenotype is not caused by a developmental flaw. In contrast, we found that spontaneous locomotion was generally not defective in the *Aprt* mutants, either in larval stages or in adults, and that ATP levels were not different than in controls, excluding the hypothesis of a muscular or energetic metabolism failure as origin of the reduced SING performance.

As the complete absence of *Aprt* induced a strong and early SING defect, we tried to identify in which cells *Aprt* is required to ensure a normal locomotor reactivity behavior. Inactivating *Aprt* in all neurons by RNAi reproduced the locomotor defect of the *Aprt*⁵ mutant. Previous studies from our and other laboratories have demonstrated the implication of DA neurons in the control of SING performance in *Drosophila* (Feany and Bender 2000, Friggi-Grelín et al. 2003, Riemensperger et al. 2011, Riemensperger et al. 2013, Bou Dib et al. 2014, Vaccaro et al. 2017, Sun et al. 2018), and in particular of DA neurons within the PAM cluster (Riemensperger et al. 2013, Bou Dib et al. 2014, Sun et al. 2018). Here, we showed that inactivating *Aprt* in all DA neurons or only in neurons of the PAM was sufficient to induce an early locomotor defect. Moreover, inactivation of *Aprt* with *TH-Gal4* that labels all DA neurons except for a major part of the PAM cluster did not affect the SING performance, suggesting that *Aprt* expression in PAM neurons is critical for this locomotor behavior.

We have found that inactivating *Aprt* in all MB neurons also induced a lower performance in the SING assay. This structure receives connections from DA neurons, including the PAM, and is enriched in DA receptors (Waddell 2010). We have recently reported that the activation of MB-afferent DA neurons decreased the SING response, an effect that required expression of the D₁ DA receptor dDA1/Dop1R1 in the MB cells (Sun et al. 2018). We also observed a SING defect by inactivating *Aprt* either in all glial cells, or more selectively in the astrocyte glia subset that expresses the glutamate transporter EAAT1 (Rival et al. 2004), but not in the ensheathing glia (Doherty et al. 2009). Interestingly, part of these *EAAT1*-expressing glial cells were shown to extend processes that form a thick mesh-like network around and inside the entire MB neuropil (Sinakevitch et al. 2010), so it is likely that these MB-associated astrocytes are involved in the SING phenotype of *Aprt*-deficient flies.

Although we could not rescue this locomotor phenotype by reintroducing an active *Aprt* enzyme only in astrocytes in an *Aprt* mutant background, we could partially rescue it when *Aprt* was expressed in neurons. It is possible that *Aprt* expression in both glia and neurons would have enabled a more complete rescue but we did not try it. Alternatively, the partial rescue could result from a dominant negative effect of the

*Ap^{rt}*⁵ mutation on *Ap^{rt}* activity, as suggested by our enzymatic assays on extracts of heterozygous mutant flies (data not shown). Overall, *Ap^{rt}* activity appears to be required for startle-induced locomotion through its expression in neurons and glia, and particularly in the PAM DA and MB neurons, and in *EAAT1*-expressing astrocytes.

Neuronal *Ap^{rt}* regulates spontaneous activity and sleep

Ap^{rt} mutants show early defects in SING performance and this could be caused by a muscular problem. To test this hypothesis, we used activity rhythm monitoring in order to assess their spontaneous locomotion. *Ap^{rt}* mutants showed normal locomotion during the day, which likely excluded a muscular impairment. However, this experiment highlighted that *Ap^{rt}* mutants are hyperactive during the night, suggesting that they sleep less than wild-type flies. This could be confirmed by measuring the sleep pattern on video recordings. *Ap^{rt}* mutants sleep less, have a reduced locomotion speed and more fragmented sleep. It has been shown in flies that nocturnal hyperactivity is linked to an increase in dopamine signaling (Kumar et al. 2012, Lee et al. 2013). Indeed, insomnia-like flies have elevated level of DA and a reduced longevity (Seugnet et al. 2009a), and sleep-deprived flies show increased mRNA expression of two dopaminergic receptors, *dDA1* and *DAMB* (Seugnet et al. 2009b). This is fully in accordance with our unpublished observation that dopaminergic signaling is perturbed in *Ap^{rt}*⁵ mutant flies (Petitgas et al. in preparation).

We have also investigated the cell-specific requirement for *Ap^{rt}* in the regulation of sleep/wake states. Inactivating *Ap^{rt}* only in neurons reproduced a sleep defect during both day and night, whereas an absence of *Ap^{rt}* only in glial cells did not affect this phenotype. We have not attempted here to identify the neuronal cell-type(s) involved in this mechanism. However, previous studies have shown that DA neurons regulate arousal and sleep in *Drosophila* (Birman 2005, Kume et al. 2005, Van Swinderen and Andretic 2011, Kumar et al. 2012). Notably, as for locomotor behavior, an overactivation of PAM DA neurons could be linked to the effects we observed, because it has been shown that caffeine promotes wake in *Drosophila* by increasing PAM neuronal activity (Nall et al. 2016). The facts that *Ap^{rt}* mutant flies are

hyperactive at night and that nocturnal locomotor activity is specifically increased when dopaminergic signaling is enhanced also suggest that an absence of *Appt* can promote wakefulness directly, or indirectly through increased DA signaling.

Adenosine supplementation rescues the epilepsy behavior of *Appt* mutants

LND is characterized by several neurobehavioral troubles including dystonia, spasticity and choreoathetosis. This mainly corresponds to uncontrolled, sustained or repetitive muscular contractions, and stiffness or involuntary twitching and writhing that can affect the posture, walking ability and normal movements. Some patients can also show an epileptic disorder (Jinnah et al. 2006, Madeo et al. 2019). In flies, the bang-sensitivity test is often used to model epileptic seizures (Song et al. 2008, Parker et al. 2011ab). Here, we have found that 30-day-old *Appt* mutant flies are very sensitive to this mechanical shock. Interestingly, inactivating *Appt* by RNAi in all cells during all developmental stages reproduced the same phenotype, whereas inactivation of *Appt* only in adult flies failed to induce a BS behavior. These results indicate that the absence of *Appt* during development somehow alters an important mechanism that controls bang-sensitivity, but only has a repercussion with age. Previous works have shown that bang sensitivity is strongly linked to neuronal function in flies (Parker et al. 2011b, Kroll and Tanouye 2013, Kroll et al. 2015, Saras and Tanouye 2016). The fact that we could not reproduce the BS phenotype by knocking down *Appt* in selected cells such as neurons, glia, or muscles, indicates that *Appt* has to be inactivated in several or all cell types to induce this defect, which may suggest that the crucial component missing in the absence of *Appt* activity is diffusible and can be provided to neurons from the extracellular space or the hemolymph. A likely candidate for this factor is adenosine itself (see below).

Either metabolic disruptions, such as impairment in mitochondrial protein transport, or synaptic transmission defects, like Na⁺ channel gain-of-function mutation, have been shown to increase seizure-like susceptibility in *Drosophila* (Fergestad et al. 2006, Howlett et al. 2013, Kroll et al. 2015). Indeed, mutants of the *stress sensitive B* (*sesB*) gene, which encodes a mitochondrial adenine nucleotide translocase, are

strongly affected after vortexing, and some BS mutants showed reduced ATP levels (Zhang et al. 1999, Fergestad et al. 2006). cAMP could also be involved as Na⁺ channels are regulated by protein kinase A (Saras and Tanouye 2016, Scheuer 2011). One possibility then is that *Appt* deficiency would disrupt cAMP or ATP levels at a crucial time point, which may lead to dysfunctional mitochondria and/or voltage-dependent channels. A previous study reported that some BS mutants have a shortened lifespan and decreased climbing ability, but those phenotypes are not always correlated, suggesting that they may implicate different pathways (Reynolds 2018).

The BS phenotype observed in *Appt* mutants appears to be caused by a developmental problem, since knocking down *Appt* for a few days in adult flies could not reproduce this phenotype. It is known that nucleotide synthesis in the brain primarily relies on the purine salvage pathway rather than *de novo* purine synthesis in mammals (Ipata 2011). The role of *Appt* being to recycle adenine into AMP, it was likely that *Drosophila Appt* mutants present a lack of nucleotides in the brain during development, possibly inducing neuronal defects that could trigger later the BS behavior. We have tried therefore, to feed the mutants with a diet supplemented with various compounds involved in purine metabolism, such as adenine, hypoxanthine, adenosine or its analog N6-methyladenosine (m⁶A), either throughout larval development or only in adult stage. Only adenosine and m⁶A, ingested during development, were able to prevent the BS behavior. This suggests that the absence of *Appt* induces a lack of adenosine in the developing nervous system which has a profound impact on the formation or function of neural circuits controlling the BS behavior in adults.

Adenosine is a well-known neuromodulator that strongly inhibits brain electrical activity, and its role as an endogenous anticonvulsant and seizure terminator is well-established in humans (Boison 2005, Masino et al. 2014, Weltha et al. 2019). Accordingly, deficiencies in the adenosine-based neuromodulatory system can contribute to epileptogenesis. For instance, increased expression of astroglial adenosine kinase (ADK), which converts adenosine into AMP, leads to a reduction in brain adenosine level that plays a major role in epileptogenesis (Weltha et al. 2019).

Hence, therapeutic adenosine increase is a rational approach for seizure control. One explanation for how adenosine release is responsible for seizure arrest implies the attenuation of the GABA_A receptor-mediated depolarization (Ilie et al. 2012). Overall, such data could explain why our observation that feeding adenosine or its derivative m⁶A rescued the seizure-like phenotype of *Aprt* mutant flies, and further suggests that adenosinergic signaling has similar functions in the fly and mammalian brains. In addition, we did observe that adenosine level was decreased in *Aprt* mutant flies (Petitgas *et al.* in preparation), perhaps because of an elevated ADK activity to compensate the absence of AMP production by *Aprt*. Although the reason why adenosine administration only in adult stage could not rescue the BS behavior remains to be elucidated, it is consistent with the fact that downregulating *Aprt* for three days in aged adult flies was not sufficient to give rise to the BS phenotype.

The methylation of adenosine, which is the most abundant RNA modification in mammals, is remarkably enriched in the nervous system and has been shown to influence many physiological processes (Batista 2017). Adenosine is methylated at the nitrogen-6 position to form m⁶A in RNA molecules by a large methyltransferase complex. Once released during RNA turnover or degradation, m⁶A cannot be incorporated back into nucleic acids and so it is excreted in urine (Schram 1998). The rescuing effect we observed with m⁶A on the BS phenotype indicates thereby that both this compound and adenosine rather act as adenosine receptor agonists or allosteric regulators, than as nucleotide precursors, to prevent the nervous system disturbance induced by *Aprt* deficiency.

Expression of mutant HGPRT triggers locomotor and seizure phenotypes similar to *Aprt* deficiency

Why do *HPRT* deficits induce such dramatic neurobehavioral troubles in LND patients still remains a crucial question. To date, cellular (Smith & Friedman 2000, Torres et al. 2004, Ceballos-Picot et al. 2009, Cristini et al. 2010, Guibinga et al. 2012) and rodent (Finger et al. 1988, Dunnett et al. 1989, Jinnah et al. 1993, Meek et al. 2016) models only focused on the consequences of *HPRT* deficiency to phenocopy the

disease. This approach was justified by a strong causal link between residual activity of HGPRT and phenotypic severity in humans (Fu and Jinnah 2012, Fu et al. 2014). However, it would be conceivable that part of the symptoms observed result from compensatory physiological mechanisms or a deleterious gain-of-function conferred to the HGPRT protein by the pathogenic mutations. Interestingly, we observed that expression of mutant HGPRT-I42T, but not the wild-type protein, in *Drosophila* neurons induced early locomotor defects and bang-sensitivity. This suggests a potential neurotoxicity of the pathological mutant form, which could be related to disturbances in purine metabolism or other signaling pathways. Because DA deficiency is associated with neurobehavioral troubles in LND, we have looked at DA levels in the various transgenic lines and found that it was decreased, indeed, in the brain of flies expressing the mutant, and not the wild-type, tagged form of HGPRT. Although we could not reproduce this result with the untagged isoform, possibly because of the high variability between samples, it suggests that the presence of the I42T mutation can specifically alter DA synthesis in flies.

Overall, we have shown that the expression of a pathogenic mutation of human HGPRT in *Drosophila* neurons evoked abnormalities that are in part comparable to those observed in LND patients, such as locomotor defects, epileptic behavior and a loss of DA in the brain. In humans, a mutation can confer to the resulting misfolded protein new properties making it harmful for cells, like for example α -synuclein in Parkinson's disease (Bridi and Hirth 2018) or p53 in cancer (De Oliveira et al. 2015). We could assume here that the mutant form of HGPRT is not degraded properly and accumulates as aggregates, potentially generating oxidative stress and exerting toxicity on cells, and specifically on DA neurons. This new transgenic model therefore opens interesting perspectives for a better understanding of the pathogenesis of LND, and more precisely for elucidating the endogenous function of HGPRT and its pathogenic forms. Indeed, the identification of a potential inherent neurotoxicity of defective forms of HGPRT is a new element, which could be explored in further work. The expression of pathogenic human HGPRT could also be attempted in rodent models, in

which only the consequences of a deficiency of the endogenous homologous protein have been studied so far.

Towards new models of LND in an invertebrate organism

LND, a rare X-linked metabolic disorder due to mutations of the *HPRT* gene, has dramatic neurological consequences for patients. To date, no treatments are available to abrogate these troubles, and no fully satisfactory *in vivo* models exist to progress in the understanding and cure of this disease. HGPRT knockout rodents do not show comparable behavioral troubles, which compromises the chance to find new therapeutic targets. In *Drosophila*, no HGPRT homologue is expressed, indicating that *Aprt* is the only enzyme of the purine salvage pathway in this organism. Here we find that *Aprt* mutant flies show symptoms partly comparable to the lack of HGPRT in humans, including increase of uric acid levels, reduced longevity, and various neurobehavioral defects such as early locomotor decline, sleep disorder and epilepsy behavior. In a separate work, we also report that *Aprt* deficiency or overexpression disrupts the DA neurotransmitter system in *Drosophila* (Petitgas et al. in preparation). Moreover, we observed that neuronal expression of a mutant form of human HGPRT that is associated with LND triggers abnormalities in fly locomotor behavior, bang-sensitivity and DA level. Our new models could thus prove valuable to understand better the neuropathological mechanisms triggered by HGPRT deficiency in LND patients.

Materials and Methods

***Drosophila* culture and strains**

Flies were raised at 25°C on standard corn meal/yeast/agar medium supplemented with an antifungal (methylhydroxybenzoate) under a 12-12h light:dark (LD) cycle. The following fly strains were used: Canton-S as wild-type control, *Aprt*⁵ (Johnson and Friedman, 1983) (line #6882), *Df(3L)ED4284* (line #8056) and *Df(3L)BSC365* (line #24389) obtained from the Bloomington *Drosophila* Stock Center, *UAS-Aprt*^{RNAi} (line #106836) obtained from the Vienna *Drosophila* Resource Center,

and the following Gal4 drivers: *238Y-Gal4*, *24B-Gal4*, *da-Gal4*, *EAAT1-Gal4* (Rival et al. 2004), *elav-Gal4* (*elav*^{C155}), *MZ0709-Gal4*, *NP6510-Gal4*, *NP6520-Gal4*, *R58E02-Gal4* (Liu et al. 2012), *R76F05-Gal4*, *repo-Gal4*, *TH-Gal4* (Friggi-Grelín et al. 2003), *TRH-Gal4* (Cassar et al. 2015), *tub-Gal80^{ts}* and *VT30559-Gal4*.

The driver>effector convention was used to indicate genotypes in figures, e.g. *elav>Aprt^{RNAi}* for *elav-Gal4*; *UAS-Aprt^{RNAi}*. In some experiments, to restrict RNAi-mediated Aprt inactivation to the adult stage, we have used the TARGET system (McGuire et al. 2003). Flies were raised at 18°C (permissive temperature), at which the transcriptional activity of Gal4 was repressed ubiquitously by *tub-Gal80^{ts}* and shifted to 30°C (restrictive temperature) for 3 days before the test, during which the degradation of Gal80^{ts} allowed Gal4 to drive the expression of *Aprt^{RNAi}*.

HPRT transgenic lines

Clones containing the human wild-type and I42T mutant HPRT cDNAs were kindly provided by Dr. Hyder A. Jinnah (Emory University, GA, USA). Because the sequence of the I42T form was labeled by a 6 x Histidine-Lumio tag at the N-terminal site, we first made UAS constructs to express a similarly tagged version of both wild-type and I42T HPRT (named *t-HPRT-WT* and *t-HPRT-I42T*, respectively). The In-Fusion HD Cloning Kit (Takara Bio, Kyoto, Japan) has been used according to the manufacturer's instructions. The 711-bp t-HPRT-WT and I42T inserts were PCR amplified using primers with added restriction sites (Table S1). The sequence upstream of the ATG initiation codon in the forward primer was modified to match the *Drosophila* translation start consensus sequence. After digestion with EcoRI and XbaI, the cDNAs were subcloned into *pUASTattB* vector (Bischof et al. 2007) and the insertion verified by sequencing (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany). The constructions were sent to BestGene, Chino Hills, CA, USA, for germline transformation into the attP40 docking site on the 2d chromosome. The *UAS-t-HPRT-WT* and *UAS-t-HPRT-I42T* lines giving the strongest expression were selected and used in the experiments.

We also generated *UAS-HPRT* transgenic lines without N-terminal tags. Since we only had the *HPRT-WT* cDNA without tag, we constructed *HPRT-I42T* from this clone by site-directed mutagenesis using the Quick Change II Site-Directed Mutagenesis Kit

(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Primers sequences used to create the mutation are shown in Table S2. The DNA obtained was verified by sequencing. Then, the 657-bp HPRT-WT and I42T inserts were PCR amplified using primers with added restriction sites and *Drosophila* translation start consensus sequence (Table S2). They were subcloned into *pUASTattB* vector and verified by sequencing. The transgenes were sent to BestGene for transformation and inserted again into the attP40 docking site.

Lifespan assay

Longevity study was performed as previously described (Riemensperger et al. 2011). *Drosophila* adult males were collected within 24h of emergence and maintained on standard medium at 25°C under a 12:12h LD cycle. They were transferred into fresh bottles every 2-3 days and the number of surviving flies was scored. 50 flies per bottle in triplicate were tested for each genotype and the experiment was done 3 times.

Larval locomotion

The locomotion of 3rd-instar larvae was monitored as recently described (Lecompte et al. 2019). Larvae were placed one by one on an agar plate at 25°C. After about 30 s of habituation until the larva reached a regular motion, the number of peristaltic waves (body wall muscle contractions) and the distance traveled were counted for 5 min, using a 4-mm² grid placed below the agar plate. 5 male larvae per genotype were tested. Results are expressed as size of locomotion stride, i.e. the total distance traveled (mm) divided by the sum of the peristaltic waves. Data shown are the mean of 3 independent experiments.

Startle-Induced Negative Geotaxis (SING)

SING assays were performed as previously described (Rival et al. 2004; Riemensperger et al. 2011, 2013). For each genotype, 50 adult males divided into 5 groups of 10 flies were placed in a vertical column (25-cm long, 1.5-cm diameter) with a conic bottom end and left for about 30 min for habituation. Then, columns were tested individually by gently tapping them down (startle), to which flies normally responded by climbing up. After 1 min, flies having reached at least once the top of the column (above 22 cm) and flies that never left the bottom (below 4 cm) were counted. Each fly group was assayed three times at 15 min intervals. The performance index (PI)

for each column is defined as $\frac{1}{2}[1 + (n_{\text{top}} - n_{\text{bot}})/n_{\text{tot}}]$, where n_{tot} is the total number of flies in the column, n_{top} the number of flies at the top and n_{bot} the number of flies at the bottom after 1 min. SING was performed at 1, 8, 10 or 30 days after eclosion (d a. E.).

Spontaneous locomotion and sleep monitoring

Spontaneous locomotor activity was recorded as previously described (Vaccaro et al. 2017), using *Drosophila* activity infra-red beam monitors (DAM, TriKinetics Inc, Waltham, MA USA) placed in incubators at 25°C equipped with standard white light. 8-day-old male flies were maintained individually for 5-6 days under 12:12h LD cycle in 5 x 65 mm glass tubes containing 5% sucrose, 1.5% agar medium. Data analysis was performed with the FaasX software (Klarsfeld et al. 2003). Histograms represent the distribution of the activity through 24h in 30-min bins, averaged for 32 flies per genotype over 4-5 cycles.

For sleep monitoring, 2-4 days old virgin female flies were transferred individually into 5 x 65 mm glass tubes containing standard food and their movements were recorded for up to 5 days using DAM infra-red beam monitors (TriKinetics Inc, Waltham, MA USA) or the *Drosophila* Arousal Tracking (DART) video system (Faville et al. 2015), in a 12-12h LD cycle with 50-60% humidity. Control and experimental flies were recorded simultaneously. Each experiment included at least 14 flies for each condition and was repeated 2-3 times with independent groups of flies. Fly sleep, defined as periods of immobility lasting more than 5 min (Dubowy and Sehgal 2017), was computed with a Microsoft Excel macro for the infra-red beam data and with the DART software for the video data. Distribution and homogeneity as well as statistical group comparisons were tested using Microsoft Excel plugin software Statel. The p value shown is the highest obtained among *post-hoc* comparisons and means \pm SEM were plotted.

Bang-sensitivity test

Bang-sensitive (BS) behavior assays were performed as previously described (Howlett et al. 2013). 30-day-old males were divided into 5 groups of 10 flies under CO₂ and allowed to recover overnight. The following day, each group was placed in a vial

Résultats

without food and after 20 min of habituation, they were stimulated vigorously with a vortex mixer for 10 s at 2,500 rpm. The recovery time was measured for each fly, from the end of the stimulation until they reached a normal standing position. Results are the mean of the recovery time for at least 50 flies per genotype.

Drug administration

Allopurinol (A8003, Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA) was diluted in standard medium at 100 µg/ml and flies were placed for 5 days on this medium before metabolite extraction. Adenosine (A9251, Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA) or *N*⁶-methyladenosine (*m*⁶A) (QB-1055, Combi-Blocks, San Diego, CA, USA) were diluted in fly food medium at 500 µM. Parents were allowed to lay eggs on this medium in order to have exposition to the drug throughout all larval development of the progeny. Adults were collected and placed in normal medium until 5 days before the test, when they were placed again in food supplemented with adenosine or *m*⁶A at the same concentrations.

Purine detection and quantification

For metabolite extraction, 40 heads from 8-day-old flies were ground in 80% ethanol, heated for 3 min at 80°C and evaporated in a Speedvac apparatus. Dried residues were resuspended in MilliQ water and total protein content of each homogenate was measured with the Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). 20 µl of each sample was injected into a 25 cm x 4.6 mm C18 Nucleosil column with 5-µm particles (Interchim, Montluçon, France). Purines metabolites were detected by an Agilent 1290 Infinity HPLC system coupled with a diode array detector as recommended by the ERDNIM advisory document. 7 wavelengths were used for detection (230, 240, 250, 260, 266, 270 and 280 nm) in order to have the spectrum of each compound for identification in addition to the retention time. The mobile phases contained 0.05 M monopotassium phosphate pH 5 and 65% (v/v) acetonitrile. The flux was fixed at 1 ml/min. For analysis, the maximum height of the compound was normalized to protein content and compared to the control genotype.

ATP assay

ATP level was measured by bioluminescence using the ATP Determination Kit (A22066, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) on a TriStar 2 Spectrum LB942S microplate reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany), according to the manufacturer's instructions. Samples were prepared as described previously (Fergestad et al. 2006). Briefly, 30 heads or 5 thoraces from 8-day-old flies were homogenized in 200 μ L of 6 M guanidine-HCl to inhibit ATPases, boiled directly 5 min at 95°C and then centrifuged for 5 min at 13,000 g and 4°C. Total protein content of each supernatant was measured with the BCA Protein Assay Kit. Each supernatant was then diluted at 1:500 in TE buffer pH 8 and 10 μ L were placed in a 96-well white-bottom plate. The luminescent reaction solution (D-luciferine, luciferase, DTT and buffer) was added to each well with an injector and high-gain 1-s exposure glow reads were obtained at 15 min after reaction initiation. Results were compared to a standard curve generated with known ATP concentrations and final values were normalized to the protein content.

Enzymatic activity assay

HGPRT and APRT enzymatic activities were assessed in *Drosophila* by adapting methods previously established for human cells (Cartier and Hamet 1968, Ceballos-Picot et al. 2009). 20 whole male flies were homogenized in 250 μ L of 110 mM Tris, 10 mM MgCl₂ pH 7.4 (Tris-MgCl₂ buffer), immediately frozen and kept at least one night at -80°C before the assay. After 5 min of centrifugation at 13,000 g, total protein content of each supernatant was measured with the BCA Protein Assay Kit to normalize activity level. Kinetics of [¹⁴C]-hypoxanthine conversion to IMP and [¹⁴C]-adenine conversion to AMP were assessed for HGPRT and Aprt assays, respectively. Compositions of reaction mediums were: 25 μ L of a radioactive solution made with 38 μ L of [¹⁴C]-hypoxanthine (25 μ Ci/ml) diluted in 1 ml of 1.2 mM cold hypoxanthine, for HGPRT assay, or 25 μ L of a radioactive solution made with 75 μ L of [¹⁴C]-adenine (50 μ Ci/ml) diluted in 1 ml of 1.2 mM cold adenine for Aprt assay, and a volume of fly extract equivalent to 200 μ g protein diluted in Tris-MgCl₂ buffer to 150 μ L. Reactions were monitored at 37°C and started by adding 25 μ L of the co-factor 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP) at

Résultats

10 mM. After 6, 12, 24 and 36 min, 40 µL of each pool was placed in a tube containing either 25 µL of HIE (3 mM hypoxanthine, 6 mM IMP, 200 mM EDTA) or AAE (3 mM adenine, 6 mM AMP, 200 mM EDTA) solutions and incubated for 3 min at 95°C to stop the reaction. The different radioactive compounds were separated by paper chromatography on Whatman 3MM strips using 28% NH₄OH, 50 mM EDTA as solvent for about 1h30. Then, the substrates and products were visualized under a UV lamp at 254 nm and placed separately in vials in 2 ml of Scintran (VWR, Radnor, PA, USA). The radioactivity in disintegrations per minute (dpm) was measured in a Packard Tri-Carb 1600 TR liquid scintillation analyzer (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). The percentage of substrate transformation as a function of time was converted in nmol/min/mg protein and finally normalized to wild-type control values.

Reverse transcription-PCR

Total RNA was isolated by standard procedure from 20-30 heads of 8-day-old males collected on ice and lysed in 600 µL QIAzol Reagent (Qiagen, Venlo, Netherlands). 1 µg of total RNA was treated by DNase (DNase I, RNase-free, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. 5 µL of treated RNA was reverse transcribed using oligo d(T) primers (PrimeScript RT Reagent Kit – Takara Bio, Kyoto Japan). Then, at least 750 ng of the first strand cDNA was amplified in 20 µL of reaction mixture using PrimeStar Max DNA polymerase (Takara Bio, Kyoto Japan) with a Techne Prime Thermal Cycler apparatus (Bibby Scientific, Burlington, NJ, USA). The program cycles included 10 s denaturation at 98°C, 10 s annealing at 55°C and 10 s elongation at 72°C, repeated 30 times. PCR product levels were measured after electrophoresis by densitometry analysis with the Fiji software. Data were normalized to amplification level of the ribosomal protein *rp49/RpL32* transcripts as internal control. Sequences of the primers used were: sense *HPRT*, 5'-GAGATACAAAATGGCGACCCGAGCCCT; antisense *HPRT*, 5'-GCTCGGATCCTTATCATTACTAGGCTTTG (amplicon 686bp); sense *rp49*, 5'-GACGCTTCAAGGGACAGTATC; antisense *rp49*, 5'-AAACGCGGTTCTGCATGAG (amplicon 144bp).

Dopamine assay

DA levels in *Drosophila* brain extracts were determined by HPLC coupled to electrochemical detection as previously described (Hardie and Hirsh, 2006, Riemensperger et al. 2011). The HPLC system consisted of a Jasco model PU-2089 Plus isocratic pump (Jasco Inc., Easton, MD, USA) coupled to an ED703 Pulse electrochemical detector (GL Sciences, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan) equipped with a low-volume flow cell. 10 brains from 8-day-old male flies were hand dissected and quickly homogenized with a Minilys apparatus (Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux, France) in 100 μ l of ice-cold 50 mM citrate/acetate pH 4.5. Homogenates were filtered through a nylon 0.2 μ m centrifugal filter (VWR, Radnor, PA, USA) before analysis. Separation was performed with a 10 cm x 4.6 mm Hypersil H3ODS-100A column (Hichrom, Berkshire, UK) protected by a Hypersil guard cartridge. The mobile phase contained 4 mM decanesulfonic acid, 50 mM citrate/acetate pH 4.5 and 21% (v/v) acetonitrile. The flux was maintained at 0.3 ml/min and the detector potential was fixed at +1,000 mV relative to a conductive diamond electrode. 3 injections of 20 μ l (equivalent to 2 brains) were performed for each data point and at least 3 different homogenates were injected for each genotype. Results are normalized to the control condition and show mean \pm SEM of three independent experiments.

Statistical analysis

Statistical significance was determined with the Prism 6 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Survival curves for longevity experiments were analyzed using the log-rank test. The Student's *t*-test was used to compare two genotypes or conditions, and one-way or two-way ANOVA with Tukey's or Sidak's *post-hoc* multiple comparison tests for three or more conditions. Results are presented as mean \pm SEM. Probability values in all figures: **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

References

- Aso, Y., Grübel, K., Busch, S., Friedrich, A.B., Siwanowicz, I., and Tanimoto, H. (2009). The mushroom body of adult *Drosophila* characterized by Gal4 drivers. *J. Neurogenet.* 23, 156–172.
- Awasaki, T., Lai, S.-L., Ito, K., and Lee, T. (2008). Organization and postembryonic development of glial cells in the adult central brain of *Drosophila*. *J. Neurosci.* 28, 13742–13753.
- Batista, P.J. (2017). The RNA Modification N6-methyladenosine and Its Implications in human disease. *Genomics, Proteomics, Bioinformatics* 15, 154–163.
- Baumeister, A.A., and Frye, G.D. (1985). The biochemical basis of the behavioral disorder in the Lesch-Nyhan syndrome. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 9, 169–178.
- Becker, J.-L. (1974a). Purine metabolism pathways in *Drosophila* cells growth “*in vitro*”: phosphoribosyl transferase activities. *Biochimie* 56, 779–781.
- Becker, J.-L. (1974b). Purine metabolism in *Drosophila melanogaster* cells in culture *in vitro*: purine interconversion [*in French*]. *Biochimie* 56, 1249–1253.
- Bell, S., Kolobova, I., Crapper, L., and Ernst, C. (2016). Lesch-Nyhan syndrome: models, theories, and therapies. *Mol. Syndromol.* 7, 302–311.
- Birman, S. (2005). Arousal mechanisms: speedy flies don’t sleep at night. *Curr. Biol.* 15, R511–R513.
- Bischof, J., Maeda, R.K., Hediger, M., Karch, F., and Basler, K. (2007). An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 3312–3317.
- Boison, D. (2005). Adenosine and epilepsy: from therapeutic rationale to new therapeutic strategies. *Neuroscientist* 11, 25–36.
- Bollée, G., Harambat, J., Bensman, A., Knebelmann, B., Daudon, M., and Ceballos-Picot, I. (2012). Adenine phosphoribosyltransferase deficiency. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 7, 1521–1527.
- Booth, W.T., Schlachter, C.R., Pote, S., Ussin, N., Mank, N.J., Klapper, V., Offermann, L.R., Tang, C., Hurlburt, B.K., and Chruszcz, M. (2018). Impact of an N-terminal polyhistidine tag on protein thermal stability. *ACS Omega* 3, 760–768.
- Bou Dib, P., Gnägi, B., Daly, F., Sabado, V., Tas, D., Glauser, D.A., Meister, P., and Nagoshi, E. (2014). A conserved role for p48 homologs in protecting dopaminergic neurons from oxidative stress. *PLoS Genet.* 10, e1004718.

- Breese, G.R., Criswell, H.E., Duncan, G.E., and Mueller, R.A. (1990). A dopamine deficiency model of Lesch-Nyhan disease—the neonatal-6-OHDA-lesioned rat. *Brain Res. Bull.* 25, 477–484.
- Bridi, J.C., and Hirth, F. (2018). Mechanisms of α -synuclein induced synaptopathy in Parkinson's disease. *Front. Neurosci.* 12, 80.
- Cartier, P., and Hamet, M. (1968). Determination of the purine phosphoribosyl transferase activity of human red cells [*in French*]. *Clin. Chim. Acta* 20, 205–214.
- Cassar, M., Issa, A.-R., Riemensperger, T., Petitgas, C., Rival, T., Coulom, H., Iche-Torres, M., Han, K.-A., and Birman, S. (2015). A dopamine receptor contributes to paraquat-induced neurotoxicity in *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.* 24, 197–212.
- Ceballos-Picot, I., Mockel, L., Potier, M.-C., Dauphinot, L., Shirley, T.L., Torero-Ibad, R., Fuchs, J., and Jinnah, H.A. (2009). Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase regulates early developmental programming of dopamine neurons: implications for Lesch-Nyhan disease pathogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 18, 2317–2327.
- Cristini, S., Navone, S., Canzi, L., Acerbi, F., Ciusani, E., Hladnik, U., de Gemmis, P., Alessandri, G., Colombo, A., Parati, E., et al. (2010). Human neural stem cells: a model system for the study of Lesch-Nyhan disease neurological aspects. *Hum. Mol. Genet.* 19, 1939–1950.
- Doherty, J., Logan, M.A., Tasdemir, O.E., and Freeman, M.R. (2009). Ensheathing glia function as phagocytes in the adult *Drosophila* brain. *J. Neurosci.* 29, 4768–4781.
- Dubowy, C., and Sehgal, A. (2017). Circadian rhythms and sleep in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 205, 1373–1397.
- Dung, V.M., and Thao, D.T.P. (2018). Parkinson's disease model. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1076, 41–61.
- Dunnett, S.B., Sirinathsinghji, D.J.S., Heavens, R., Rogers, D.C., and Kuehn, M.R. (1989). Monoamine deficiency in a transgenic (*Hprt*⁻) mouse model of Lesch-Nyhan syndrome. *Brain Res.* 501, 401–406.
- Egami, K., Yitta, S., Kasim, S., Lewers, J.C., Roberts, R.C., Lehar, M., and Jinnah, H.A. (2007). Basal ganglia dopamine loss due to defect in purine recycling. *Neurobiol. Dis.* 26, 396–407.
- Engle, S.J., Womer, D.E., Davies, P.M., Boivin, G., Sahota, A., Simmonds, H.A., Stambrook, P.J., and Tischfield, J.A. (1996). HPRT-APRT-deficient mice are not a model for Lesch-Nyhan syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1607–1610.
- Ernst, M., Zametkin, A.J., Matochik, J.A., Pascualvaca, D., Jons, P.H., Hardy, K., Hankerson, J.G., Doudet, D.J., and Cohen, R.M. (1996). Presynaptic dopaminergic deficits in Lesch-Nyhan disease. *N. Engl. J. Med.* 334, 1568–1572.

Faville, R., Kottler, B., Goodhill, G.J., Shaw, P.J., and van Swinderen, B. (2015). How deeply does your mutant sleep? Probing arousal to better understand sleep defects in *Drosophila*. *Sci. Rep.* 5, 8454.

Feany, M.B., and Bender, W.W. (2000). A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* 404, 394–398.

Fergestad, T., Bostwick, B., and Ganetzky, B. (2006). Metabolic disruption in *Drosophila* bang-sensitive seizure mutants. *Genetics* 173, 1357–1364.

Fernández-Hernández, I., Scheenaard, E., Pollarolo, G., and Gonzalez, C. (2016). The translational relevance of *Drosophila* in drug discovery. *EMBO Rep.* 17, 471–472.

Finger, S., Heavens, R.P., Sirinathsinghji, D.J., Kuehn, M.R., and Dunnett, S.B. (1988). Behavioral and neurochemical evaluation of a transgenic mouse model of Lesch-Nyhan syndrome. *J. Neurol. Sci.* 86, 203–213.

Friggi-Grelín, F., Coulom, H., Meller, M., Gomez, D., Hirsh, J., and Birman, S. (2003). Targeted gene expression in *Drosophila* dopaminergic cells using regulatory sequences from tyrosine hydroxylase. *J. Neurobiol.* 54, 618–627.

Fu, R., and Jinnah, H.A. (2012). Genotype-phenotype correlations in Lesch-Nyhan disease: moving beyond the gene. *J. Biol. Chem.* 287, 2997–3008.

Fu, R., Ceballos-Picot, I., Torres, R.J., Larovere, L.E., Yamada, Y., Nguyen, K.V., Hegde, M., Visser, J.E., Schretlen, D.J., Nyhan, W.L., et al. (2014). Genotype-phenotype correlations in neurogenetics: Lesch-Nyhan disease as a model disorder. *Brain* 137, 1282–1303.

Fu, R., Sutcliffe, D., Zhao, H., Huang, X., Schretlen, D.J., Benkovic, S., and Jinnah, H.A. (2015). Clinical severity in Lesch-Nyhan disease: the role of residual enzyme and compensatory pathways. *Mol. Genet. Metab.* 114, 55–61.

Gatto, C.L., and Broadie, K. (2011). *Drosophila* modeling of heritable neurodevelopmental disorders. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21, 834–841.

Guibinga, G.-H., Hrustanovic, G., Bouic, K., Jinnah, H.A., and Friedmann, T. (2012). MicroRNA-mediated dysregulation of neural developmental genes in HPRT deficiency: clues for Lesch-Nyhan disease? *Hum. Mol. Genet.* 21, 609–622.

Harambat, J., Bollée, G., Daudon, M., Ceballos-Picot, I., and Bensman, A. (2012). Adenine phosphoribosyltransferase deficiency in children. *Pediatr. Nephrol.* 27, 571–579.

Hardie, S.L., and Hirsh, J. (2006). An improved method for the separation and detection of biogenic amines in adult *Drosophila* brain extracts by high performance liquid chromatography. *J. Neurosci. Methods* 153, 243–249.

- Harkness, R.A., McCreanor, G.M., and Watts, R.W.E. (1988). Lesch-Nyhan syndrome and its pathogenesis: purine concentrations in plasma and urine with metabolite profiles in CSF. *J. Inherit. Metab. Dis.* **11**, 239–252.
- Howlett, I.C., Rusan, Z.M., Parker, L., and Tanouye, M.A. (2013). *Drosophila* as a model for intractable epilepsy: *gilgamesh* suppresses seizures in *para*^{bss1} heterozygote flies. *G3 (Bethesda)* **3**, 1399–1407.
- Ilie, A., Raimondo, J.V., and Akerman, C.J. (2012). Adenosine release during seizures attenuates GABAA receptor-mediated depolarization. *J. Neurosci.* **32**, 5321–5332.
- Ipata, P.L. (2011). Origin, utilization, and recycling of nucleosides in the central nervous system. *Adv. Physiol. Educ.* **35**, 342–346.
- Issa, A.-R., Sun, J., Petitgas, C., Mesquita, A., Dulac, A., Robin, M., Mollereau, B., Jenny, A., Chérif-Zahar, B., and Birman, S. (2018). The lysosomal membrane protein LAMP2A promotes autophagic flux and prevents SNCA-induced Parkinson disease-like symptoms in the *Drosophila* brain. *Autophagy* **14**, 1898–1910.
- Jaiswal, M., Sandoval, H., Zhang, K., Bayat, V., and Bellen, H.J. (2012). Probing mechanisms that underlie human neurodegenerative diseases in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* **46**, 371–396.
- Jinnah, H.A., Page, T., and Friedmann, T. (1993). Brain purines in a genetic mouse model of Lesch-Nyhan disease. *J. Neurochem.* **60**, 2036–2045.
- Jinnah, H.A., Wojcik, B.E., Hunt, M., Narang, N., Lee, K.Y., Goldstein, M., Wamsley, J.K., Langlais, P.J., and Friedmann, T. (1994). Dopamine deficiency in a genetic mouse model of Lesch-Nyhan disease. *J. Neurosci.* **14**, 1164–1175.
- Jinnah, H.A., Visser, J.E., Harris, J.C., Verdu, A., Larovere, L., Ceballos-Picot, I., Gonzalez-Alegre, P., Neychev, V., Torres, R.J., Dulac, O., et al. (2006). Delineation of the motor disorder of Lesch-Nyhan disease. *Brain* **129**, 1201–1217.
- Jinnah, H.A., Ceballos-Picot, I., Torres, R.J., Visser, J.E., Schretlen, D.J., Verdu, A., Larovere, L.E., Chen, C.-J., Cossu, A., Wu, C.-H., et al. (2010). Attenuated variants of Lesch-Nyhan disease. *Brain* **133**, 671–689.
- Johnson, D.H., and Friedman, T.B. (1981). Purine resistant mutants of *Drosophila* are adenine phosphoribosyltransferase deficient. *Science* **212**, 1035–1036.
- Johnson, D.H., and Friedman, T.B. (1983). Purine-resistant *Drosophila melanogaster* result from mutations in the adenine phosphoribosyltransferase structural gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 2990–2994.
- Johnson, D.H., Edström, J.-E., Burnett, J.B., and Friedman, T.B. (1987). Cloning of a *Drosophila melanogaster* adenine phosphoribosyltransferase structural gene and deduced amino acid sequence of the enzyme. *Gene* **59**, 77–86.

Johnson, E.C., Kazgan, N., Bretz, C.A., Forsberg, L.J., Hector, C.E., Worthen, R.J., Onyenwoke, R., and Brenman, J.E. (2010). Altered metabolism and persistent starvation behaviors caused by reduced ampk function in *Drosophila*. *PLoS One* 5, e12799.

Johnson, T.A., Jinnah, H.A., and Kamatani, N. (2019). Shortage of cellular ATP as a cause of diseases and strategies to enhance ATP. *Front. Pharmacol. In press*.

Kelley, W.N., Rosenbloom, F.M., Henderson, J.F., and Seegmiller, J.E. (1967). A specific enzyme defect in gout associated with overproduction of uric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 57, 1735–1739.

Klarsfeld, A., Leloup, J.-C., and Rouyer, F. (2003). Circadian rhythms of locomotor activity in *Drosophila*. *Behav. Processes* 64, 161–175.

Knapp, D.J., and Breese, G.R. (2016). The use of perinatal 6-hydroxydopamine to produce a rodent model of Lesch-Nyhan disease. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 29, 265–277.

Kroll, J.R., and Tanouye, M.A. (2013). Rescue of *easily shocked* mutant seizure sensitivity in *Drosophila* adults: ethanolamine kinase and seizure susceptibility. *J. Comp. Neurol.* 521, 3500–3507.

Kroll, J.R., Wong, K.G., Siddiqui, F.M., and Tanouye, M.A. (2015). Disruption of endocytosis with the dynamin mutant *shibire^{ts1}* suppresses seizures in *Drosophila*. *Genetics* 201, 1087–1102.

Kumar, S., Chen, D., and Sehgal, A. (2012). Dopamine acts through cryptochrome to promote acute arousal in *Drosophila*. *Genes Dev.* 26, 1224–1234.

Kume, K., Kume, S., Park, S.K., Hirsh, J., and Jackson, F.R. (2005). Dopamine is a regulator of arousal in the fruit fly. *J. Neurosci.* 25, 7377–7384.

Lahaye, C., Augé, F., Soubrier, M., and Ceballos-Picot, I. (2014). New mutation affecting hypoxanthine phosphoribosyltransferase responsible for severe tophaceous gout. *Rheumatol.* 41, 1252–1254.

Lecompte, M., Cattaert, D., Vincent, A., Birman, S., and Chérif-Zahar, B. (2019). The *Drosophila* ammonium transporter Rh50 is required for integrity of larval muscles and neuromuscular system. *J. Comp. Neurol. In press*.

Lee, G., Kikuno, K., Bahn, J.-H., Kim, K.-M., and Park, J.H. (2013). Dopamine D2 receptor as a cellular component controlling nocturnal hyperactivities in *Drosophila melanogaster*. *Chronobiol. Int.* 30, 443–459.

Lesch, M., and Nyhan, W.L. (1964). A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function. *Am. J. Med.* 36, 561–570.

Liu, C., Plaçais, P.-Y., Yamagata, N., Pfeiffer, B.D., Aso, Y., Friedrich, A.B., Siwanowicz, I., Rubin, G.M., Preat, T., and Tanimoto, H. (2012). A subset of dopamine neurons signals reward for odour memory in *Drosophila*. *Nature* 488, 512–516.

Lloyd, K.G., Hornykiewicz, O., Davidson, L., Shannak, K., Farley, I., Goldstein, M., Shibuya, M., Kelley, W.N., and Fox, I.H. (1981). Biochemical evidence of dysfunction of brain neurotransmitters in the Lesch-Nyhan syndrome. *N. Engl. J. Med.* 305, 1106–1111.

Madeo, A., Di Rocco, M., Brassier, A., Bahi-Buisson, N., De Lonlay, P., and Ceballos-Picot, I. (2019). Clinical, biochemical and genetic characteristics of a cohort of 101 French and Italian patients with HPRT deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 127, 147–157.

Marks, J.F., Baum, J., Keele, D.K., Kay, J.L., and MacFarlen, A. (1968). Lesch-Nyhan syndrome treated from the early neonatal period. *Pediatrics* 42, 357–359.

Masino, S.A., Kawamura, M., and Ruskin, D.N. (2014). Adenosine receptors and epilepsy: current evidence and future potential. *Int. Rev. Neurobiol.* 119, 233–255.

McGuire, S.E., Le, P.T., Osborn, A.J., Matsumoto, K., and Davis, R.L. (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* 302, 1765–1768.

McGurk, L., Berson, A., and Bonini, N.M. (2015). *Drosophila* as an *in vivo* model for human neurodegenerative disease. *Genetics* 201, 377–402.

Meek, S., Thomson, A.J., Sutherland, L., Sharp, M.G.F., Thomson, J., Bishop, V., Meddle, S.L., Gloaguen, Y., Weidt, S., Singh-Dolt, K., et al. (2016). Reduced levels of dopamine and altered metabolism in brains of HPRT knock-out rats: a new rodent model of Lesch-Nyhan Disease. *Sci. Rep.* 6, 25592.

Nagoshi, E. (2018). *Drosophila* models of sporadic Parkinson’s disease. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 3343.

Nall, A.H., Shakhmantsir, I., Cichewicz, K., Birman, S., Hirsh, J., and Sehgal, A. (2016). Caffeine promotes wakefulness via dopamine signaling in *Drosophila*. *Sci. Rep.* 6, 20938.

Nyhan, W.L. (1997). The recognition of Lesch-Nyhan syndrome as an inborn error of purine metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.* 20, 171–178.

Nyhan, W.L. (2000). Dopamine function in Lesch-Nyhan disease. *Environ. Health Perspect.* 108, 409–411.

Nyhan, W.L. (2014). Nucleotide synthesis via salvage pathway. In ELS, John Wiley & Sons Ltd, ed. (John Wiley & Sons, Ltd).

de Oliveira, G.A.P., Rangel, L.P., Costa, D.C., and Silva, J.L. (2015). Misfolding, aggregation, and disordered segments in c-Abl and p53 in human cancer. *Front. Oncol.* **5**, 97.

Oriel, C., and Lasko, P. (2018). Recent developments in using *Drosophila* as a model for human genetic disease. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2041.

Papanikolopoulou, K., Mudher, A., and Skoulakis, E. (2019). An assessment of the translational relevance of *Drosophila* in drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **14**, 303–313.

Parker, L., Padilla, M., Du, Y., Dong, K., and Tanouye, M.A. (2011a). *Drosophila* as a model for epilepsy: bss is a gain-of-function mutation in the para sodium channel gene that leads to seizures. *Genetics* **187**, 523–534.

Parker, L., Howlett, I.C., Rusan, Z.M., and Tanouye, M.A. (2011b). Seizure and epilepsy: studies of seizure disorders in *Drosophila*. *Int. Rev. Neurobiol.* **99**, 1–21.

Pech, U., Pooryasin, A., Birman, S., and Fiala, A. (2013). Localization of the contacts between Kenyon cells and aminergic neurons in the *Drosophila melanogaster* brain using splitGFP reconstitution: splitGFP in *Drosophila* mushroom bodies. *J. Comp. Neurol.* **521**, 3992–4026.

Perrimon, N., Bonini, N.M., and Dhillon, P. (2016). Fruit flies on the front line: the translational impact of *Drosophila*. *Dis. Model. Mech.* **9**, 229–231.

Plaçais, P.-Y., de Treder, E., Scheunemann, L., Trannoy, S., Goguel, V., Han, K.-A., Isabel, G., and Preat, T. (2017). Upregulated energy metabolism in the *Drosophila* mushroom body is the trigger for long-term memory. *Nat. Commun.* **8**, 15510.

Reynolds, E.R. (2018). Shortened lifespan and other age-related defects in bang sensitive mutants of *Drosophila melanogaster*. *G3 (Bethesda)* **8**, 3953–3960.

Riemensperger, T., Isabel, G., Coulom, H., Neuser, K., Seugnet, L., Kume, K., Iche-Torres, M., Cassar, M., Strauss, R., Preat, T., et al. (2011). Behavioral consequences of dopamine deficiency in the *Drosophila* central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 834–839.

Riemensperger, T., Issa, A.-R., Pech, U., Coulom, H., Nguyễn, M.-V., Cassar, M., Jacquet, M., Fiala, A., and Birman, S. (2013). A single dopamine pathway underlies progressive locomotor deficits in a *Drosophila* model of Parkinson disease. *Cell. Rep.* **5**, 952–960.

Rival, T., Soustelle, L., Strambi, C., Besson, M.-T., Iché, M., and Birman, S. (2004). Decreasing glutamate buffering capacity triggers oxidative stress and neuropil degeneration in the *Drosophila* brain. *Curr. Biol.* **14**, 599–605.

Saito, Y., and Takashima, S. (2000). Neurotransmitter changes in the pathophysiology of Lesch–Nyhan syndrome. *Brain Dev.* **22**, S122–S131.

- Saras, A., and Tanouye, M.A. (2016). Seizure suppression by high temperature via cAMP modulation in *Drosophila*. *G3 (Bethesda)* 6, 3381–3387.
- Sass, J.K., Itabashi, H.H., and Dexter, R.A. (1965). Juvenile gout with brain involvement. *Arch. Neurol.* 13, 639–655.
- Scheuer, T. (2011). Regulation of sodium channel activity by phosphorylation. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 22, 160–165.
- Schretlen, D.J., Ward, J., Meyer, S.M., Yun, J., Puig, J.G., Nyhan, W.L., Jinnah, H.A., and Harris, J.C. (2005). Behavioral aspects of Lesch-Nyhan disease and its variants. *Dev. Med. Child Neurol.* 47, 673–677.
- Schram, K. H. (1998). Urinary nucleosides. *Mass Spectrom. Rev.* 17, 131–251.
- Seegmiller, J.E., Rosenbloom, F.M., and Kelley, W.N. (1967). Enzyme defect associated with a sex-linked human neurological disorder and excessive purine synthesis. *Science* 155, 1682–1684.
- Seugnet, L., Suzuki, Y., Thimgan, M., Donlea, J., Gimbel, S.I., Gottschalk, L., Duntley, S.P., and Shaw, P.J. (2009a). Identifying sleep regulatory genes using a *Drosophila* model of insomnia. *J. Neurosci.* 29, 7148–7157.
- Seugnet, L., Galvin, J.E., Suzuki, Y., Gottschalk, L., and Shaw, P.J. (2009b). Persistent short-term memory defects following sleep deprivation in a *Drosophila* model of Parkinson disease. *Sleep* 32, 984–992.
- Sinakevitch, I., Grau, Y., Strausfeld, N. J., and Birman, S. (2010). Dynamics of glutamatergic signaling in the mushroom body of young adult *Drosophila*. *Neural Dev.* 5, 10.
- Sinnett, S.E., and Brenman, J.E. (2016). The role of AMPK in *Drosophila melanogaster*. In *AMP-Activated Protein Kinase*, M.D. Cordero, and B. Viollet, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 389–401.
- Smith, D.W., and Friedmann, T. (2000). Characterization of the dopamine defect in primary cultures of dopaminergic neurons from hypoxanthine phosphoribosyltransferase knockout mice. *Mol. Ther.* 1, 486–491.
- Song, J., and Tanouye, M. (2008). From bench to drug: human seizure modeling using *Drosophila*. *Prog. Neurobiol.* 84, 182–191.
- Stenesen, D., Suh, J.M., Seo, J., Yu, K., Lee, K.-S., Kim, J.-S., Min, K.-J., and Graff, J.M. (2013). Dietary adenine controls adult lifespan via adenosine nucleotide biosynthesis and AMPK, and regulates the longevity benefit of caloric restriction. *Cell. Metab.* 17, 101–112.

Sun, J., Xu, A.Q., Giraud, J., Poppinga, H., Riemensperger, T., Fiala, A., and Birman, S. (2018). Neural control of startle-induced locomotion by the mushroom bodies and associated neurons in *Drosophila*. *Front. Syst. Neurosci.* *12*, 6.

Torres, R.J., and Puig, J.G. (2007). Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome. *Orphanet J. Rare Dis.* *2*, 48.

Torres, R.J., Deantonio, I., Prior, C., and Puig, J.G. (2004). Adenosine transport in peripheral blood lymphocytes from Lesch-Nyhan patients. *Biochem. J.* *377*, 733–739.

Torres, R.J., Prior, C., and Puig, J.G. (2007). Efficacy and safety of allopurinol in patients with hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency. *Metabolism* *56*, 1179–1186.

Vaccaro, A., Issa, A.-R., Seugnet, L., Birman, S., and Klarsfeld, A. (2017). *Drosophila* clock is required in brain pacemaker neurons to prevent premature locomotor aging independently of its circadian function. *PLoS Genet.* *13*, e1006507.

van Swinderen, B., and Andretic, R. (2011). Dopamine in *Drosophila*: setting arousal thresholds in a miniature brain. *Proc. Biol. Sci.* *278*, 906–913.

Visser, J.E., Bär, P.R., and Jinnah, H.A. (2000). Lesch–Nyhan disease and the basal ganglia. *Brain Res. Rev.* *32*, 449–475.

Waddell, S. (2010). Dopamine reveals neural circuit mechanisms of fly memory. *Trends Neurosci.* *33*, 457–464.

Wallrath, L.L., Burnett, J.B., and Friedman, T.B. (1990). Molecular characterization of the *Drosophila melanogaster* urate oxidase gene, an ecdysone-repressible gene expressed only in the malpighian tubules. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 5114–5127.

Weltha, L., Reemmer, J., and Boison, D. (2019). The role of adenosine in epilepsy. *Brain Res. Bull.* *151*, 46–54.

Wong, D.F., Harris, J.C., Naidu, S., Yokoi, F., Marenco, S., Dannals, R.F., Ravert, H.T., Yaster, M., Evans, A., Rousset, O., et al. (1996). Dopamine transporters are markedly reduced in Lesch-Nyhan disease *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *93*, 5539–5543.

Zhang, Y.Q., Roote, J., Brogna, S., Davis, A.W., Barbash, D.A., Nash, D., and Ashburner, M. (1999). stress sensitive B encodes an adenine nucleotide translocase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* *153*, 891–903.

Figures

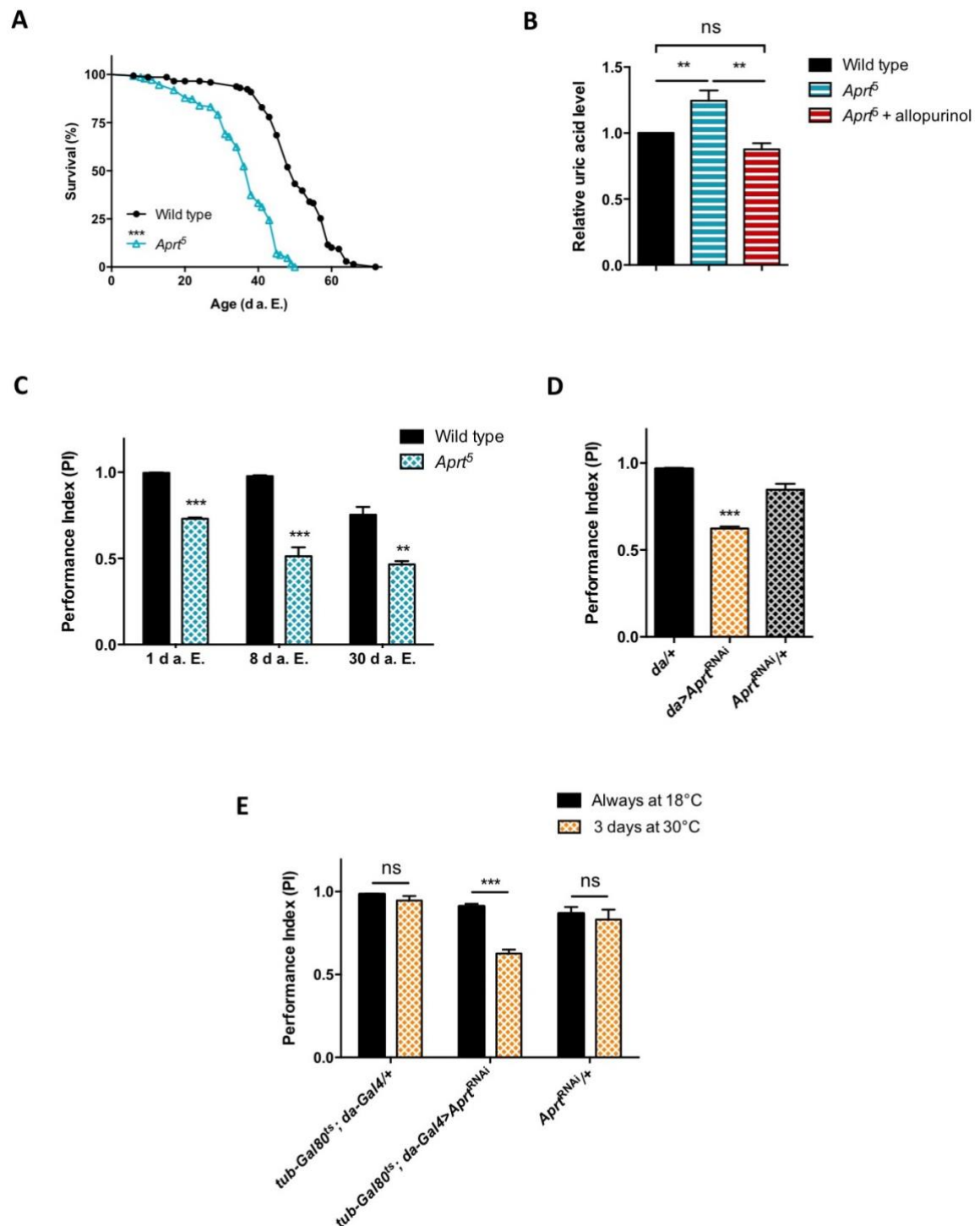


Figure 1. *Aprt* deficiency induces metabolic and neurobehavioral defects. (A) *Aprt⁵* mutant flies that are devoid of *Aprt* activity have a shortened lifespan compared to wild-type flies (median lifespan: 38 and 50 days, respectively). 3 independent

Résultats

experiments were performed on 150 flies per genotype with similar results and one representative experiment is shown. *** $p < 0.001$. **(B)** HPLC profiles on head extracts revealed an increase in uric acid levels in *Aprt*⁵ flies. Administration of 100 µg/ml allopurinol for 5 days before the test normalized uric acid level. Mean of 10 independent experiments (3 with allopurinol) performed on 40 heads per genotype. ** $p < 0.01$, ns: not significant. **(C)** *Aprt*⁵ mutant flies showed early defects in the SING test that monitor locomotor reactivity and climbing performance. This behavioral deficit was already obvious at 1 d a. E. (days after eclosion) and their performance decreased further up to 8 d a. E., after what it did not changed significantly up to 30 d a. E. Mean of 3 independent experiments performed on 50 flies per genotype. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. **(D)** Downregulating *Aprt* by RNAi in all cells (*da>Aprt*^{RNAi}) also led to an early impairment in climbing responses in the SING assay at 10 d a. E., as compared to the driver (*da/+*) and effector (*Aprt*^{RNAi/+}) only controls. **(E)** Adult-specific inactivation of *Aprt* (*tub-Gal80^{ts}; da-Gal4>Aprt*^{RNAi}) decreased startle-induced climbing abilities in the SING paradigm, suggesting that the locomotor impairment induced by *Aprt* deficiency is not caused by a developmental issue. Flies were raised at permissive temperature (18°C) in which Gal80^{ts} suppressed Gal4-controlled *Aprt*^{RNAi} expression, and were shifted from 18 to 30°C for 3 days before the test (between 7 and 10 d a. E.) to activate transgene expression. *** $p < 0.001$, ns: not significant.

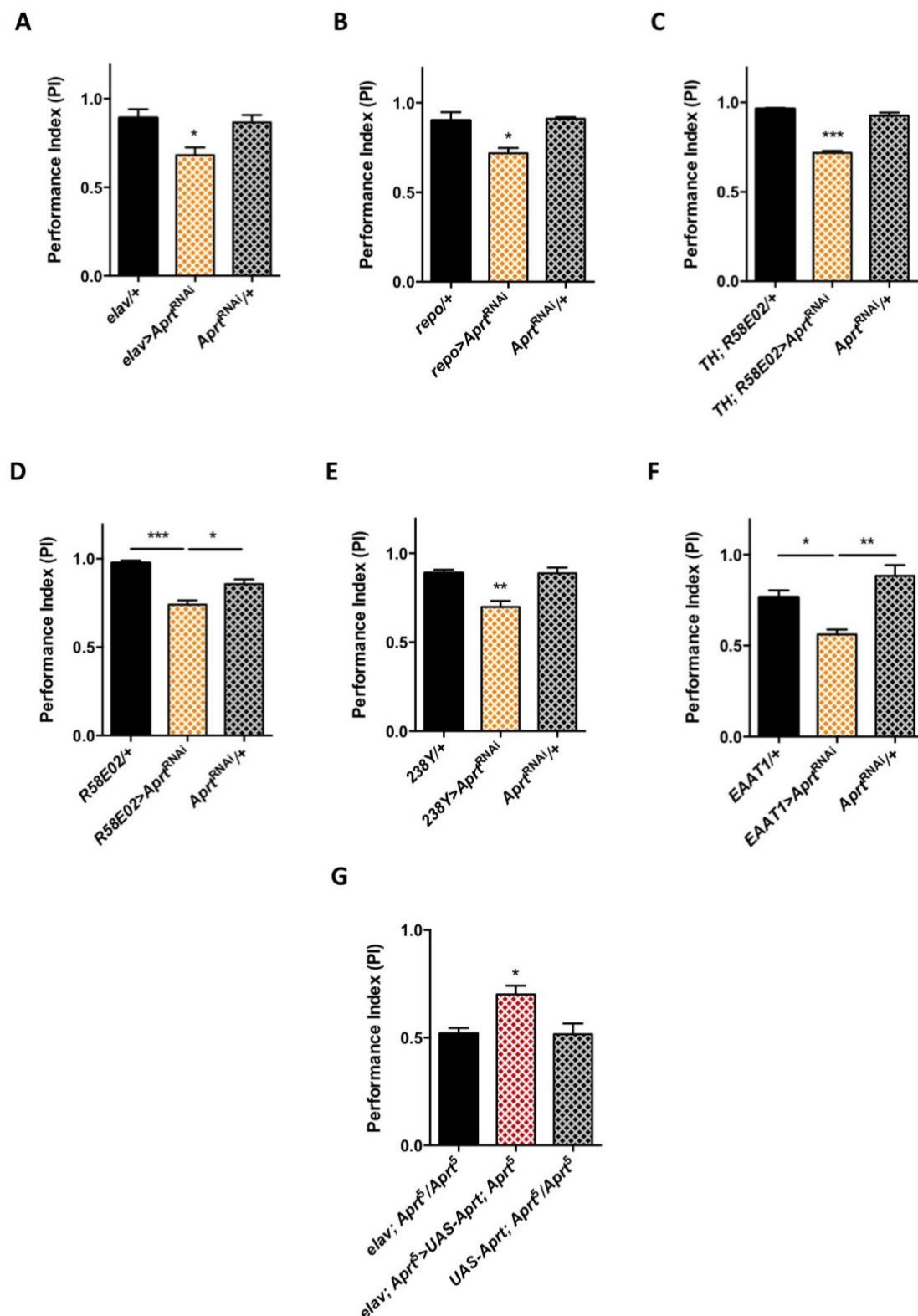


Figure 2. *Aprt* knockdown in MB-associated neurons or astrocytes induces locomotor reactivity defects. (A-B) Both pan-neuronal (*elav-Gal4*) (A) and pan-glial (*repo-Gal4*) (B) *Aprt^{RNAi}* expressions also induced defects in this test. (C-E) *Aprt* knockdown in all

Résultats

dopaminergic neurons with the *TH-Gal4*, *R58E02-Gal4* double driver (**C**), in the PAM DA neuron cluster only (*R58E02>Aprt^{RNAi}*) (**D**), or in all MB intrinsic neurons with *238Y-Gal4* (**E**) similarly led to a decrease in SING performance. Further experiments confirming this cell specificity are shown in Fig. S5. (**F**) For glial cells, an early decline in the locomotor response to startle was only observed by expressing *Aprt^{RNAi}* in astrocyte subsets with the *EAAT1-Gal4* driver. (**G**) Pan-neuronal expression of wild-type *Aprt* in all neurons partially rescued the locomotor reactivity of *Aprt⁵* mutants. Results of 3 or 4 independent experiments performed on 50 flies per genotype at 10 d a. E. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

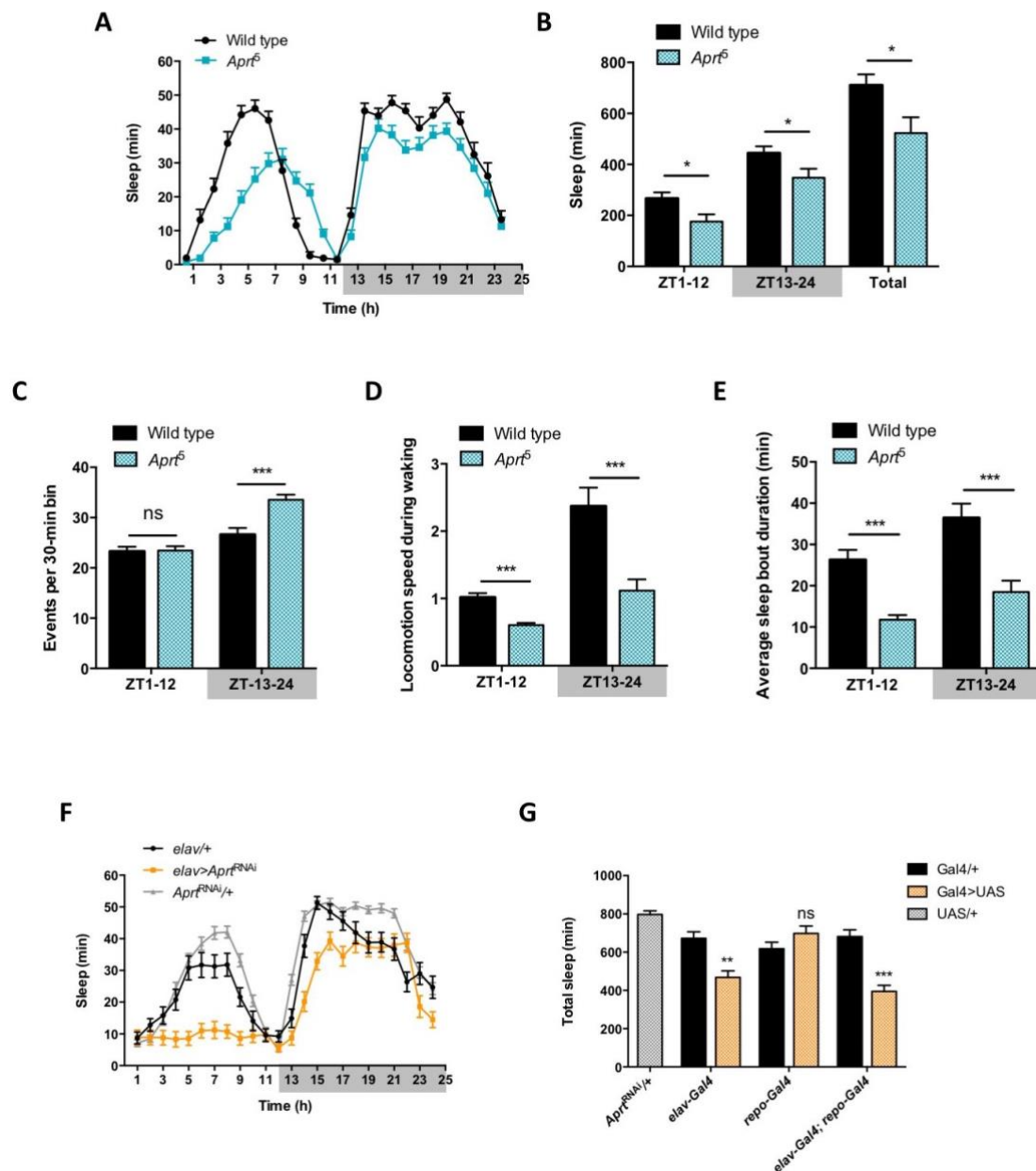


Figure 3. Spontaneous locomotor activity and sleep patterns of *Aprt* deficient flies.

(A) Sleep pattern during a typical 24h LD cycle showing that the total amount of sleep is smaller during day and night in *Aprt*⁵ mutants compared to wild-type flies. (B) Quantification of day (ZT1-12), night (ZT13-24) and total sleep in *Aprt*⁵ mutants. ZT is for Zeitgeber, a German term that means “time giver”. (C) Quantification of total spontaneous locomotor activity during day and night over 5 LD cycles. *Aprt*⁵ mutants show a higher activity at night but no difference in spontaneous locomotion with wild-type flies during the day. Mean of 3 independent experiments performed on 32 flies per genotype. ****p* < 0.001, ns: not significant. (D) Locomotion speed during waking is reduced in *Aprt*⁵ mutants. (E) The average sleep bout duration is also decreased in *Aprt*⁵ mutants, indicating that *Aprt* deficiency leads to a fragmented sleep. (F) Sleep pattern of *elav*[>]*Aprt*^{RNAi} flies, showing that knock-down of *Aprt* in all neurons led to

Résultats

sleep reduction during the night, similarly to the mutant condition, and an even more profound sleep defect during the day. **(G)** Quantification of total amount of sleep when *Aprt* was downregulated in all neurons (*elav-Gal4*), all glial cells (*repo-Gal4*) and both neurons and glial cells (*elav-Gal4; repo-Gal4*). Except for glia only, the resulting effect was a significant sleep reduction.

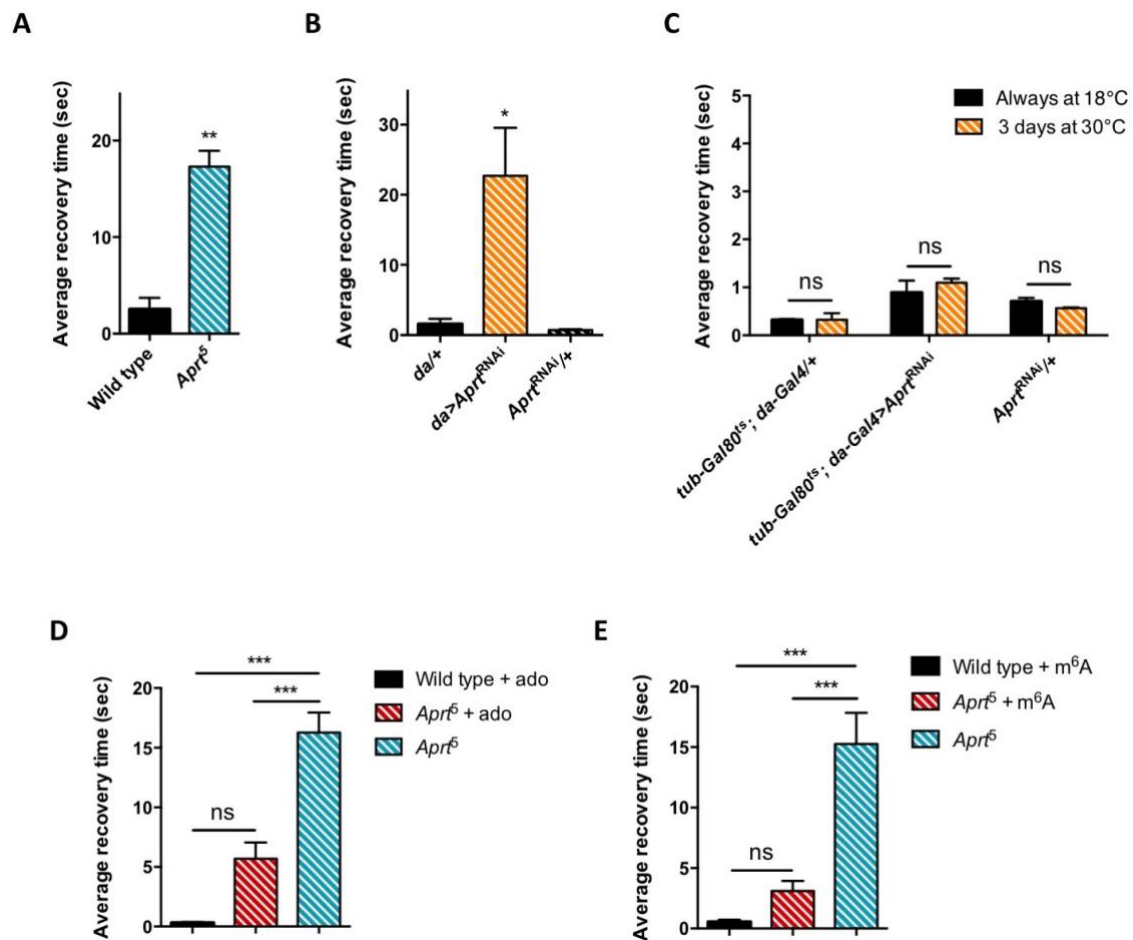


Figure 4. *Aprt* deficiency triggers a seizure-like phenotype. (A) At 30 d a. E., *Aprt⁵* mutants need a much longer time than wild-type flies to recover from a strong mechanical shock, showing a seizure-like BS phenotype characterized by tonic-clonic phases with paralysis. (B) RNAi-mediated downregulation of *Aprt* in all cells (*da>Aprt^{RNAi}*) also led to a BS phenotype in adults at 30 d a. E. but not in driver and effector controls. (C) *Aprt* knock-down by RNAi during the adult stage for 3 days before the test was not enough to induce a BS behavior, suggesting that it could be caused by a developmental defect or a longer inactivation of *Aprt*. Results of 3 independent experiments performed on 50 flies per genotype. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns: not significant. (D - E) The BS phenotype of 30-day-old *Aprt⁵* mutants was rescued by feeding either 500 μ M adenosine (ado) (D) or 500 μ M *N*⁶-methyladenosine (m⁶A) (E) during all developmental stages plus 5 days before the test. Results of 4 or 5 independent experiments performed on 50 flies per genotype. *** $p < 0.001$, ns: not significant.

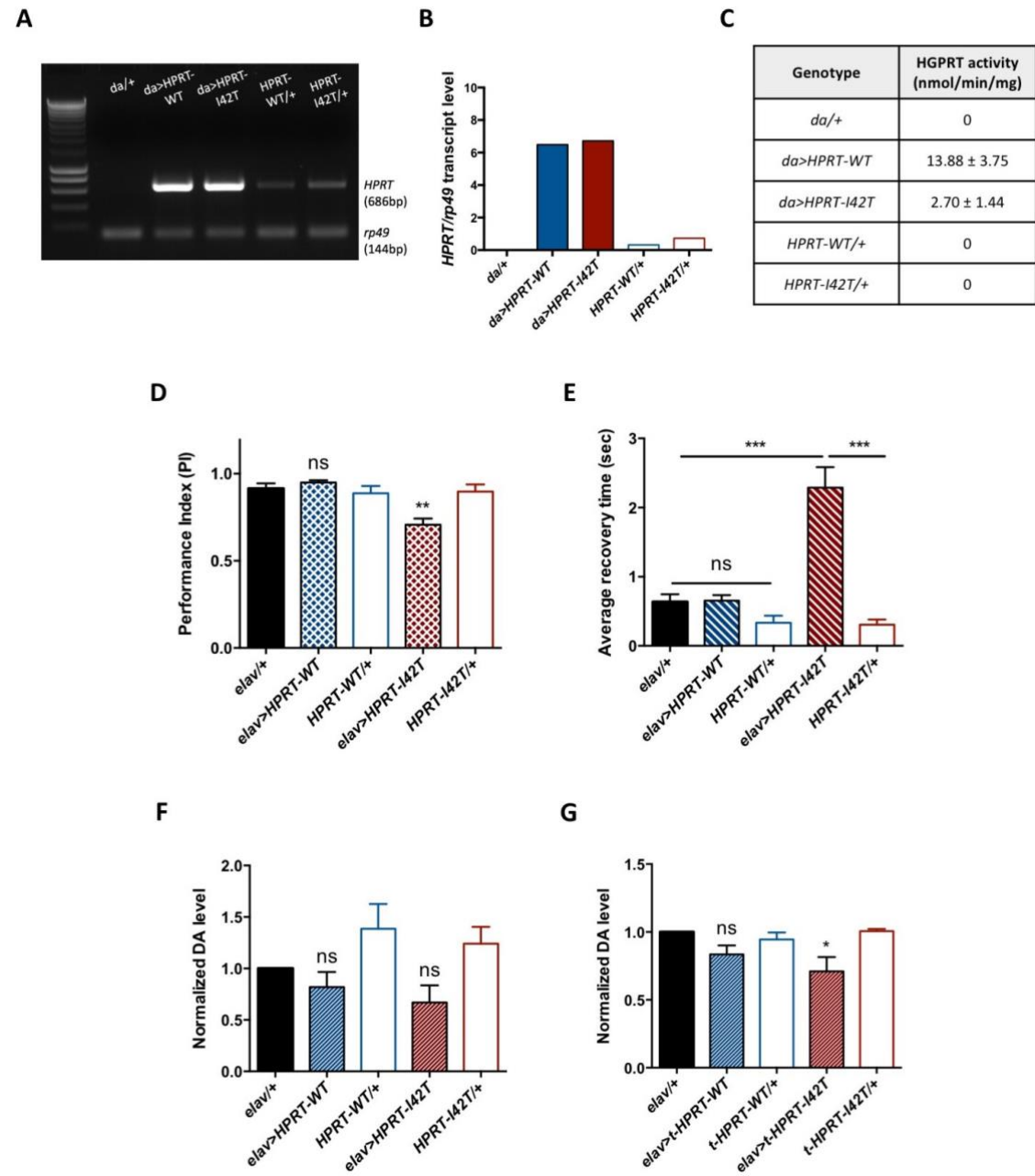


Figure 5. Expression of the pathogenic but not wild-type isoform of human HGPRT induces neuronal defects in flies. (A-C) Transgenic expression of human *HPRT* cDNAs in *Drosophila*. (A) Ubiquitous expression allows the amplification of human *HPRT* transcripts by RT-PCR in head extracts of *da>HPRT-WT* and *da>HPRT-I42T* flies. A band with lower intensity was also detected in the effector controls (*HPRT-WT/+* and *HPRT-I42T/+*), and not in the driver control (*da/+*), which could originate from a small amount of driver-independent transgene expression. (B) Quantification of the previous RT-PCR experiment. (C) Enzymatic assay performed on fly extracts revealed a significant amount of HGPRT activity in *da>HPRT WT*-flies and a much lower activity in *da>HPRT-I42T* flies. No HGPRT activity was detected in control lines, even in the effector controls that seemed to be leaking by RT-PCR. (D, E) Expression of the

pathogenic form in all neurons (*elav>HPRT-I42T*), but not of the wild-type form (*elav>HPRT-WT*) induced an early locomotor SING defect at 15 d a. E. (**D**) and a prominent BS phenotype at 30 d a. E. (**E**), as compared to the driver (*elav/+*) and effector (*HPRT I42T/+*) only controls. Results of 3 independent experiments performed on 50 flies per genotype. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: not significant. (**F, G**) Expression in all neurons of the untagged (*elav>HPRT-I42T*) (**F**) or tagged (*elav>t-HPRT-I42T*) (**G**) mutant forms appeared to decrease DA levels in brain extracts, as compared to the controls. However, this effect was significant, only with the tagged I42T mutant, possibly due to the high variability between samples. 10 brains were dissected per experiment and genotype, and 3 independent experiments were performed. * $p < 0.05$, ns: not significant.

Supplementary figures

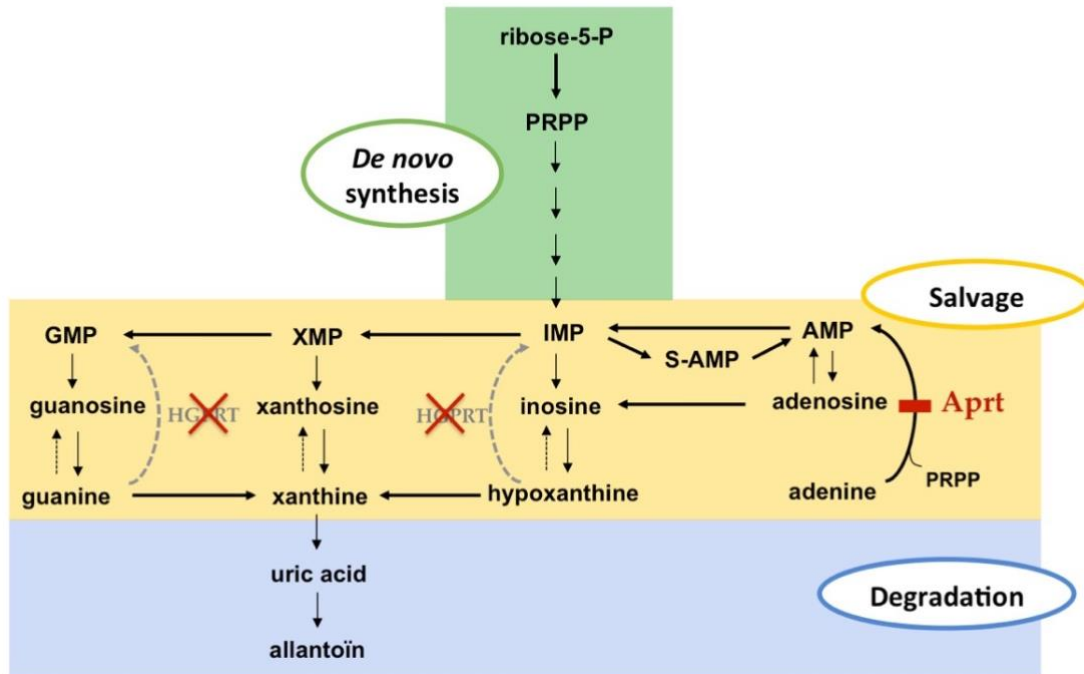


Figure S1. Schematic diagram of purine metabolism in *Drosophila melanogaster*. The pathways for *de novo* synthesis and degradation of purines are similar in *Drosophila* and mammals, while purine recycling is different. Indeed, the HGPRT enzyme, known in mammals and many other phyla to recycle hypoxanthine and guanine into IMP and GMP, respectively, do not have an ortholog in *Drosophila*. However, the APRT enzyme, which converts adenine into AMP, has been conserved, suggesting that *Drosophila* Aprt is the only recycling enzyme of the salvage pathway in this organism. AMP: adenosine monophosphate; APRT: adenine phosphoribosyltransferase; GMP: guanosine monophosphate; HGPRT: hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, IMP: inosine monophosphate; PRPP: phosphoribosyl pyrophosphate; S-AMP: succinyl-AMP; XMP: xanthosine monophosphate.

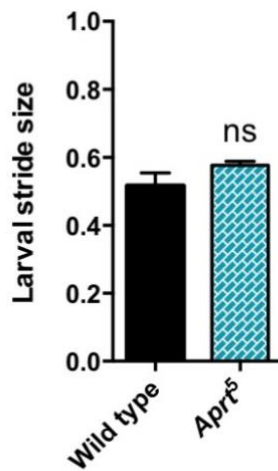


Figure S2. Larval locomotion of *Aprt* mutants. The size of the stride corresponds to the distance crawled by the larva during one peristaltic wave of muscle contraction and is an index of larval locomotor performance. The 3rd-instar larvae of *Aprt*⁵ mutants did not show any defects in crawling. Results of 3 independent experiments performed on 5 larvae per genotype. ns: not significant.

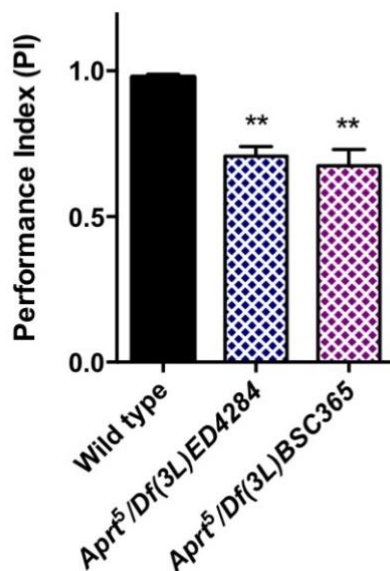


Figure S3. SING behavior of hemizygous *Aprt* mutant flies. *Df(3L)ED4284* and *Df(3L)BSC365* are deficiencies located in 62B4-B12 and 62B7-D3, respectively, that removes *Aprt* and several neighbour genes. Hemizygous *Aprt*⁵ flies, in which the mutation was placed over these deficiencies, showed an early locomotor decline in the SING assay at 10 d a. E., similarly to homozygous *Aprt*⁵ flies. Results of 3-4 independent experiments performed on 50 flies per genotype. ** $p < 0.01$.

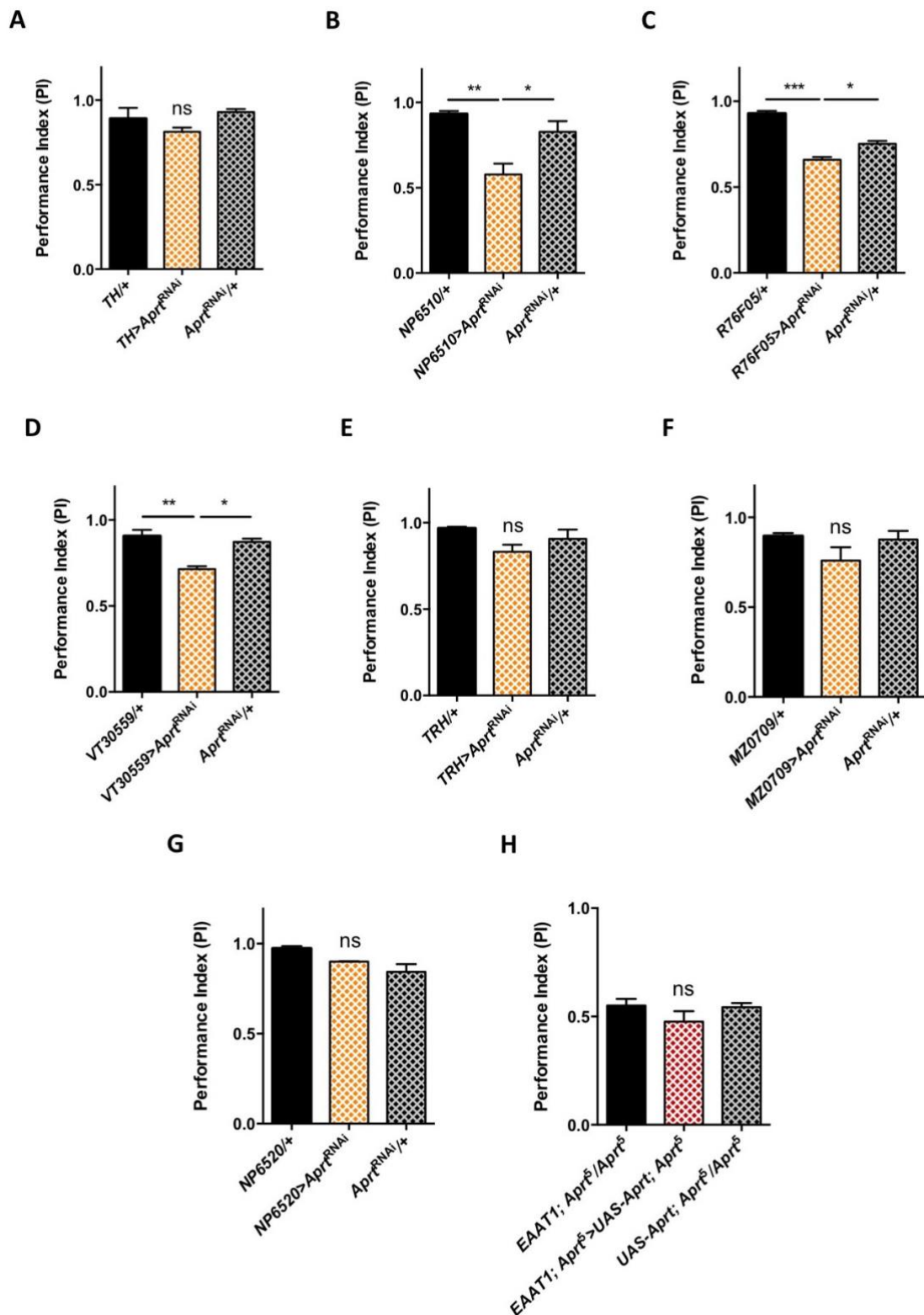


Figure S4. Downregulation of *Aprt* expression in PAM DA or MB intrinsic neurons alters SING performances (A) RNAi-mediated *Aprt* inactivation in all DA neurons except a large part of the PAM cluster with the *TH-Gal4* driver did not lead to locomotor defects in the SING assay. (B) In contrast, *Aprt* inactivation selectively in the

DA neurons of the PAM cluster using either *NP6510-Gal4* or *R76F05-Gal4* significantly decreased climbing performance. (D) To confirm the results of Fig. 2E, we have tested another specific MB neurons driver (*VT30559-Gal4*) and similarly observed a locomotor defect when *Appt*^{RNAi} is expressed in MB intrinsic cells. (E- G) *Appt* downregulation targeted either in serotonergic neurons with *TRH-Gal4* (E), or ensheathing glial cells using *MZ0709-Gal4* (F) or *NP6520-Gal4* (G), did not alter startle-induced climbing response of the flies. (H) Expressing wild-type *Appt* in astrocyte-like glia with the *EAAT1-Gal4* driver did not rescue the deficits in climbing response of the *Appt*⁵ mutant. Results of 3 or 4 independent experiments performed on 50 flies per genotype at 10 d a. E. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: not significant.

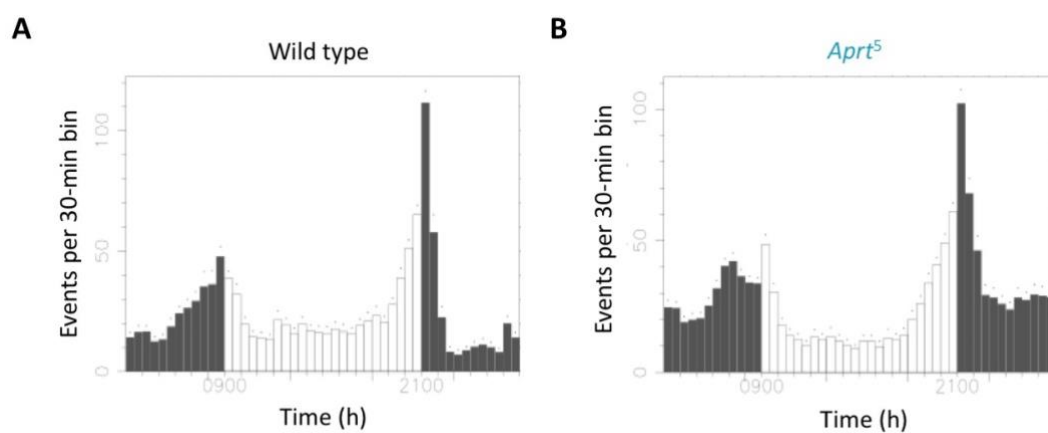


Figure S5. Daily locomotor activity profiles of wild-type flies and *Appt*⁵ mutants. Actograms showing activity profiles during a 12-12h light:dark (LD) cycles from wild-type (A) and *Appt*⁵ (B) male flies at 8 d a. E. *Appt* deficiency does not seem to alter circadian activity.

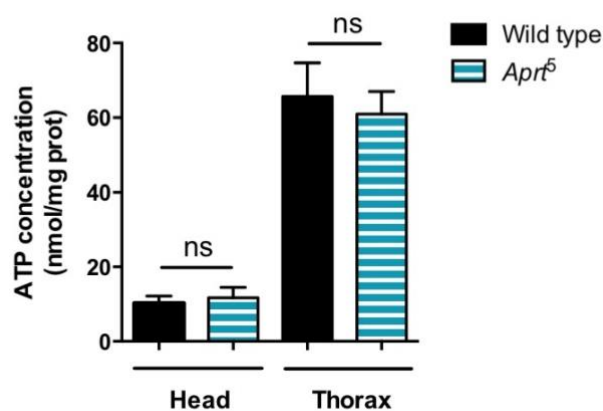


Figure S6. ATP level is not affected in head and thorax of *Appt*⁵ flies. ATP was measured by bioluminescence with recombinant firefly luciferase activity. Mean of 3 or 4 independent experiments performed on 30 heads or 5 thoraces per genotype. ns: not significant.

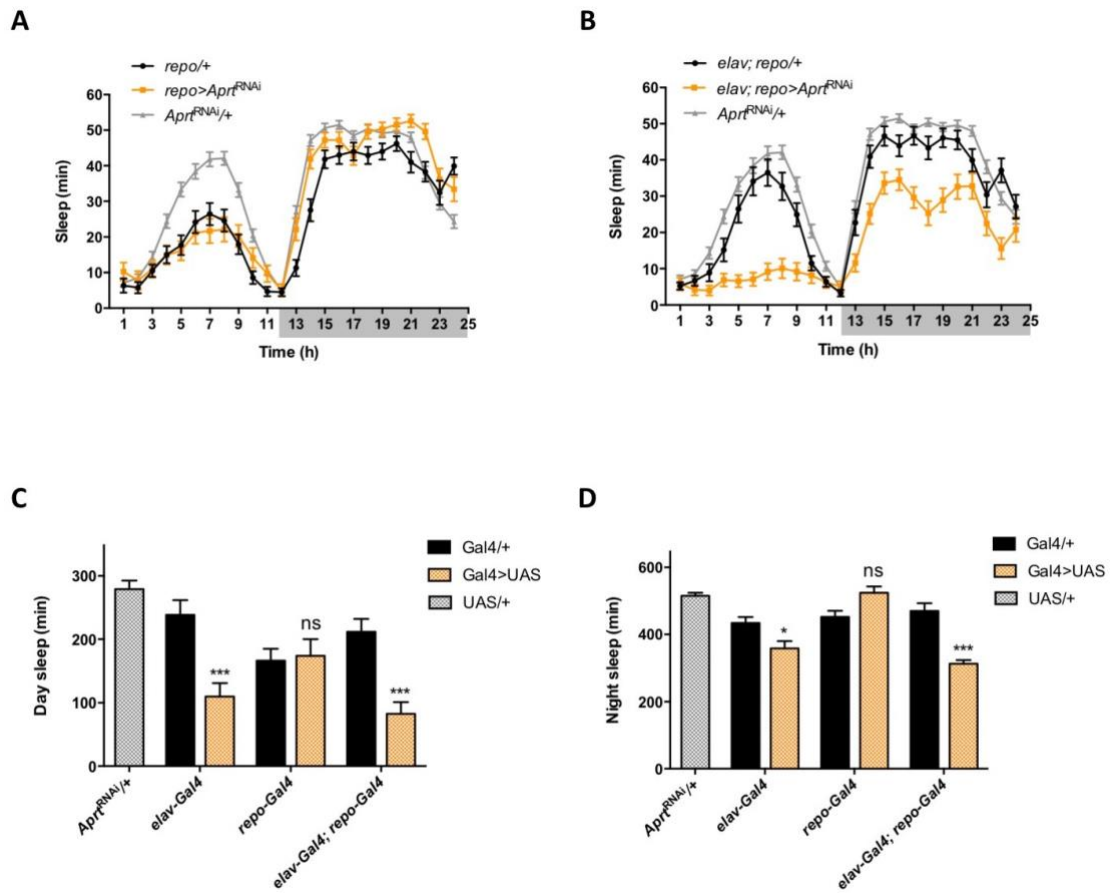


Figure S7. Sleep patterns of *Aprt*-deficient flies. (A) Sleep pattern of *repo*^{>*Aprt*^{RNAi} flies, showing that knock-down of *Aprt* in all glial cells did not induce any sleep defect. (B) In contrast, knocking down *Aprt* in all neurons and glial cells (*elav; repo*^{>*Aprt*^{RNAi}) led to sleep reduction during both day and night, as with *elav-Gal4* driver alone (see Fig. 3F). (C-D) Quantification of amount of sleep during day (C) and night (D) when *Aprt* was downregulated by RNAi in all neurons (*elav-Gal4*), all glial cells (*repo-Gal4*) and both neurons and glial cells (*elav-Gal4; repo-Gal4*). In both cases, sleep reduction was observed when *Aprt* was inactivated in neurons but not in glial cells, and sleep was not significantly more affected when the double driver for neurons and glial cells was used, compared to the pan-neuronal driver alone.}}

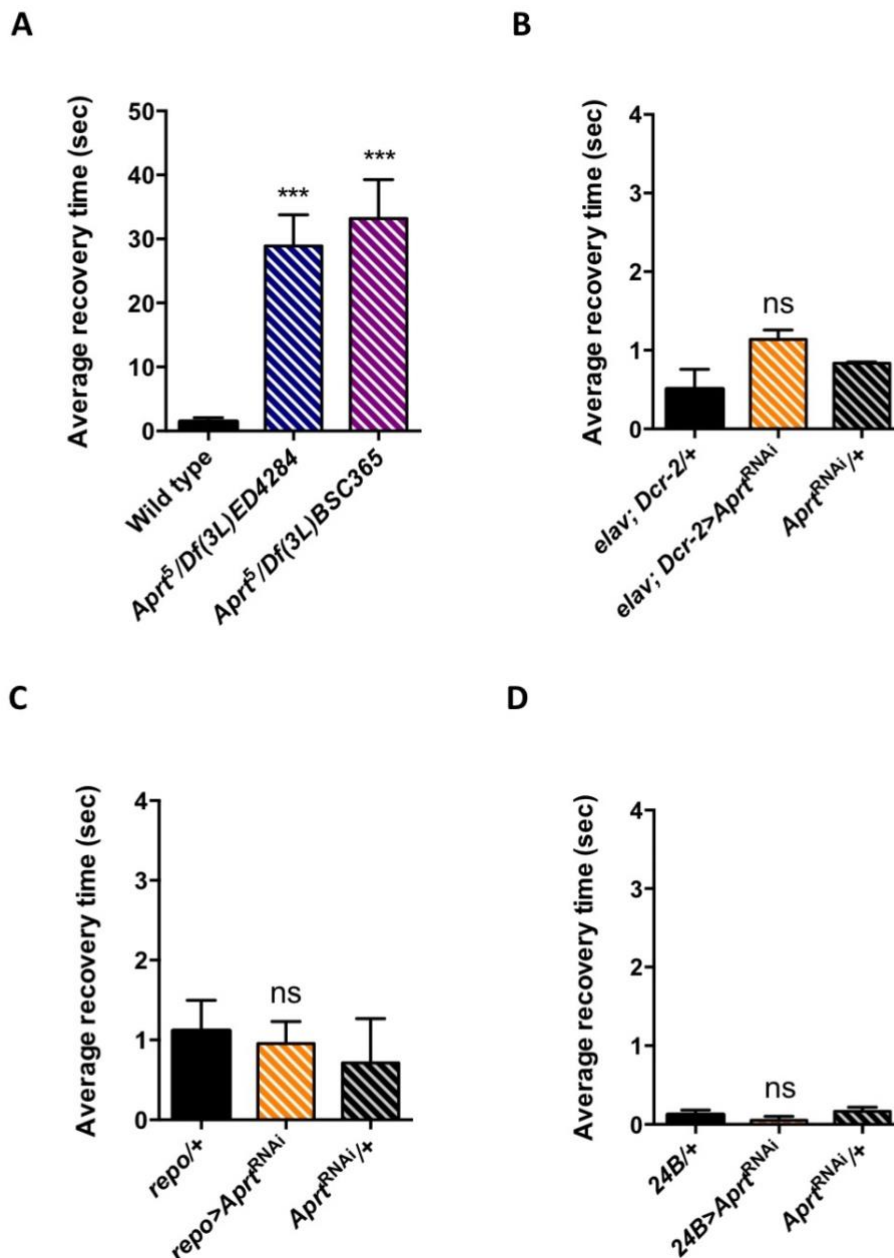


Figure S8. Cell-specific *Aprt* inactivation does not induce bang-sensitivity. (A) At 30 d a. E., hemizygous *Aprt⁵* mutants showed a strong BS phenotype. Results of 2-4 independent experiments performed on 50 flies per genotype. *** $p < 0.001$. (B-D) The downregulation of *Aprt* expression by RNAi selectively in all neurons (B), all glial cells (C) or all muscles (D) did not induce a seizure phenotype, at variance with its ubiquitous downregulation (Fig. 4B). Results of 2 or 3 independent experiments performed on 50 flies per genotype at 30 d a. E. ns: not significant.

Résultats

Gene	Primers	Sequences
<i>HPRT</i>	P1-EcoRI (forward)	5'- AGGGAATTGG GAATTC GAGAT <u>ACAAA</u> ATGGGTCACC
<i>HPRT</i>	P2-XbaI (reverse)	5'- ACAAAGATCCT CTAGAG CTCGGATCCTTATCATTAC

The added restriction sites are in bold type. The bases modified to match the *Drosophila* translation initiation consensus sequence are underlined.

Table S1. Primers used to generate *UAS-t-HPRT* constructs

Gene	Primers	Sequences
<i>HPRT-I42T</i>	P1-T125C (forward)	5'-CAGTCCTGTCCATAGTTAGTCCATGAGGAATAAACACCCT
<i>HPRT-I42T</i>	P2-T125C (reverse)	5'-AGGGTGTTTATTCCTCATGGACTAACTATGGACAGGACTG
<i>HPRT</i>	P1-EcoRI (forward)	5'- AGGGAATTGG GAATTC CAAGAAGGAGAT <u>ACAAA</u> ATGGC
<i>HPRT</i>	P2-XbaI (reverse)	5'- ACAAAGATCCT CTAGAG CTCGGATCCTTATCATTAC

The mutation added is in red. The added restriction sites are in bold type. The bases modified to match the *Drosophila* translation initiation consensus sequence are underlined.

Table S2. Primers used to generate *UAS-HPRT* constructs.

Genotype	Sex	Aprt activity (nmol/min/mg prot)
Wild type	males	1.32 ± 0.17
	females	2.77 ± 0.27
<i>Aprt</i> ⁵	males and females	0.04 ± 0.02
<i>Aprt</i> ⁵ / <i>Df(3L)ED4284</i>	males	0.02 ± 0.01
<i>da</i> /+	males	2.78 ± 0.41
<i>da>Aprt</i> ^{RNAi}	males	0.10 ± 0.01
<i>Aprt</i> ^{RNAi} /+	males	2.16 ± 0.37

Table S3. Aprt enzyme activity in wild-type and Aprt-deficient flies. Aprt activity can be measured in wild-type Canton-S *Drosophila* and females show more activity than males. No Aprt activity has been detected in homozygous *Aprt*⁵ or hemizygous *Df(3L)ED4284/Aprt*⁵ mutant flies. Ubiquitous downregulation of Aprt expression by RNAi with *da-Gal4* (*da>Aprt*^{RNAi}) led to reduction in activity by about 96.4 % and 95.4 % compared to the *da*/+ and *Aprt*^{RNAi}/+ controls. Results are presented as mean ± SEM.

Genotype	t-HGPRT activity (nmol/min/mg)
<i>da</i> /+	0
<i>da>t-HPRT-WT</i>	3.16 ± 0.25
<i>da>t-HPRT-I42T</i>	0
<i>t-HPRT-WT</i> /+	0
<i>t-HPRT-I42T</i> /+	0

Table S4. HGPRT activity in transgenic flies expressing wild-type or pathogenic mutant forms of human HPRT tagged at the N-terminal site. The *HPRT* gene is absent in *Drosophila*, therefore no HGPRT activity is detected in *da*/+ and *t-HPRT*/+ control lines. In contrast, ubiquitous expression of wild-type human N-terminal tagged t-HPRT in flies induced enzymatic activity in fly tissues (*da>t-HPRT-WT*), while the expression of the N-terminal tagged pathogenic mutant form t-HPRT-I42T did not yield any detectable activity (*da>t-HPRT-I42T*).

Chapitre IV. Discussion et conclusion

Discussion

Ces travaux de thèse avaient pour buts : 1- d'explorer les interactions entre la voie de recyclage des purines et le système DAergique chez la drosophile et 2- de développer des modèles *in vivo* de la MLN chez cet organisme, dans le but de mieux comprendre les mécanismes pathologiques de cette maladie et d'identifier si possible de nouvelles cibles thérapeutiques.

1. Rôle de l'Aprt dans l'homéostasie du système dopaminergique chez la drosophile

Comme décrit dans l'Introduction, les études biochimiques et de neuroimagerie réalisées sur les patients atteints de MLN ont démontré une perturbation globale du système DAergique dans les ganglions de la base, à savoir un déficit important en DA, une diminution des activités enzymatiques de la TH et de la DDC, une diminution du transporteur DAT et une augmentation des récepteurs D₁ et D₂ (Lloyd *et al.*, 1981 ; Saito *et al.*, 1999 ; Wong *et al.*, 1996 ; Ernst *et al.*, 1996). Malgré de nombreuses hypothèses avancées dans le but d'expliquer comment une absence d'activité HGPRT peut donner lieu à des altérations spécifiques de la neurotransmission DAergique, les mécanismes exacts impliqués restent à ce jour inconnus.

1.1 L'expression de l'Aprt et la synthèse de DA sont inversement corrélées chez la drosophile

Nos travaux ont confirmé l'absence d'homologue et d'activité HGPRT chez la drosophile. Par conséquent, nous avons dans un premier temps étudié l'influence d'un déficit en Aprt, la seule enzyme de recyclage des purines chez cet organisme, sur le système DAergique. De façon inattendue et contrairement à ce qui est observé dans la MLN, nous avons constaté une augmentation significative de l'expression de la TH et des taux de DA dans le cerveau de drosophile mutantes pour l'Aprt.

Un premier point technique pourrait être soulevé ici. Concernant la DA, un dosage par HPLC avait dans un premier temps été réalisé sans l'obtention de résultats significatifs, probablement à cause d'une trop grande variabilité des échantillons inhérente à la méthode utilisée. C'est pourquoi nous avons par la suite effectué un immunomarquage anti-DA *in situ* sur les cerveaux disséqués, avec des résultats plus probants. Cependant, il serait intéressant et sans doute plus précis d'utiliser la sonde fluorescente GRAB_{DA} développée récemment (Sun *et al.*, 2018a), qui permet de mesurer la DA extracellulaire directement en imagerie cérébrale par microscopie à deux photons sur des cerveaux de drosophile.

Bien qu'un déficit en DA soit un résultat robuste dans la MLN, une dérégulation de la TH est quant à elle plutôt controversée. Certaines études n'ont ainsi pas trouvé de diminution de l'immunoréactivité de la TH dans la SN de patients (Saito *et al.*, 1999) ou de souris déficientes en HGPRT (Jinnah *et al.*, 1994). Par contre, une surexpression des récepteurs D₁ a été mise en évidence dans le putamen des patients LN (Saito *et al.*, 1999) et il a été suggéré que cette hypersensibilité, probablement induite par une activité DAergique présynaptique réduite, serait en cause dans le comportement d'automutilation. Dans notre étude, une augmentation importante de l'expression des récepteurs dDA1 et DAMB, mais pas de dD2R, a également été détectée chez les mutants *Aprt*, mais celle-ci n'est *a priori* pas liée à une diminution de l'activité DAergique présynaptique étant donné que la TH et la DA sont augmentés dans ces conditions. Cette augmentation transcriptionnelle pourrait être due à une désensibilisation des récepteurs induite par la concentration anormalement élevée en DA dans le mutant *Aprt*.

Une autre possibilité serait que l'augmentation de la biosynthèse de la DA (TH/DA) et celle des récepteurs de la DA soient médiées par des mécanismes indépendants affectant le développement du système DAergique durant le processus de différenciation neuronale. Ainsi, une dérégulation de facteurs de transcription ou de signalisation impliqués dans le développement précoce des nDA du mésencéphale a

été démontré dans un modèle cellulaire de la MLN utilisant des nDA de souris déficientes en HGPRT (Lewers *et al.*, 2008), ce qui a été confirmé par la suite dans plusieurs autres publications (Ceballos-Picot *et al.*, 2009 ; Guibinga *et al.*, 2010 ; Kang *et al.*, 2011 ; Guibinga *et al.*, 2012 ; Torres & Puig, 2015). Dans notre étude, nous avons regardé l'expression d'un de ces facteurs de transcription, *engrailed*, qui ne semble pas affectée par l'absence d'Aprt chez la drosophile. Il pourrait être intéressant de mesurer l'expression d'autres gènes comme *Wnt4*, *Lmx1a*, *tap* (homologue de *Ngn*), *fhk* (homologue de *FoxA*) ou *Drop* (homologue de *Msx*), dont les homologues chez l'homme ont été tous montrés comme étant apparemment dérégulés dans la MLN (Guibinga *et al.*, 2010 ; Torres & Puig, 2015).

Comment expliquer que la mutation de l'Aprt chez la drosophile augmente les taux de DA, alors que l'inverse se produit dans le cas d'une mutation de l'HGPRT chez l'Homme ? Etant donné que l'enzyme mutée dans notre modèle est différente de celle responsable de la MLN, nous pouvions nous attendre à des divergences. Toutefois, il faut noter qu'une mutation de l'APRT chez l'Homme n'entraîne pas de défauts DAergiques, il est donc remarquable que l'absence d'Aprt entraîne des effets sur ce système chez la drosophile, même s'ils sont opposés à ceux induits par l'absence d'HGPRT. De façon intéressante, plusieurs publications ont montré qu'une absence d'activité HGPRT entraîne une augmentation secondaire de l'activité APRT dans les globules rouges ou le foie, mais aussi dans le striatum, le thalamus et le cortex humains (Rosenbloom *et al.*, 1967 ; Greene *et al.*, 1970 ; Shin-Buehring *et al.*, 1980 ; Lloyd *et al.*, 1981). Nos résultats suggèrent que cette augmentation, probablement due à la biodisponibilité accrue de PRPP, cofacteur commun aux deux enzymes, pourrait être en partie à l'origine du déficit DAergique observé chez les patients LN. En effet, nous avons observé qu'une surexpression de l'Aprt entraîne une diminution significative de l'expression de la TH chez la drosophile. A notre connaissance, cette possibilité d'une implication de l'Aprt dans la MLN n'a pas encore été testée sur des modèles rongeurs.

Discussion

Ces premiers résultats suggèrent que le recyclage des purines est un processus métabolique essentiel pour la régulation de l’expression du phénotype moléculaire des nDA chez la drosophile, comme c’est le cas chez l’Homme.

1.2 La régulation du système dopaminergique par l’Aprt est potentiellement médiée par le récepteur de l’adénosine AdoR

Afin de comprendre plus précisément comment l’activité Aprt influence le système DAergique, nous avons dans un premier temps étudié son profil d’expression. D’après les données disponibles sur Flybase, l’Aprt de drosophile est exprimée depuis le stade embryonnaire, plus fortement dans les tubes de Malpighi (équivalent du rein) et la spermathèque, modérément dans la tête, l’intestin, les corps gras, les glandes salivaires, le cœur et les ovaires, et plus faiblement dans le cerveau, les ganglions thoraciques et les testicules (Figure 28).

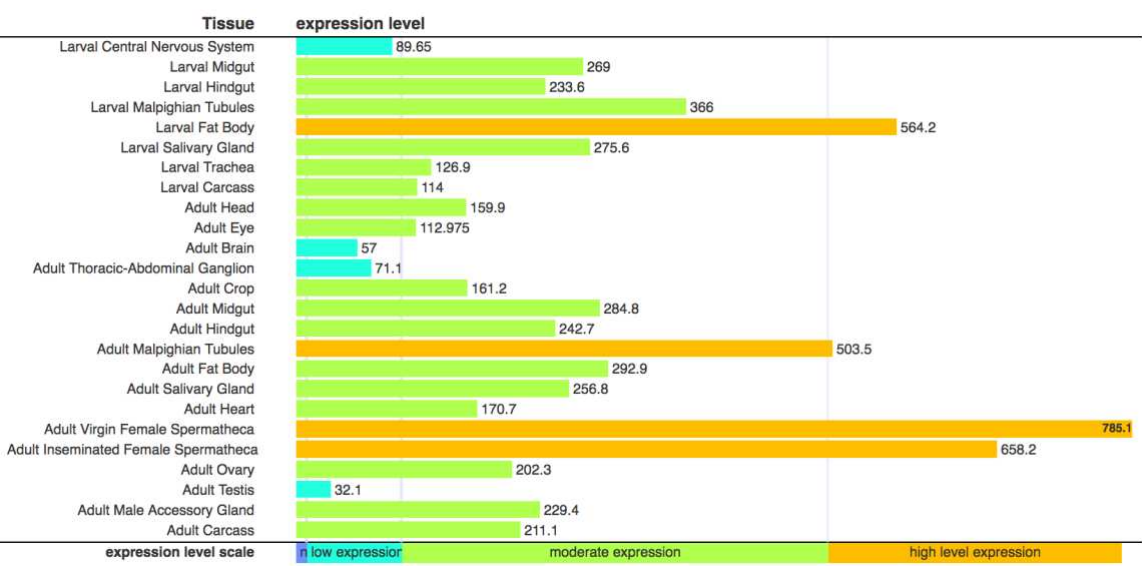


Figure 28 : Niveaux d’expression de l’Aprt dans différents tissus de la drosophile

L’Aprt est plus fortement exprimée dans les tubes de Malpighi et la spermathèque, et plus faiblement dans la tête et le SNC. Extrait de *Fly Atlas Anatomy Microarray*: <https://flybase.org/reports/FBgn0000109>

Nous avons tenté de caractériser le profil d’expression de l’Aprt dans le cerveau par immunohistochimie, et notamment de rechercher une colocalisation avec les nDA

marqués par la TH. Malheureusement, ni l'utilisation d'un anticorps commercial contre l'Aprt humaine, ni une tentative de génération d'un anticorps spécifique de l'Aprt de drosophile nous ont permis d'observer de façon certaine la localisation de l'Aprt, étant donné le résultat négatif des analyses par Western Blot de ces 2 anticorps (données non présentées dans ce manuscrit). Une analyse transcriptomique sur cellules uniques publiée récemment atteste cependant d'une expression diffuse de l'Aprt dans le cerveau, et notamment dans certains nDA ainsi que dans des neurones des MB et des cellules gliales (Davie *et al.*, 2018, <http://scope.aertslab.org>). Il est donc possible que l'Aprt régule directement la TH au sein des nDA de façon cellule autonome, mais il semblerait qu'elle soit toutefois très peu exprimée au sein de ces derniers. Nous avons donc recherché un autre mécanisme par lequel l'Aprt pourrait réguler la TH.

Notre hypothèse s'est rapidement portée sur l'adénosine et l'implication de son unique récepteur chez la drosophile, AdoR, en raison d'interactions antagonistes fortes existant entre les récepteurs DAergiques et adénosinergiques chez les mammifères (Franco *et al.*, 2000 ; Fuxe *et al.*, 2010 ; Borroto-Escuela *et al.*, 2016 ; Pinna *et al.*, 2018 ; Borroto-Escuela & Fuxe, 2019). De plus, des études ont montré que l'application d'adénosine module transitoirement la libération de DA dans le striatum de rat via les récepteurs A₁ (Okada *et al.*, 1996 ; Ross & Venton, 2015). Nous n'avons pas observé de différence concernant le niveau d'expression du récepteur AdoR chez les mutants *Aprt* par rapport à des drosophiles contrôles, ce qui ne renseigne toutefois pas sur son niveau d'activation. Par contre, une augmentation de plus de deux fois du niveau d'expression du seul transporteur d'adénosine connu chez la drosophile, *Ent2*, a été observée. Un article précédent rapporte une importante augmentation de ce transporteur chez des drosophiles mutantes pour le récepteur AdoR (Knight *et al.*, 2010). Il est donc possible que la signalisation AdoR soit moins activée dans le mutant *Aprt*. De plus, la diminution des taux d'adénosine que nous avons observée chez les mutants *Aprt* soutient cette hypothèse. Le fait que l'expression d'AdoR ne soit pas affectée dans ce mutant suggère qu'un des rôles physiologiques de ce récepteur pourrait être d'informer la cellule sur la concentration ambiante en adénosine afin de

Discussion

réguler en conséquence le niveau d'expression de *Ent2* et d'autres gènes du système adénoenergique.

Nos résultats sur le mutant *AdoR* montrent que ce récepteur influence aussi directement le système DAergique. En effet, des niveaux d'expression plus élevés de la *TH* et de *DAMB* ont été retrouvés dans ce mutant, du même ordre de grandeur que pour le mutant *Aprt*. Ceci laisse supposer que l'augmentation de ces marqueurs DAergiques dans le mutant *Aprt* proviendrait d'une diminution de la stimulation du récepteur *AdoR*, en raison des taux réduits d'adénosine. Ce résultat suggère également qu'en conditions physiologiques, le récepteur de l'adénosine inhiberait l'expression de la *TH* et de *DAMB*. Ceci n'a jamais été démontré chez la drosophile, cependant une étude du groupe de Marc Freeman a proposé que l'octopamine et la tyramine soient capables d'inhiber les nDA via l'activation indirecte d'un récepteur *AdoR* présent à leur surface, comme décrit dans l'introduction (D.5.3) de ce manuscrit (Ma *et al.*, 2016). De plus, nous avons montré qu'une désensibilisation du récepteur *AdoR* par de fortes concentrations en adénosine augmente l'expression de la *TH* chez des drosophiles sauvages. Il semble donc qu'en conditions physiologiques le récepteur *AdoR* ait effectivement un rôle inhibiteur sur les nDA et limite l'expansion du système DAergique de la drosophile. Il aurait été intéressant de surexprimer *AdoR* en contexte mutant pour l'*Aprt* afin de voir s'il est possible de normaliser par ce biais l'expression de la *TH*, mais la surexpression de ce récepteur est létale au cours du développement (Dolezelova *et al.*, 2007).

A ce stade, il est intéressant de tenter un parallèle entre ces observations et une étude chez le rat montrant que l'application d'adénosine ou d'un agoniste sélectif des récepteur *A₁* diminue le niveau extracellulaire de DA striatale, alors que l'application d'antagoniste sélectif l'augmente (Okada *et al.*, 1996). Il semble donc que le récepteur *AdoR* de drosophile, bien que présentant une plus forte homologie avec le récepteur *A_{2A}* de mammifères, ait une fonction similaire à celle du récepteur *A₁* sur le système DAergique.

2. Influences de la signalisation dopaminergique et adénosinergique sur l'expression et l'activité de l'Aprt

Afin d'avoir un schéma plus complet des interactions entre systèmes purinergiques et DAergiques, nous avons analysé les conséquences réciproques d'altérations du système DAergique, à savoir une perte de la DA ou des récepteurs DAergiques dDA1 et DAMB, sur l'expression et l'activité de l'Aprt. Nos résultats montrent que des drosophiles déficientes en DA dans le SNC présentent une forte diminution de l'expression et de l'activité Aprt, tout comme les mutants pour le récepteur de type D₁ dDA1, ce qui n'est en revanche pas le cas des mutants pour le récepteur DAMB. De plus, une diminution spécifique de dDA1 dans les neurones des corps pédonculés, où il est connu pour être enrichi (Kim *et al.*, 2003), affecte négativement l'expression et l'activité Aprt. Nous pouvons supposer que l'Aprt est normalement régulée par l'activation de seconds messagers, et qu'en absence de DA, les récepteurs DAergiques présents à la membrane post-synaptique ne seraient pas activés, n'induisant donc pas de cascade de transduction secondaire du signal, ce qui entraînerait une diminution de l'Aprt. Ceci serait valable en absence du récepteur DAergique lui-même. Ainsi, ces résultats indiquent que la DA est requise pour une activité Aprt normale, par l'activation du récepteur post-synaptique dDA1 et probablement par sa cascade de transduction intracellulaire. D'autres analyses seraient nécessaires afin par exemple de regarder si les niveaux d'AMPc/PKA sont diminués dans ce mutant.

En conclusion, comme présenté sur le schéma hypothétique de la Fig. 6 dans l'article 1 qui prend l'exemple des synapses entre les nDA et les corps pédonculés, nous proposerions qu'une baisse de l'activité Aprt dans les neurones des corps pédonculés entraînerait une diminution de la libération d'adénosine, ce qui aurait pour conséquence une moindre activation du récepteur AdoR à la surface des nDA. La diminution de stimulation du récepteur AdoR lèverait son inhibition sur la TH, et la biosynthèse de la DA se trouverait alors augmentée, ayant pour conséquence de rétablir, via la signalisation du récepteur dDA1, un taux normal d'activité Aprt dans les

neurones des corps pédonculés. Une diminution de l'Aprt diminuerait aussi la signalisation AdoR à la surface des neurones des corps pédonculés, entraînant d'une part une augmentation de l'expression de DAMB, et d'autres parts une plus forte expression du transporteur Ent2, comme nous l'avons observé dans le mutant *Aprt*, ce qui aurait pour effet de normaliser le taux d'adénosine intracellulaire. Une augmentation de l'activité Aprt aurait l'effet inverse, augmentant la signalisation adénosinergique en particulier dans les nDA, et cette régulation homéostatique tendrait à ramener à un niveau physiologique constant la transmission dopaminergique.

Nous avons aussi observé que les taux d'expression et d'activité de l'Aprt étaient diminués dans le contexte du mutant AdoR. Il est possible que l'augmentation d'un facteur 10 de l'expression de Ent2 dans ce mutant (Knight *et al.*, 2010) entraîne un flux entrant élevé d'adénosine qui inhiberait l'expression et l'activité de l'Aprt par une régulation de type rétrocontrôle négatif par le produit final, au niveau à la fois transcriptionnel et post-transcriptionnel (comme indiqué sur le schéma de la Fig. 6 de l'article 1). A cela pourrait s'ajouter le fait que le récepteur dDA1 serait en partie désensibilisé par les taux anormaux de DA résultant de l'absence de régulation par AdoR, ce qui contribuerait également à diminuer l'expression de l'Aprt.

L'augmentation de l'expression des récepteurs dDA1 et DAMB dans le mutant *Aprt* pourrait être liée à un mécanisme différent de celui de la TH, par exemple à une désensibilisation en réponse à l'augmentation de DA, ou à une interaction antagoniste avec le récepteur AdoR, comme c'est le cas chez les mammifères (Fuxe *et al.*, 2010). Ce dernier diminuerait l'affinité du récepteur DAergique pour son ligand, ce qui provoquerait en retour une augmentation de sa transcription. Cependant, seule l'expression du récepteur DAMB est augmentée dans le mutant AdoR, alors que celle du récepteur dDA1 est inchangée, contrairement aux mutants *Aprt* où elle est également augmentée. Il est donc possible que ces deux récepteurs soient régulés par des voies différentes : l'expression de DAMB serait directement modulée par le

récepteur AdoR, tandis que celle de dDA1 dépendrait plutôt de la signalisation DAergique.

Dans l'ensemble, nos résultats ne résolvent pas tout dans ces régulations complexes, mais indiquent que la voie de signalisation DAergique médiée par le récepteur D₁ dDA1 joue un rôle central dans la régulation de l'activité Aprt, et que la régulation du système DAergique par l'Aprt est médiée au moins en partie par l'activation du récepteur adénosinergique AdoR. Plus largement, cette première étude a permis de mettre en évidence des interactions physiologiques réciproques entre le recyclage des purines et le système DAergique dans le cerveau de drosophile.

Il a été précédemment suggéré qu'une diminution des taux d'adénosine pourrait être impliquée dans la pathogenèse de la MLN (Visser *et al.*, 2000). Notamment, des analyses de lymphocytes de patients ont montré une diminution des niveaux transcriptionnels et protéiques du récepteur A_{2A} (García *et al.*, 2009 ; García *et al.*, 2012) et du transport de l'adénosine (Torres *et al.*, 2004), et des modèles animaux ont conforté cette hypothèse (Miñana *et al.*, 1984 ; Criswell *et al.*, 1988 ; Jinnah *et al.*, 1990 ; Bertelli *et al.*, 2006). Cependant, un traitement par administration d'adénosine ou dans le but d'augmenter la concentration de ce neuromodulateur n'a jamais été tenté chez les patients atteints de MLN à notre connaissance. Même si les conséquences sur le système DAergique semblent différentes, notre modèle a permis de mettre en évidence un rôle de l'adénosine et de son récepteur dans les interactions entre la voie de recyclage des purines et le système DAergique. Il pourrait s'agir d'une nouvelle stratégie à explorer dans le traitement de la MLN, d'autant plus qu'une administration aigue d'un agoniste du récepteur A₁ a permis par exemple de ralentir le développement d'une dystonie des membres postérieurs dans un modèle de la maladie de Huntington chez le rat (Blum *et al.*, 2002).

3. Conséquences d'une déficience en Aprt sur le plan métabolique et neurocomportemental

Outre les marqueurs DAergiques, la drosophile est un très bon modèle pour analyser les effets de mutations sur la longévité et certaines fonctions neurophysiologiques et comportementales. Étant donné les caractéristiques de la MLN, nous avons évalué les conséquences d'un déficit en Aprt sur la durée de vie des drosophiles, les niveaux de purines, le comportement moteur, les états de veille et de sommeil et le comportement épileptique.

3.1 Rôle de l'Aprt dans la longévité des drosophiles

Nous avons observé que les drosophiles homozygotes mutantes pour l'Aprt ont une durée de vie considérablement réduite par rapport aux drosophiles sauvages. Cela peut paraître surprenant car une étude a montré que des mutants hétérozygotes pour l'Aprt ont une durée de vie plus longue (Stenesen *et al.*, 2013). Les mêmes auteurs ont également révélé qu'une supplémentation d'adénine dans le bol alimentaire réduit l'extension de longévité conférée par la restriction calorique ou par la mutation hétérozygote du gène *adss* permettant la synthèse d'AMP. Leurs données suggèrent qu'une réduction de consommation d'adénine a des effets bénéfiques sur la longévité, et que les niveaux de cette purine doivent être finement régulés pour ne pas être toxiques. Dans notre cas, en absence d'Aprt, l'adénine est certainement moins consommée mais il est possible que son accumulation confère une certaine toxicité. Il a en effet été montré chez la bactérie *Escherichia coli* que des niveaux importants d'adénine peuvent être toxiques (Levine & Taylor, 1982). Cependant, cette étude indique que des mutants de l'Aprt sont résistants à la toxicité de l'adénine, ce qui suggère que l'effet toxique de l'adénine passe par sa conversion en AMP. On peut toutefois supposer que chez la drosophile, comme chez l'Homme, l'excès d'adénine soit converti en un composé toxique (i.e 2,8-DHA chez l'Homme) qui pourrait affecter l'équivalent du système rénal et induire une mort précoce.

Une autre hypothèse pour expliquer la durée de vie plus courte des drosophiles déficientes en Aprt impliquerait l'AMP kinase (AMPK). De nombreuses publications ont en effet exploré le rôle de l'AMPK dans la régulation de la longévité (Sinnott & Brenman, 2016, Su *et al.*, 2019) et ont par exemple démontré qu'une inactivation de l'AMPK par ARNi dans les corps gras ou les muscles de drosophiles adultes réduit la longévité (Stenesen *et al.*, 2013), tout comme son inactivation ubiquitaire sous privation de nourriture (Johnson *et al.*, 2010). L'AMPK est allostériquement activée par l'AMP. Elle a pour rôle de surveiller l'état énergétique de la cellule et réagit après tout stress provoquant une élévation du rapport AMP:ATP (Hardie, 2003). Nous n'avons pas trouvé de changement au niveau de la concentration d'ATP dans les mutants Aprt, bien que nous n'ayons pas regardé chez des drosophiles âgées, mais il est possible que l'AMP, produit de l'Aprt, soit diminué en l'absence d'une enzyme fonctionnelle. Ceci entraînerait une diminution de l'activation de l'AMPK, néfaste pour la longévité.

D'autres pistes peuvent être envisagées. Une étude chez la drosophile montre qu'une augmentation du catabolisme de la SAM accroît sa longévité (Obata & Miura, 2015). On peut donc supposer qu'une accumulation de SAM diminuerait la durée de vie des drosophiles. Ce composé n'a pas été détecté dans les mutants Aprt, mais nous avons seulement regardé chez des drosophiles jeunes. De plus, des drosophiles élevées en milieu riche en purines et ayant une augmentation des taux d'acide urique, induite par réduction du gène codant pour l'urate oxydase, ont une longévité réduite (Lang *et al.*, 2019). Cet effet serait médié par le récepteur de l'insuline et ses effecteurs en aval, FoxO et NOX (NADPH oxydase). L'augmentation d'acide urique retrouvée dans les mutants Aprt, associée à une possible accumulation d'adénine, pourrait donc être en cause dans la réduction de la longévité. Pour vérifier cela, il serait intéressant de réaliser un test de longévité après ajout d'allopurinol tout au long de la vie de la drosophile, ce qui comme nous l'avons démontré normalise les niveaux d'acide urique.

On peut enfin imaginer que l'absence d'Aprt affecte plus largement des mécanismes connus pour être impliqués dans le vieillissement prématuré des drosophiles, comme

les processus de réparation de l'ADN (Shaposhnikov *et al.*, 2015), le système ubiquitine-protéasome (Tonoki *et al.*, 2009), l'autophagie (Juhász *et al.*, 2007), ou plus largement le stress oxydatif (Deepashree *et al.*, 2019). Nos résultats suggèrent en conclusion qu'un déficit en Aprt est néfaste pour le vieillissement normal des drosophiles, comme c'est le cas d'un déficit en HGPRT chez l'Homme.

3.2 Rôle de l'Aprt dans la régulation des taux d'acide urique

La première conséquence directe d'une mutation du gène *HPRT* chez l'Homme est une surproduction d'acide urique. De façon remarquable, une augmentation de ce composé a été détectée dans les têtes des mutants Aprt. Pourtant, une mutation de l'Aprt chez l'Homme entraîne une surproduction de 2,8-DHA, mais pas d'acide urique. Ce résultat peut s'expliquer par une possible accélération de la voie de synthèse *de novo* des purines, due à une augmentation de la biodisponibilité du PRPP, cofacteur de l'Aprt, et à une régulation positive des nucléotides sur cette synthèse, comme il a été observé chez l'Homme. Les ratios entre voie de synthèse *de novo* et recyclage des purines n'étant déjà pas les mêmes entre les tissus humains et murins (Moyer & Henderson, 1983), on peut supposer que la drosophile accélère plus fortement la voie de synthèse *de novo* en absence d'Aprt, que ne le ferait l'Homme.

De surcroît, ce résultat peut paraître surprenant étant donné que la drosophile, contrairement à l'Homme, est capable de dégrader l'acide urique en allantoiné grâce à l'urate oxydase. Cependant, cette enzyme est exprimée seulement dans les tubes de Malpighi, l'équivalent du rein chez les insectes (Wallrath *et al.*, 1990). Il est donc normal d'observer une accumulation d'acide urique dans les têtes, où l'urate oxydase n'est pas supposée être exprimée. Nous avons également pu normaliser cette augmentation d'acide urique par ajout d'allopurinol dans le milieu nutritif des drosophiles, comme cela est possible chez l'Homme, renforçant la validité du modèle.

3.3 Rôle de l'Aprt dans la régulation du comportement locomoteur induit par un choc mécanique

Le test de géotaxie négative induite par un choc (test *SING*) nous a permis de mettre en évidence un défaut locomoteur très précoce chez les mutants Aprt, visible dès le premier jour après éclosion. Ce résultat diffère de façon frappante avec ce que l'on observe classiquement dans des modèles de la MP chez la drosophile, où le déclin locomoteur accéléré apparaît aux alentours de 25 jours (Feany & Bender, 2000 ; Riemensperger *et al.*, 2013). Cette observation paraît cohérente avec le développement précoce de la MLN en comparaison à la MP.

Étant donné qu'un déficit en DA est connu pour être en cause dans le défaut moteur associé à la MP, et que ce neurotransmetteur contrôle le comportement locomoteur chez la drosophile (Friggi-Grelin *et al.*, 2003a ; Jordan *et al.*, 2006 ; Riemensperger *et al.*, 2011 ; Bou Dib *et al.*, 2014 ; Agrawal *et al.*, 2015 ; Vaccaro *et al.*, 2017 ; Sun *et al.*, 2018), il serait logique de postuler que le phénotype observé chez les mutants Aprt puissent provenir d'un manque de DA, dû à un défaut métabolique précoce ou un effet développemental plutôt qu'à un phénomène de neurodégénérescence. Néanmoins cette hypothèse n'est pas en accord avec la mesure des taux de DA réalisée chez ces mutants qui montre une augmentation. Toutefois, et comme mentionné dans l'introduction (D.4.3), une stimulation des nDA peut affecter négativement les performances locomotrices des drosophiles (Sun *et al.*, 2018b). Il se pourrait donc qu'une augmentation de la signalisation DAergique induite par l'absence d'Aprt ait le même effet. Nos analyses complémentaires sur les larves mutantes pour l'Aprt et les drosophiles dont l'Aprt a été inactivée spécifiquement à l'âge adulte ont réfuté l'hypothèse d'un effet développemental dû à une absence précoce de l'Aprt. En effet, l'inactivation de l'Aprt seulement à l'âge adulte suffit pour altérer les performances locomotrices des drosophiles.

L'inactivation ciblée de l'Aprt a par ailleurs montré que cette enzyme est requise dans les neurones, et particulièrement les nDA pour un comportement locomoteur normal. Plus précisément, l'Aprt semble être cruciale dans certains neurones du PAM par ailleurs connus pour contrôler la locomotion des drosophiles (Riemensperger *et al.*, 2013 ; Bou Dib *et al.*, 2014 ; Agrawal *et al.*, 2015) car une absence d'Aprt dans les nDA excepté le PAM n'induit pas de défaut locomoteur, tandis qu'une inactivation de l'Aprt spécifiquement dans ces neurones affecte la réactivité locomotrice. Il est possible qu'un niveau d'activité faible de l'Aprt perturbe le métabolisme de ces neurones, qui ne répondent alors plus de façon adéquate à l'induction du choc. Une inactivation de l'Aprt dans les neurones des MB induit également un déclin locomoteur précoce. Cette structure reçoit des projections des nDA du PAM et est enrichie en récepteurs DAergiques (Waddell, 2010). De plus, il a été montré que l'activation des neurones des lobes α' , β' et γ des MB diminue la réponse locomotrice au test *SING* (Sun *et al.*, 2018b), donc nous pouvons supposer qu'une diminution de l'activité Aprt provoquerait une suractivation de ces neurones. Ce dernier article montre également que l'activation du récepteur dDA1 est requise dans les MB pour induire un déficit locomoteur. Étant donné que ce récepteur est surexprimé dans les mutants Aprt, il est aussi possible que le déclin locomoteur observé provienne de ce dérèglement de signalisation DAergique. Il serait intéressant d'inactiver le récepteur dDA1, en contexte mutant pour l'Aprt, afin de vérifier cette hypothèse.

Une diminution des capacités locomotrices a aussi été mise en évidence par inactivation de l'Aprt dans les cellules gliales, et plus particulièrement dans les cellules de type astrocytaires exprimant le récepteur glutamatergique EAAT1. Cependant, le sauvetage des capacités locomotrices des mutants Aprt par réintroduction d'une Aprt fonctionnelle dans ces cellules n'a pas été possible, contrairement aux neurones. Il serait aussi intéressant de tenter un sauvetage dans les nDA ou les neurones des MB, afin d'évaluer l'implication de ces sous-types neuronaux. Ce résultat suggère néanmoins que l'expression neuronale, et non gliale, de l'Aprt est suffisante pour assurer un comportement *SING* fonctionnel. Toutefois, le sauvetage observé n'est que

partiel. Il est possible que l'expression de l'Aprt dans les neurones et la glie puisse permettre un sauvetage complet, ce qui serait à tester. Alternativement, le sauvetage partiel pourrait résulter d'un effet dominant négatif de la mutation *Aprt*⁵ sur l'activité Aprt, comme le suggère le dosage enzymatique réalisé sur des mutants hétérozygotes.

Par ailleurs, il n'a pas été possible de sauver ce défaut locomoteur par administration d'allopurinol dans le milieu nutritif, ce qui suggère comme dans la MLN que l'augmentation d'acide urique n'est pas en cause dans le défaut locomoteur observé. D'autres composés puriques tels que l'adénine, l'hypoxanthine, l'adénosine et la N⁶-méthyladénosine ont été testés mais n'ont pas montré non plus d'effet positif sur le SING. Le défaut locomoteur des mutants Aprt ne serait donc pas dû à un manque de ces purines. D'autres composés pourraient être testés tels que la SAM ou l'halobenzazépine (SCH-23390), un antagoniste sélectif des récepteurs D₁ fonctionnant également chez la drosophile (Yellman *et al.*, 1994 ; Sugamori *et al.*, 1995).

Pour conclure, l'expression de l'Aprt semble être cruciale dans les neurones et la glie, et en particulier dans les neurones DAergiques du PAM et les MB, et dans les astrocytes exprimant EAAT1, pour des performances locomotrices normales dès les premiers jours de vie. Un parallèle peut être fait avec les troubles moteurs observés dans la MLN, et notamment le caractère hypotonique qui apparaît précocement dans la vie du nourrisson, l'empêchant de se tenir droit sans support.

3.4 Rôle de l'Aprt dans la régulation du cycle veille/sommeil

En regard du défaut locomoteur observé, nous avons supposé qu'un problème musculaire pourrait être à l'origine d'une plus faible propension des drosophiles à grimper dans les colonnes. Afin de vérifier cette hypothèse, l'activité locomotrice spontanée a été mesurée chez les mutants Aprt et n'a pas révélé de différence avec les contrôles durant la journée. Au contraire, l'absence d'Aprt semble même induire une hyperactivité nocturne, suggérant un temps de sommeil plus court. En effet, nous

avons pu montrer que ces drosophiles dorment significativement moins, de jour comme de nuit et de manière plus fragmentée, et ont une vitesse de déplacement réduite. Ainsi, un manque d'énergie résultant d'un défaut de sommeil aurait pu expliquer la diminution des performances locomotrices dans le test de SING mais nous n'avons pas observé d'effet sur les niveaux d'ATP des mutants Aprt.

Une hypothèse pouvant expliquer ce défaut de sommeil implique de nouveau la DA. Comme décrit dans l'introduction (D.4.3), une augmentation de la signalisation DAergique est liée à une hyperactivité nocturne (Kume *et al.*, 2005 ; Seugnet *et al.*, 2009a). De plus, l'implication du récepteur dDA1 dans les états de veille/sommeil a fait l'objet de plusieurs études (Andretic *et al.*, 2008 ; Lebestky *et al.*, 2009). Notamment, un mutant pour ce récepteur présente une augmentation du temps de sommeil, diurne et nocturne (Lebestky *et al.*, 2009). Nous pouvons donc imaginer qu'une augmentation de dDA1, comme nous avons pu l'observer chez les mutants Aprt, serait à l'origine d'une diminution du temps de sommeil. Une étude corrobore cette idée : des drosophiles privées de sommeil présentent une augmentation de l'expression des récepteurs dDA1 et DAMB (Seugnet *et al.*, 2009b). Il reste cependant à déterminer si dans notre cas, c'est bien l'augmentation de dDA1 qui induit un défaut de sommeil, et non l'inverse comme le suggère plutôt cette dernière étude. Pour cela, nous pourrions inactiver dDA1 en contexte mutant pour l'Aprt et voir si cela sauve ce phénotype.

D'autre part, l'inactivation ciblée de l'Aprt par ARNi a permis de mettre en évidence que l'Aprt est requise dans les neurones pour la régulation du cycle veille/sommeil. Les nDA n'ont pas été testés spécifiquement par manque de temps, mais il est probable qu'ils soient impliqués, en regard des études démontrant leur implication dans la régulation des états de veille/sommeil (Birman, 2005 ; Kume *et al.*, 2005 ; van Swinderen & Andretic, 2011 ; Kumar *et al.*, 2012). Notamment et comme pour le comportement locomoteur, une suractivation des neurones du PAM pourrait être liée aux effets observés, car il a été montré par exemple que la caféine promeut l'éveil chez la drosophile en augmentant leur activité (Nall *et al.*, 2016).

La caféine est un antagoniste des récepteurs de l'adénosine. Si une déficience en Aprt perturbe bien la signalisation adénosinergique comme nos résultats le suggèrent, il est possible qu'une diminution de signalisation du récepteur AdoR dans les nDA induise une augmentation de l'éveil chez la drosophile. Ainsi, une étude chez l'Homme propose qu'une diminution de signalisation du récepteur A₁ soit impliquée dans l'augmentation d'éveil et les perturbations du sommeil associées au syndrome des jambes sans repos (Ferré *et al.*, 2019). Chez les mammifères, un rôle de la signalisation adénosinergique dans la régulation des rythmes circadiens a été mis en évidence (Lindberg *et al.*, 2018). Plus précisément, des oscillations de l'adénosine mesurées sur 24h suggère que cette dernière agit en favorisant l'endormissement (Porkka-Heiskanen *et al.*, 1997). Remarquablement, les oscillations de l'adénosine sont comparables à celle de la DA (Lindberg *et al.*, 2018), et il a été montré dans le striatum de rats des variations circadiennes similaires de l'expression des récepteurs A_{2A} et D₂ (Weber *et al.*, 2004). Ces études suggèrent un rôle important de ces deux neurotransmetteurs dans la régulation des états de veille/sommeil. Cependant chez la drosophile, une étude révèle que le temps de sommeil des drosophiles n'est pas impacté par une absence du récepteur AdoR (Wu *et al.*, 2009). Il est donc plus probable dans notre cas que la diminution du temps de sommeil soit liée aux perturbations DAergiques plutôt qu'adénosinergiques.

Les patients LN présentent également des problèmes de sommeil fréquents, principalement caractérisés par de l'insomnie ou des réveils fréquents (Madeo *et al.*, 2019). En conclusion, il semble qu'une absence d'Aprt chez la drosophile perturbe le sommeil comme le fait un déficit en HGPRT chez l'Homme.

3.5 Rôle de l'Aprt et des purines dans la régulation du comportement épileptique

Une récente étude sur une cohorte de patients français et italiens de la MLN révèlent que 13,3% des enfants présentent des troubles épileptiques (Jinnah *et al.*, 2006 ; Madeo *et al.*, 2019). Le comportement épileptique peut être étudié chez les

drosophiles grâce à un test comportemental de sensibilité aux chocs (*bang-sensitivity test* ou bang-sensibilité) (Song & Tanouye, 2008 ; Parker *et al.*, 2011a, 2011b). Nous avons ici observé que les mutants *Aprt* présente un phénotype convulsif spectaculaire à partir de 30 jours après éclosion. De plus, 3 jours d'inactivation ciblée de l'*Aprt* à l'âge adulte ne permettent pas d'observer ce phénotype. Il est possible que l'inactivation doive être prolongée, ou que ce phénotype soit associé à un problème développemental. L'absence d'*Aprt* durant le développement pourrait affecter d'une certaine façon un ou plusieurs mécanismes sous-jacents impliqué dans le comportement épileptique, ce qui aurait ensuite des répercussions au cours du vieillissement. Des travaux antérieurs ont montré que ce comportement de bang-sensibilité est fortement lié à la fonction neuronale (Parker *et al.*, 2011b ; Kroll & Tanouye 2013 ; Kroll *et al.*, 2015 ; Saras *et al.*, 2016). Le fait que nous n'ayons pas pu reproduire ce phénotype de sensibilité aux chocs en inactivant l'*Aprt* sélectivement dans les neurones, les cellules gliales ou les muscles, suggère qu'un composant essentiel manque en absence d'activité *Aprt*, qui serait diffusible et pourrait être fourni aux neurones par d'autres cellules via l'espace extracellulaire ou l'hémolymphe.

Le rôle primaire de l'*Aprt* étant de recycler l'adénine en AMP, nous avons supposé que les mutants *Aprt* pourraient avoir un défaut en nucléotides affectant le développement des circuits neuronaux, ce qui serait à l'origine du comportement épileptique. Ainsi, nous avons mis en évidence que l'adénosine, mais seulement lorsqu'elle est ingérée durant tout le développement larvaire, est capable de sauver complètement le comportement convulsif observé chez les mutants *Aprt*. Ceci suggère que l'absence d'*Aprt* induit un manque d'adénosine dans le système nerveux durant le développement, qui aurait un impact profond sur la formation ou la fonction des circuits neuronaux contrôlant le comportement épileptique chez les drosophiles adultes.

L'adénosine est un puissant neuromodulateur ayant une action inhibitrice sur l'activité électrique du SNC et son implication en tant qu'anticonvulsant est établie dans le

cerveau humain (Boison, 2005 ; Masino *et al.*, 2014 ; Weltha *et al.*, 2019). En effet, des déficits en adénosine peuvent contribuer à l'épileptogenèse, comme cela a été montré lors d'une surexpression de l'ADK, une enzyme régulant les taux d'adénosine par sa conversion en AMP (Boison, 2005 ; Weltha *et al.*, 2019). Le contrôle de l'épilepsie par l'adénosine constitue donc une approche thérapeutique rationnelle, ce qui peut expliquer que nous ayons pu sauver le phénotype de bang-sensibilité des mutants Aprt par son administration. En outre, ceci suggère que la signalisation adénosinergique dans le cerveau des drosophiles a des fonctions similaires à celle des mammifères. Nous avons de surcroît effectivement pu mettre en évidence une diminution des taux d'adénosine dans les mutants Aprt, qui pourrait provenir d'une augmentation de l'activité ADK, suractivée pour compenser l'absence de production d'AMP par l'Aprt. Un dosage enzymatique de l'ADK par transformation d'adénosine-C¹⁴ serait envisageable pour vérifier cette hypothèse.

D'après la littérature, des perturbations métaboliques, comme des anomalies de transport de protéines mitochondriales, sont impliqués dans la susceptibilité épileptique chez la drosophile (Fergestad *et al.*, 2006). En effet, des mutants du gène *stress-sensitive* (*sesB*), qui encode une translocase des nucléotides à adénine, sont fortement affectés par ce test et présentent une réduction des niveaux d'ATP (Zhang *et al.*, 1999 ; Fergestad *et al.*, 2006). Nous avons seulement dosé l'ATP chez des drosophiles de 8 jours ; il serait intéressant de regarder les taux d'ATP chez des drosophiles plus âgées. En effet, il est possible qu'un déficit chronique en adénosine induise un défaut d'ATP chez les drosophiles âgées, qui serait alors impliqué dans le comportement épileptique observé.

Le caractère épileptique des mutants Aprt a également pu être sauvé par ingestion d'un analogue de l'adénosine, la N6-méthyladénosine (m⁶A). Nous avons testé ce composé car un criblage de molécules de la chimiothèque Prestwick sur des fibroblastes de patients a permis de le mettre en évidence (article non publié). En effet, le test biochimique développé montre que la m⁶A permet la survie de

fibroblastes déficients en HGPRT dans des conditions où la synthèse *de novo* des purines est inhibée, conditions dans lesquelles ils meurent normalement. L'adénosine est méthylée en position N⁶ pour former la m⁶A dans les molécules d'ARN par un complexe de méthyltransférases. Une fois libérée lors du renouvellement ou de la dégradation de l'ARN, la m⁶A ne peut pas être réintégrée dans les acides nucléiques et est donc excrétée dans l'urine (Schram 1998). Le sauvetage que nous avons observé avec la m⁶A sur le phénotype de bang-sensibilité indique donc que ce composé et l'adénosine agiraient comme agonistes des récepteurs de l'adénosine ou régulateurs allostériques d'autres protéines, plutôt que comme précurseurs nucléotidiques, afin d'empêcher la perturbation du système nerveux induite par l'absence d'Aprt.

Il est également intéressant de noter que d'autres mutants sensibles à ce test présentent une durée de vie raccourcie et une diminution des performances locomotrices (Reynolds, 2018). Ceci n'étant toutefois pas systématique pour tous les mutants sensibles à un choc, l'auteur suggère que les défauts liés à l'âge et la bang-sensibilité sont des phénotypes découplés et proviennent de différents mécanismes. Le fait que nous ayons pu sauver la bang-sensibilité des mutants Aprt, mais pas le déficit locomoteur, par l'ajout d'adénosine ou de m⁶A dans le milieu nutritif, est en accord avec cette idée.

Pour conclure sur cette partie, l'ensemble de nos résultats montrent qu'une absence d'Aprt chez la drosophile entraîne des conséquences similaires à un déficit en HGPRT chez l'Homme, telles qu'une diminution de la longévité, une augmentation des niveaux d'acide urique, une altération des capacités locomotrices et du sommeil, et un comportement épileptique.

4. L'expression neuronale d'une forme pathogène de l'HGPRT humaine entraîne des déficits moteurs et dopaminergiques

Jusqu'à maintenant, les modèles cellulaires et murins de la MLN ont tous été créés dans le but d'étudier les conséquences d'une perte de fonction de l'HGPRT (Kuehn *et al.*, 1987 ; Jinnah *et al.*, 1993 ; Smith & Friedmann, 2000 ; Ceballos-Picot *et al.*, 2009 ; Guibinga *et al.*, 2012 ; Meek *et al.*, 2016). Par contre, l'expression transgénique des formes pathogènes humaines n'a jamais été évaluée dans ces modèles. Étant donné la forte variabilité phénotypique existant dans la MLN (Jinnah *et al.*, 2010 ; Sampat *et al.*, 2011 ; Ceballos-Picot *et al.*, 2013), il n'est pas exclu que certaines mutations de l'HGPRT aient des effets toxiques intrinsèques associés à des fonctions jusqu'alors non décrites de la protéine.

En accord avec cette hypothèse, nous avons pu observer que l'expression neuronale de la forme pathogène I42T du gène *HPRT* humain chez la drosophile entraîne un déclin locomoteur précoce, un comportement convulsif et une diminution des taux de DA cérébraux, alors que l'expression de la forme non mutante du gène n'a pas de tels effets. Ces résultats mettent en relief une neurotoxicité de la protéine HGPRT mutée, qui serait liée à un mécanisme toxique dominant plutôt qu'à un défaut de fonction enzymatique. Cette toxicité pourrait provenir d'une fonction non connue de l'HGPRT ou acquise *de novo* par la forme mutante, ou être liée à des perturbations secondaires du métabolisme des purines ou d'autres voies de signalisation. De plus, l'expression restreinte aux neurones suffit à engendrer des effets délétères, mettant en évidence l'importance du rôle neuronal de l'HGPRT. Les conséquences sur le système DAergique suggèrent à nouveau l'existence d'un lien physiologique entre la voie de recyclage des purines et l'intégrité fonctionnelle du système DAergique chez la drosophile, comme cela est observé chez l'Homme. De plus, la diminution de DA dans le SNC des drosophiles exprimant l'HPRT-I42T pourrait être à l'origine du déficit locomoteur détecté.

Chez l'Homme, des mutations de gènes peuvent conférer de nouvelles propriétés à la protéine traduite, qui peut être tronquée ou malformée et ainsi nocive pour la cellule. C'est le cas par exemple de l' α -synucléine dans la MP (Bridi & Hirth, 2018) ou du facteur de transcription p53, fréquemment muté dans les cancers et formant des agrégats au comportement de type prion (de Oliveira *et al.*, 2015). Nous pouvons supposer que l'HGPRT-I42T n'est pas dégradée de façon appropriée et s'accumule alors dans les neurones de la drosophile, formant des agrégats qui peuvent générer du stress oxydatif, toxique pour les cellules. Les nDA, connus pour être particulièrement vulnérables au stress oxydatif, seraient alors directement touchés (Guo *et al.*, 2018).

Ainsi, l'HGPRT mutée pourrait avoir des effets neurotoxiques propres et se comporter peut-être comme un prion. Chez l'Homme, la toxicité neuronale résulterait d'un double processus : une perte de fonction liée à l'absence d'activité de la protéine et un gain de fonction toxique des formes défectueuses. Ceci contribuerait à interpréter la variabilité phénotypique caractéristique de la MLN : certaines conformations de protéines ont une propension plus grande à former des agrégats, comme cela a été décrit pour une autre protéine ubiquitaire humaine, hnRNPA2B1 (Paul *et al.*, 2017). De plus, cette hypothèse pourrait permettre d'expliquer l'absence de troubles neurocomportementaux chez les modèles murins. En effet, seules les conséquences d'un *knock-out* ou d'une inactivation de la protéine endogène, dont les propriétés d'agrégation pourraient différer de l'humaine, ont été étudiées jusqu'à présent dans ces modèles.

5. Le recyclage des purines chez la drosophile

L'absence du gène *HPRT* chez la drosophile et plus largement chez les insectes et les arthropodes reste très surprenante. Pourquoi ce gène, primordial chez l'Homme et présent aussi bien chez les bactéries (Levine & Taylor, 1982), les levures (Pinson *et al.*, 2019) et les nématodes (Marsac *et al.*, 2019), aurait ainsi disparu chez les arthropodes, sans conséquences néfastes, alors qu'il a été conservé chez les vertébrés ? Des

mécanismes compensatoires à l'absence d'HGPRT doivent certainement exister chez la drosophile, et les comprendre pourrait s'avérer d'une aide précieuse dans le traitement de la MLN.

Notamment, une question reste en suspens : l'hypoxanthine et la guanine sont-elles toujours directement catabolisées chez la drosophile, où peuvent-elles être recyclées en nucléotides par d'autres voies métaboliques ? Une des premières études sur ce sujet a montré que chez la mouche domestique, il n'y a pas d'incorporation significative d'hypoxanthine ou de guanine radiomarqués dans les acides nucléiques, alors que l'adénine- C^{14} est incorporée rapidement dans l'ADN de l'ovaire (Miller & Collins, 1973). Ceci indique que le défaut en HGPRT n'est pas compensé par une autre voie enzymatique et suggère que l'adénine est la seule base purique qui peut être efficacement recyclée chez ces mouches.

Chez l'Homme, les enzymes PNP étant réversibles, l'hypoxanthine et la guanine peuvent *a priori* être converties en inosine et guanosine, respectivement, mais pas en leurs formes monophosphates respectives (Friedmann *et al.*, 1969), comme cela est possible entre l'adénosine et l'AMP grâce à l'ADK. Cependant, deux enzymes en sont capables chez la bactérie *E.coli*, l'inosine kinase (IK) et la guanosine kinase (GK) (Kawasaki *et al.*, 2000). On pourrait donc supposer que de telles enzymes soient présentes chez la drosophile et puissent ainsi permettre un recyclage de l'hypoxanthine et de la guanine en IMP et en GMP, respectivement. De plus, une étude a montré que de telles conversions sont possibles chez des larves de drosophile ayant ingérées de l'inosine- C^{14} ou de la guanosine- C^{14} (Johnson *et al.*, 1980ab). Toutefois, nous avons tenté de reproduire cette expérience sur des extraits de drosophiles adultes sauvages en quantifiant par HPLC l'IMP et la GMP potentiellement transformés après ajout d'inosine ou de guanosine, sans succès (données ne figurant pas dans ce manuscrit). De plus, les études de J-L Becker sur des cultures de cellules de drosophile vont à l'encontre d'une telle théorie (Becker, 1974b) : aucune conversion de bases puriques en leur nucléosides par les PNP n'a pu être mise en évidence dans ses

Discussion

expériences, suggérant que ces enzymes ne fonctionnent que dans le sens catabolique chez la drosophile, et aucune activité guanosine kinase n'a été détectée, contrairement aux travaux de Johnson et ses collaborateurs.

Aussi, dans notre étude en absence d'une Aprt fonctionnelle, la question s'est posée d'un possible recyclage direct de l'adénine en adénosine par les PNP, comme cela est le cas chez la bactérie *E.coli*, contrairement à l'Homme (Levine & Taylor, 1982 ; Bzowska *et al.*, 1990). Nous avons regardé si une telle activité était possible chez la drosophile, mais aucune conversion d'adénine-C¹⁴ en adénosine n'a pu être détectée (données non présentées).

Ayant été très peu étudié depuis les années 80, ces informations nous ont permis d'avoir un schéma plus complet et plus sûr du métabolisme des purines chez la drosophile. Nous en concluons que l'absence d'HGPRT n'est pas compensée par une autre voie enzymatique, et que l'hypoxanthine et la guanine sont donc préférentiellement directement excrétées sous forme d'acide urique. Enfin, le fait que des mutants homozygotes pour des enzymes de la synthèse *de novo* des purines soient létaux développementaux (Holland *et al.*, 2011), contrairement aux mutants Aprt qui atteignent l'âge adulte, suggère que la drosophile, comme les mammifères non humains, dépend plus pour sa survie de cette première voie que du recyclage des purines. Nos résultats montrent que l'absence de cette deuxième voie est néanmoins lourde de conséquences, en particulier pour le fonctionnement du système nerveux.

Conclusions générales

Les résultats expérimentaux de cette étude nous ont conduit à mettre en évidence des interactions physiologiques réciproques entre les systèmes purinergiques et DAergiques chez la drosophile. De plus, ils confirment l'hypothèse qu'une absence d'Aprt chez cet organisme a des conséquences en partie similaires, sur le plan métabolique et comportemental, à un déficit en HGPRT chez l'Homme. Outre leur intérêt pour mieux comprendre le rôle du recyclage des purines dans l'expression et le fonctionnement du système DAergique, les drosophiles déficientes en Aprt semblent donc constituer un nouveau modèle permettant d'étudier par des approches génétiques et pharmacologiques les mécanismes pathogéniques de la MLN. Ainsi, nos travaux suggèrent que la piste adénosinergique pourrait être une nouvelle stratégie à explorer dans le traitement de cette maladie.

Bien que la MLN soit un syndrome rare, la compréhension du rôle de la voie de sauvetage des purines dans le système DAergique, et plus généralement dans le fonctionnement cérébral, pourrait avoir des retombées dans le domaine d'autres maladies neurologiques plus fréquentes, et en particulier la MP. Les modèles d'expression transgénique de l'HPRT humaine chez la drosophile que nous avons développés pourraient aussi avoir d'autres applications translationnelles en rapport avec le rôle de l'HGPRT dans la survie de cellules cancéreuses et des parasites (Keough *et al.*, 2018 ; Doleželová *et al.*, 2018 ; Townsend *et al.*, 2018ab). De récentes études cristallographiques sur l'Aprt ont permis de mieux comprendre la spécificité de substrat de l'adénine et de l'hypoxanthine pour leurs phosphoribosyltransférases respectives (Huyet *et al.*, 2018 ; Ozeir *et al.*, 2019). Nos modèles perte et gain de fonction pourraient s'avérer utiles pour tester rapidement les propriétés de nouveaux composés substrats ou régulateurs de ces enzymes synthétisés sur la base de ces études structurales.

Conclusion

Une possible contribution de la surexpression de l'APRT dans le déficit DAergique observé dans la MLN, et l'identification d'une potentielle toxicité inhérente aux formes défectueuses de l'HGPRT sur le SNC sont des éléments nouveaux apportés par nos travaux qui mériteraient d'être approfondis. Ces nouvelles hypothèses ouvrent un champ de perspective intéressant pour progresser dans la compréhension de la pathogenèse de la MLN et plus précisément dans la fonction endogène de l'HGPRT et de ses formes mutées. En raison de la très forte variabilité phénotypique, il peut être compliqué d'obtenir un modèle commun, valable pour tous les patients LN. L'expression transgénique chez la drosophile pourrait être un moyen d'étudier l'implication de chaque mutation dans les troubles métaboliques et neurocomportementaux, et être ainsi spécifique à chaque malade. Un axe envisageable pour tirer le meilleur parti des modèles que nous avons introduits serait d'effectuer des criblages à haut débit de banques de molécules afin d'identifier des composés potentiellement thérapeutiques, ou de valider des cibles déjà identifiées sur des cellules dérivées de patients (Augé *et al.*, 2016). Une analyse métabolomique poussée sur ces modèles pourrait aussi avoir un impact significatif sur la compréhension des dérégulations induites par un défaut de recyclage des purines dans le cerveau humain.

Chapitre V. Références bibliographiques

- Abbracchio, M.P., and Burnstock, G. (1994). Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol. Ther.* **64**, 445–475.
- Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Verkhratsky, A., and Zimmermann, H. (2009). Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci.* **32**, 19–29.
- Abel, T.J., Dalm, B.D., Grossbach, A.J., Jackson, A.W., Thomsen, T., and Greenlee, J.D.W. (2014). Lateralized effect of pallidal stimulation on self-mutilation in Lesch-Nyhan disease. *J. Neurosurg. Pediatr.* **14**, 594–597.
- Abi-Dargham, A., Rodenhiser, J., Printz, D., Zea-Ponce, Y., Gil, R., Kegeles, L.S., Weiss, R., Cooper, T.B., Mann, J.J., Van Heertum, R.L., et al. (2000). Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 8104–8109.
- Adams, M.D. (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185–2195.
- Adams, A., and Harkness, R.A. (1976). Developmental changes in purine phosphoribosyltransferases in human and rat tissues. *Biochem. J.* **160**, 565–576.
- Agrawal, T., and Hasan, G. (2015). Maturation of a central brain flight circuit in *Drosophila* requires Fz2/Ca²⁺ signaling. *Elife* **4**.
- Alavian, K.N., Scholz, C., and Simon, H.H. (2008). Transcriptional regulation of mesencephalic dopaminergic neurons: the full circle of life and death. *Mov. Disord.* **23**, 319–328.
- Alekseyenko, O.V., Chan, Y.-B., Li, R., and Kravitz, E.A. (2013). Single dopaminergic neurons that modulate aggression in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 6151–6156.
- Allen, S.M., and Rice, S.N. (1996). Risperidone antagonism of self-mutilation in a Lesch-Nyhan patient. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **20**, 793–800.
- Alvarez-Lario, B., and Macarron-Vicente, J. (2010). Uric acid and evolution. *Rheumatology* **49**, 2010–2015.
- Anderson, L.T., Ernst, M., and Davis, S.V. (1992). Cognitive abilities of patients with Lesch-Nyhan disease. *J. Autism Dev. Disord.* **22**, 189–203.
- Andretic, R., van Swinderen, B., and Greenspan, R.J. (2005). Dopaminergic modulation of arousal in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **15**, 1165–1175.
- Andretic, R., Kim, Y.-C., Jones, F.S., Han, K.-A., and Greenspan, R.J. (2008). *Drosophila* D1 dopamine receptor mediates caffeine-induced arousal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 20392–20397.

Références bibliographiques

- Angeles, D.C., Ho, P., Dymock, B.W., Lim, K.-L., Zhou, Z.-D., and Tan, E.-K. (2016). Antioxidants inhibit neuronal toxicity in Parkinson's disease-linked LRRK2. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 3, 288–294.
- Ankem, M., Glazier, D.B., and Barone, J.G. (2000). Lesch-Nyhan syndrome presenting as acute renal failure secondary to obstructive uropathy. *Urology* 56, 1056.
- Anlauf, M., Schäfer, M.K.-H., Eiden, L., and Weihe, E. (2003). Chemical coding of the human gastrointestinal nervous system: cholinergic, VIPergic, and catecholaminergic phenotypes. *J. Comp. Neurol.* 459, 90–111.
- Aral, B., de Saint Basile, G., Al-Garawi, S., Kamoun, P., and Ceballos-Picot, I. (1996). Novel nonsense mutation in the hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase gene and nonrandom X-inactivation causing Lesch-Nyhan syndrome in a female patient. *Hum. Mutat.* 7, 52–58.
- Ashok, A.H., Marques, T.R., Jauhar, S., Nour, M.M., Goodwin, G.M., Young, A.H., and Howes, O.D. (2017). The dopamine hypothesis of bipolar affective disorder: the state of the art and implications for treatment. *Mol. Psychiatry* 22, 666–679.
- Aso, Y., Siwanowicz, I., Bräcker, L., Ito, K., Kitamoto, T., and Tanimoto, H. (2010). Specific dopaminergic neurons for the formation of labile aversive memory. *Curr. Biol.* 20, 1445–1451.
- Augé, F., Petitgas, C., Burgevin, M.-C., Mockel, L., Olivier-Bandini, A., Gibert, J.-F., Chesney, F., Curet, O., Daignan-fornier, B., Pinson, B., et al. (2016). Recherche d'une thérapie de la maladie de Lesch-Nyhan : identification de molécules « HPRT-like » issue d'un criblage virtuel et à haut débit. *Archives de pédiatrie* 23, 1080–1081.
- Ayano, G. (2016). Dopamine: receptors, functions, synthesis, pathways, locations and mental disorders: review of literatures. *J. Ment. Disord. Treat.* 2.
- Azevedo, F.A.C., Carvalho, L.R.B., Grinberg, L.T., Farfel, J.M., Ferretti, R.E.L., Leite, R.E.P., Filho, W.J., Lent, R., and Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J. Comp. Neurol.* 513, 532–541.
- Baier, A., Wittek, B., and Brembs, B. (2002). *Drosophila* as a new model organism for the neurobiology of aggression? *J. Exp. Biol.* 205, 1233–1240.
- Baik, J.-H. (2013). Dopamine signaling in reward-related behaviors. *Front. Neural Circuits* 7, 152.
- Bainton, R.J., Tsai, L.T.-Y., Singh, C.M., Moore, M.S., Neckameyer, W.S., and Heberlein, U. (2000). Dopamine modulates acute responses to cocaine, nicotine and ethanol in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 10, 187–194.

- Balasubramaniam, S., Duley, J.A., and Christodoulou, J. (2014). Inborn errors of purine metabolism: clinical update and therapies. *J. Inherit. Metab. Dis.* 37, 669–686.
- Balint, B., Mencacci, N.E., Valente, E.M., Pisani, A., Rothwell, J., Jankovic, J., Vidailhet, M., and Bhatia, K.P. (2018). Dystonia. *Nat. Rev. Dis. Primers* 4, 25.
- Barbeau, A. (1962). The pathogenesis of Parkinson's disease: a new hypothesis. *Can. Med. Assoc. J.* 87, 802–807.
- Bassett, A.R., Tibbit, C., Ponting, C.P., and Liu, J.-L. (2013). Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. *Cell. Rep.* 4, 220–228.
- Beal, M.F. (1995). Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann. Neurol.* 38, 357–366.
- Beaulieu, J.-M., and Gainetdinov, R.R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol. Rev.* 63, 182–217.
- Becker, J.-L. (1974a). Purine metabolism pathways in *Drosophila* cells growth “*in vitro*”: phosphoribosyl transferase activities. *Biochimie* 56, 779–781.
- Becker, J.-L. (1974b). Métabolisme des purines dans des cellules de *Drosophila melanogaster* en culture *in vitro* : interconversion des purines. *Biochimie* 56, 1249–1253.
- Becker, J.-L. (1978). Regulation of purine biosynthesis in cultured *Drosophila melanogaster* cells: I. Conditional activity of hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransferase and 5-nucleotidase. *Biochimie* 60, 619–625.
- Becker, J.-L. (1980). Regulation of purine biosynthesis in cultured *Drosophila melanogaster* cells: II. Relationships between hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl transferase and 5'-nucleotidase. *Biochimie* 62, 665–670.
- Bell, S., Kolobova, I., Crapper, L., and Ernst, C. (2016). Lesch-Nyhan syndrome: models, theories, and therapies. *Mol. Syndromol.* 7, 302–311.
- Bellen, H.J., Tong, C., and Tsuda, H. (2010). 100 years of *Drosophila* research and its impact on vertebrate neuroscience: a history lesson for the future. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 514.
- Benke, P.J., Herrick, N., Smitten, L., Aradine, C., Laessig, R., and Wolcott, G.J. (1973). Adenine and folic acid in the Lesch-Nyhan syndrome. *Pediatr. Res.* 7, 729–738.
- Bertelli, M., Cecchin, S., Lapucci, C., Jacomelli, G., Jinnah, H.A., Pandolfo, M., and Micheli, V. (2006). Study of the adenosinergic system in the brain of HPRT knockout mouse (Lesch-Nyhan disease). *Clin. Chim. Acta* 373, 104–107.

Références bibliographiques

Beumer, K.J., and Carroll, D. (2014). Targeted genome engineering techniques in *Drosophila*. *Methods* 68, 29–37.

Bhagavan, N.V., and Ha, C.-E. (2015). Nucleotide metabolism. In *Essentials of Medical Biochemistry*, (Elsevier), pp. 465–487.

Bibikova, M., Golic, M., Golic, K.G., and Carroll, D. (2002). Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics* 161, 1169–1175.

Birman, S. (2000). La drosophile, un modèle génétique pour l'étude des maladies neurodégénératives. *Médecine Sciences* 16, 164.

Birman, S. (2005). Arousal mechanisms: speedy flies don't sleep at night. *Curr. Biol.* 15, R511–R513.

Birman, S., Morgan, B., Anzivino, M., and Hirsh, J. (1994). A novel and major isoform of tyrosine hydroxylase in *Drosophila* is generated by alternative RNA processing. *J. Biol. Chem.* 269, 26559–26567.

Birnbaumer, L. (1990). G proteins in signal transduction. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30, 675–705.

Bischof, J., Maeda, R.K., Hediger, M., Karch, F., and Basler, K. (2007). An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 3312–3317.

Bissonette, G.B., and Roesch, M.R. (2016). Development and function of the midbrain dopamine system: what we know and what we need to. *Genes Brain Behav.* 15, 62–73.

Bitler, C.M., and Howard, B.D. (1986). Dopamine metabolism in hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase-deficient variants of PC12 cells. *J. Neurochem.* 47, 107–112.

Björklund, A., and Dunnett, S.B. (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci.* 30, 194–202.

Blum, D., Gall, D., Galas, M.-C., d'Alcantara, P., Bantubungi, K., and Schiffmann, S.N. (2002). The adenosine A1 receptor agonist adenosine amine congener exerts a neuroprotective effect against the development of striatal lesions and motor impairments in the 3-nitropropionic acid model of neurotoxicity. *J. Neurosci.* 22, 9122–9133.

Blum, D., Hourez, R., Galas, M.-C., Popoli, P., and Schiffmann, S.N. (2003). Adenosine receptors and Huntington's disease: implications for pathogenesis and therapeutics. *Lancet Neurol.* 2, 366–374.

- Blum, D., Chern, Y., Domenici, M.R., Buée, L., Lin, C.-Y., Rea, W., Ferré, S., and Popoli, P. (2018). The role of adenosine tone and adenosine receptors in Huntington's disease. *J. Caffeine Adenosine Res.* *8*, 43–58.
- Boer, P., Brosh, S., Wasserman, L., Hammel, I., Zoref-Shani, E., and Sperling, O. (2001). Decelerated rate of dendrite outgrowth from dopaminergic neurons in primary cultures from brains of hypoxanthine phosphoribosyltransferase-deficient knockout mice. *Neurosci. Lett.* *303*, 45–48.
- Boison, D. (2005). Adenosine and epilepsy: from therapeutic rationale to new therapeutic strategies. *Neuroscientist* *11*, 25–36.
- Bollée, G., Dollinger, C., Boutaud, L., Guillemot, D., Bensman, A., Harambat, J., Deteix, P., Daudon, M., Knebelmann, B., and Ceballos-Picot, I. (2010). Phenotype and genotype characterization of adenine phosphoribosyltransferase deficiency. *J. Am. Soc. Nephrol.* *21*, 679–688.
- Bollée, G., Harambat, J., Bensman, A., Knebelmann, B., Daudon, M., and Ceballos-Picot, I. (2012). Adenine phosphoribosyltransferase deficiency. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* *7*, 1521–1527.
- Borroto-Escuela, D.O., and Fuxe, K. (2019). Adenosine heteroreceptor complexes in the basal ganglia are implicated in Parkinson's disease and its treatment. *J. Neural Transm.* *126*, 455–471.
- Borroto-Escuela, D.O., Wydra, K., Pintsuk, J., Narvaez, M., Corrales, F., Zaniewska, M., Agnati, L.F., Franco, R., Tanganelli, S., Ferraro, L., et al. (2016). Understanding the functional plasticity in neural networks of the basal ganglia in cocaine use disorder: a role for allosteric receptor-receptor interactions in A2A-D2 heteroreceptor complexes. *Neural Plast.* *2016*, 4827268.
- Boswell-Casteel, R.C., and Hays, F.A. (2017). Equilibrative nucleoside transporters-A review. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* *36*, 7–30.
- Bou Dib, P., Gnägi, B., Daly, F., Sabado, V., Tas, D., Glauser, D.A., Meister, P., and Nagoshi, E. (2014). A conserved role for p48 homologs in protecting dopaminergic neurons from oxidative stress. *PLoS Genet.* *10*, e1004718.
- Bouwens-Rombouts, A.G.M., van den Boogaard, M.-J.H., Puig, J.G., Mateos, F.A., Hennekam, R.C.M., and Tilanus, M.G.J. (1993). Identification of two new nucleotide mutations (HPRTUtrecht and HPRTMadrid) in exon 3 of the human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) gene. *Hum. Genet.* *91*, 451–454.
- Boyle, J.A., Raivio, K.O., Astrin, K.H., Schulman, J.D., Graf, M.L., Seegmiller, J.E., and Jacobsen, C.B. (1970). Lesch-Nyhan syndrome: preventive control by prenatal diagnosis. *Science* *169*, 688–689.

Références bibliographiques

- Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401–415.
- Bratty, M.A., Hobani, Y., Dow, J.A.T., and Watson, D.G. (2011). Metabolomic profiling of the effects of allopurinol on *Drosophila melanogaster*. *Metabolomics* 7, 542–548.
- Breakefield, X., Castiglione, C., and Edelstein, S. (1976). Monoamine oxidase activity decreased in cells lacking hypoxanthine phosphoribosyltransferase activity. *Science* 192, 1018–1020.
- Breese, G.R., and Traylor, T.D. (1972). Developmental characteristics of brain catecholamines and tyrosine hydroxylase in the rat: effects of 6-hydroxydopamine. *Br. J. Pharmacol.* 44, 210–222.
- Breese, G.R., Baumeister, A.A., McCown, T.J., Emerick, S.G., Frye, G.D., Crotty, K., and Mueller, R.A. (1984). Behavioral differences between neonatal and adult 6-hydroxydopamine-treated rats to dopamine agonists: relevance to neurological symptoms in clinical syndromes with reduced brain dopamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 231, 343–354.
- Breese, G.R., Criswell, H.E., Duncan, G.E., and Mueller, R.A. (1990). A dopamine deficiency model of Lesch-Nyhan disease—the neonatal-6-OHDA-lesioned rat. *Brain Res. Bull.* 25, 477–484.
- Breese, G.R., Knapp, D.J., Criswell, H.E., Moy, S.S., Papadeas, S.T., and Blake, B.L. (2005). The neonate-6-hydroxydopamine-lesioned rat: a model for clinical neuroscience and neurobiological principles. *Brain Res. Rev.* 48, 57–73.
- Bridi, J.C., and Hirth, F. (2018). Mechanisms of α -synuclein induced synaptopathy in Parkinson's disease. *Front. Neurosci.* 12, 80.
- Brody, T., and Cravchik, A. (2000). *Drosophila melanogaster* G Protein–Coupled Receptors. *J. Cell. Biol.* 150, F83–F88.
- Buchon, N., Silverman, N., and Cherry, S. (2014). Immunity in *Drosophila melanogaster* — from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 796–810.
- Burke, C.J., Huetteroth, W., Oswald, D., Perisse, E., Krashes, M.J., Das, G., Gohl, D., Silies, M., Certel, S., and Waddell, S. (2012). Layered reward signalling through octopamine and dopamine in *Drosophila*. *Nature* 492, 433–437.
- Burnstock, G. (1976). Purinergic receptors. *J. Ther. Biol.* 62, 491–503.
- Burnstock, G. (2013). Introduction to purinergic signalling in the brain. In *Glioma Signaling*, J. Barańska, ed. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 1–12.

- Bzowska, A., Kulikowska, E., and Shugar, D. (1990). Properties of purine nucleoside phosphorylase (PNP) of mammalian and bacterial origin. *Z. Naturforsch. C.* *45*, 59–70.
- Camici, M., Micheli, V., Ipata, P.L., and Tozzi, M.G. (2010). Pediatric neurological syndromes and inborn errors of purine metabolism. *Neurochem. Int.* *56*, 367–378.
- Cantu-Medellin, N., and Kelley, E.E. (2013). Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: a process in critical need of reevaluation. *Redox. Biol.* *1*, 353–358.
- Carlsson, A. (2002). Treatment of Parkinson's with L-DOPA. The early discovery phase, and a comment on current problems. *J. Neural Transm.* *109*, 777–787.
- Carmo, M., Gonçalves, F.Q., Canas, P.M., Oses, J., Fernandes, F.D., Duarte, F.V., Palmeira, C.M., Tomé, A.R., Agostinho, P., Andrade, G.M., et al. (2019). Enhanced ATP release and CD73-mediated adenosine formation sustain adenosine A_{2A} receptor over-activation in a rat model of Parkinson's disease. *Br. J. Pharmacol.* *176*, 3666–3680.
- Cartier, P., and Hamet, M. (1968). Les activités purine-phosphoribosyl transférasiques des globules rouges humains. *Clin. Chim. Acta* *20*, 205–214.
- Casas-Brüge, M., Almenar, C., Grau, I.M., Jane, J., Herrera-Marschitz, M., and Ungerstedt, U. (1985). Dopaminergic receptor supersensitivity in self-mutilatory behaviour of Lesch-Nyhan disease. *Lancet* *1*, 991–992.
- Cassar, M., Issa, A.-R., Riemensperger, T., Petitgas, C., Rival, T., Coulom, H., Iche-Torres, M., Han, K.-A., and Birman, S. (2015). A dopamine receptor contributes to paraquat-induced neurotoxicity in *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.* *24*, 197–212.
- Castells, S., Chakrabarti, C., Winsberg, B.G., Hurwic, M., Perel, J.M., and Nyhan, W.L. (1979). Effects of L-5-hydroxytryptophan on monoamine and amino acids turnover in the Lesch-Nyhan syndrome. *J. Autism Dev. Disord.* *9*, 95–103.
- Ceballos-Picot, I., and Jinnah, H.A. (2016). Disorders of purine metabolism affecting adults. In *Inherited Metabolic Disease in Adults - A Clinical Guide*, (Carla E. M. Hollak and Robin Lachmann). Chapter 42, 251-263.
- Ceballos-Picot, I., Mockel, L., Potier, M.-C., Dauphinot, L., Shirley, T.L., Torero-Ibad, R., Fuchs, J., and Jinnah, H.A. (2009). Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase regulates early developmental programming of dopamine neurons: implications for Lesch-Nyhan disease pathogenesis. *Hum. Mol. Genet.* *18*, 2317–2327.
- Ceballos-Picot, I., Augé, F., Fu, R., Olivier-Bandini, A., Cahu, J., Chabrol, B., Aral, B., de Martinville, B., Lecain, J.-P., and Jinnah, H.A. (2013). Phenotypic variation among seven members of one family with deficiency of hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase. *Mol. Genet. Metab.* *110*, 268–274.

Références bibliographiques

- Ceballos-Picot, I., Le Dantec, A., Brassier, A., Jaïs, J.-P., Ledroit, M., Cahu, J., Ea, H.-K., Daignan-Fornier, B., and Pinson, B. (2015). New biomarkers for early diagnosis of Lesch-Nyhan disease revealed by metabolic analysis on a large cohort of patients. *Orphanet J. Rare Dis.* 10, 7.
- Ceballos-Picot, I., Saha, A., Arora, N., Kapoor, K., Kaur, M., Dhull, R.S., and Goyal, S. (2019). Adenine phosphoribosyltransferase deficiency due to novel mutation. *Kidney Int. Rep.* 4, 624–628.
- Cellai, L., Carvalho, K., Faivre, E., Deleau, A., Vieau, D., Buée, L., Blum, D., Mériaux, C., and Gomez-Murcia, V. (2018). The adenosinergic signaling: a complex but promising therapeutic target for Alzheimer's disease. *Front. Neurosci.* 12, 520.
- Chang, H.-Y., Grygoruk, A., Brooks, E.S., Ackerson, L.C., Maidment, N.T., Bainton, R.J., and Krantz, D.E. (2006). Overexpression of the *Drosophila* vesicular monoamine transporter increases motor activity and courtship but decreases the behavioral response to cocaine. *Mol. Psychiatry* 11, 99–113.
- Chaudhry, F.A., Edwards, R.H., and Fonnum, F. (2008). Vesicular neurotransmitter transporters as targets for endogenous and exogenous toxic substances. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48, 277–301.
- Chen, B.C., Balasubramaniam, S., McGown, I.N., O'Neill, J.P., Chng, G.S., Keng, W.T., Ngu, L.H., and Duley, J.A. (2014). Treatment of Lesch–Nyhan disease with S-adenosylmethionine: experience with five young Malaysians, including a girl. *Brain Dev.* 36, 593–600.
- Chen, X., Umeh, C.C., Tainsh, R.E., Feng, D.D., Maguire, M., Zuo, F., Rahimian, M., Logan, R., Wang, X., Ascherio, A., et al. (2018). Dissociation between urate and blood pressure in mice and in people with early Parkinson's disease. *EBioMedicine* 37, 259–268.
- Cheramy, A., Leviel, V., and Glowinski, J. (1981). Dendritic release of dopamine in the substantia nigra. *Nature* 289, 537–543.
- Chinta, S.J., and Andersen, J.K. (2005). Dopaminergic neurons. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 37, 942–946.
- Christenson, J.G., Dairman, W., and Udenfriend, S. (1972). On the identity of DOPA decarboxylase and 5-hydroxytryptophan decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 343–347.
- Christy, A., Nyhan, W., and Wilson, J. (2017). Severe respiratory acidosis in status epilepticus as a possible etiology of sudden death in Lesch–Nyhan disease: a case report and review of the literature. *JIMD Reports* 35, 23–28.

- Cichewicz, K., Garren, E.J., Adiele, C., Aso, Y., Wang, Z., Wu, M., Birman, S., Rubin, G.M., and Hirsh, J. (2017). A new brain dopamine-deficient *Drosophila* and its pharmacological and genetic rescue. *Genes Brain Behav.* 16, 394–403.
- Cif, L., Biolsi, B., Gavarini, S., Saux, A., Robles, S.G., Tancu, C., Vasques, X., and Coubes, P. (2007). Antero-ventral internal pallidum stimulation improves behavioral disorders in Lesch–Nyhan disease. *Mov. Disord.* 22, 2126–2129.
- Cipriani, S., Chen, X., and Schwarzschild, M.A. (2010). Urate: a novel biomarker of Parkinson’s disease risk, diagnosis and prognosis. *Biomark. Med.* 4, 701–712.
- Cipriani, S., Bakshi, R., and Schwarzschild, M.A. (2014). Protection by inosine in a cellular model of Parkinson’s disease. *Neuroscience* 274, 242–249.
- Ciruela, F., Ferré, S., Casadó, V., Cortés, A., Cunha, R.A., Lluís, C., and Franco, R. (2006). Heterodimeric adenosine receptors: a device to regulate neurotransmitter release. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 2427–2431.
- Clark, D.V. (1994). Molecular and genetic analyses of *Drosophila* Prat, which encodes the first enzyme of de novo purine biosynthesis. *Genetics* 136, 547–557.
- Coll-Tané, M., Krebbers, A., Castells-Nobau, A., Zweier, C., and Schenck, A. (2019). Intellectual disability and autism spectrum disorders ‘on the fly’: insights from *Drosophila*. *Dis. Model. Mech.* 12, pii: dmm039180.
- Connolly, K. (1967). Locomotor activity in *Drosophila*. 3. A distinction between activity and reactivity. *Anim. Behav.* 15, 149–152.
- Coulom, H., and Birman, S. (2004). Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson’s disease in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci.* 24, 10993–10998.
- Cristini, S., Navone, S., Canzi, L., Acerbi, F., Ciusani, E., Hladnik, U., de Gemmis, P., Alessandri, G., Colombo, A., Parati, E., et al. (2010). Human neural stem cells: a model system for the study of Lesch-Nyhan disease neurological aspects. *Hum. Mol. Genet.* 19, 1939–1950.
- Criswell, H., Mueller, R.A., and Breese, G.R. (1988). Assessment of purine-dopamine interactions in 6-hydroxydopamine-lesioned rats: evidence for pre- and postsynaptic influences by adenosine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 244, 493–500.
- Crotty, G.F., Ascherio, A., and Schwarzschild, M.A. (2017). Targeting urate to reduce oxidative stress in Parkinson disease. *Exp. Neurol.* 298, 210–224.
- Crussi, F.G. (1969). The pathological condition of the Lesch-Nyhan syndrome: report of two cases. *Am. J. Dis. Child.* 118, 501.

Références bibliographiques

- Curto, R., Voit, O.E., and Cascante, M. (1998). Analysis of abnormalities in purine metabolism leading to gout and to neurological dysfunctions in man. *Biochem. J.* 329, 477–487.
- Cutler, R., Camandola, S., Malott, K., Edelhauser, M., and Mattson, M. (2015). The role of uric acid and methyl derivatives in the prevention of age-related neurodegenerative disorders. *Curr. Top. Med. Chem.* 15, 2233–2238.
- Cyr, M., Sotnikova, T.D., Gainetdinov, R.R., and Caron, M.G. (2006). Dopamine enhances motor and neuropathological consequences of polyglutamine expanded huntingtin. *FASEB J.* 20, 2541–2543.
- Dabrowski, E., Smathers, S.A., Ralstrom, C.S., Nigro, M.A., and Leleszi, J.P. (2005). Botulinum toxin as a novel treatment for self-mutilation in Lesch-Nyhan syndrome. *Dev. Med. Child Neurol.* 47, 636–639.
- Daignan-Fornier, B., and Pinson, B. (2019). Yeast to study human purine metabolism diseases. *Cells* 8, 67.
- Dasheiff, R.M. (1980). Benzodiazepine treatment for Lesch-Nyhan syndrome? *Dev Med Child Neurol* 22, 101–102.
- Davie, K., Janssens, J., Koldere, D., De Waegeneer, M., Pech, U., Kreft, Ł., Aibar, S., Makhzami, S., Christiaens, V., Bravo González-Blas, C., et al. (2018). A single-cell transcriptome atlas of the aging *Drosophila* brain. *Cell* 174, 982–998.
- De Gregorio, L., Nyhan, W.L., Serafin, E., and Chamoles, N.A. (2000). An unexpected affected female patient in a classical Lesch-Nyhan family. *Mol. Genet. Metab.* 69, 263–268.
- Deepashree, S., Niveditha, S., Shivanandappa, T., and Ramesh, S.R. (2019). Oxidative stress resistance as a factor in aging: evidence from an extended longevity phenotype of *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology* 20, 497–513.
- Deon, L.L., Kalichman, M.A., Booth, C.L., Slavin, K.V., and Gaebler-Spira, D.J. (2012). Pallidal deep-brain stimulation associated with complete remission of self-injurious behaviors in a patient with Lesch-Nyhan syndrome: a case report. *J. Child Neurol.* 27, 117–120.
- Dhasmana, K.M., Banerjee, A.K., Zhu, Y.N., Erdmann, W., Parmar, S.S., and Salzman, S.K. (1989). Role of dopamine receptors in gastrointestinal motility. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 64, 485–488.
- Di Chiara, G., Camba, R., and Spano, P.F. (1971). Evidence for inhibition by brain serotonin of mouse killing behaviour in rats. *Nature* 233, 272–273.

- Doetschman, T., Gregg, R.G., Maeda, N., Hooper, M.L., Melton, D.W., Thompson, S., and Smithies, O. (1987). Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 330, 576–578.
- Dolcetta, D., Parmigiani, P., Salmaso, L., Bernardelle, R., Cesari, U., Andrichetto, G., Baschiroto, G., Nyhan, W.L., and Hladnik, U. (2013). Quantitative evaluation of the clinical effects of S-adenosylmethionine on mood and behavior in Lesch-Nyhan patients. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 32, 174–188.
- Dolezelova, E., Nothacker, H.-P., Civelli, O., Bryant, P.J., and Zurovec, M. (2007). A *Drosophila* adenosine receptor activates cAMP and calcium signaling. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 318–329.
- Doleželová, E., Terán, D., Gahura, O., Kotrbová, Z., Procházková, M., Keough, D., Špaček, P., Hocková, D., Guddat, L., and Zíková, A. (2018). Evaluation of the *Trypanosoma brucei* 6-oxopurine salvage pathway as a potential target for drug discovery. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, e0006301.
- Drozd, M., Bardoni, B., and Capovilla, M. (2018). Modeling Fragile X Syndrome in *Drosophila*. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 124.
- Dubowy, C., and Sehgal, A. (2017). Circadian rhythms and sleep in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 205, 1373–1397.
- Dung, V.M., and Thao, D.T.P. (2018). Parkinson's disease model. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1076, 41–61.
- Dunnett, S.B., Sirinathsinghji, D.J.S., Heavens, R., Rogers, D.C., and Kuehn, M.R. (1989). Monoamine deficiency in a transgenic (*Hprt*⁻) mouse model of Lesch-Nyhan syndrome. *Brain Res.* 501, 401–406.
- Egami, K., Yitta, S., Kasim, S., Lewers, J.C., Roberts, R.C., Lehar, M., and Jinnah, H.A. (2007). Basal ganglia dopamine loss due to defect in purine recycling. *Neurobiol. Dis.* 26, 396–407.
- Eisenhofer, G. (2004). Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol. Rev.* 56, 331–349.
- Engle, S.J., Stockelman, M.G., Chen, J., Boivin, G., Yum, M.-N., Davies, P.M., Ying, M.Y., Sahota, A., Simmonds, H.A., Stambrook, P.J., et al. (1996a). Adenine phosphoribosyltransferase-deficient mice develop 2,8-dihydroxyadenine nephrolithiasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 5307–5312.
- Engle, S.J., Womer, D.E., Davies, P.M., Boivin, G., Sahota, A., Simmonds, H.A., Stambrook, P.J., and Tischfield, J.A. (1996b). HPRT-APRT-deficient mice are not a model for Lesch-Nyhan syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1607–1610.

Références bibliographiques

Ernst, M., Zametkin, A.J., Matochik, J.A., Pascualvaca, D., Jons, P.H., Hardy, K., Hankerson, J.G., Doudet, D.J., and Cohen, R.M. (1996). Presynaptic dopaminergic deficits in Lesch–Nyhan disease. *N. Engl. J. Med.* 334, 1568–1572.

Erny, R., and Wagner, J.A. (1984). Adenosine-dependent activation of tyrosine hydroxylase is defective in adenosine kinase-deficient PC12 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 4974–4978.

Ewing, A.W. (1983). Functional aspects of *Drosophila* courtship. *Biol. Rev.* 58, 275–292.

Fahn, S. (2008). The history of dopamine and levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 23, S497–S508.

Fahn, S., and Cohen, G. (1992). The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: Evidence supporting it. *Ann. Neurol.* 32, 804–812.

Fairbanks, L.D., Jacomelli, G., Micheli, V., Slade, T., and Simmonds, H.A. (2002). Severe pyridine nucleotide depletion in fibroblasts from Lesch–Nyhan patients. *Biochem. J.* 366, 265–272.

Faivre, E., Coelho, J.E., Zornbach, K., Malik, E., Baqi, Y., Schneider, M., Cellai, L., Carvalho, K., Sebda, S., Figeac, M., et al. (2018). Beneficial effect of a selective adenosine A2A receptor antagonist in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 235.

Fang, J.Y., and Tolleson, C. (2017). The role of deep brain stimulation in Parkinson's disease: an overview and update on new developments. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 13, 723–732.

Faraone, S.V., Perlis, R.H., Doyle, A.E., Smoller, J.W., Goralnick, J.J., Holmgren, M.A., and Sklar, P. (2005). Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol. Psychiatry* 57, 1313–1323.

Fathalla, A.M., Soliman, A.M., and Moustafa, A.A. (2017). Selective A2A receptors blockade reduces degeneration of substantia nigra dopamine neurons in a rotenone-induced rat model of Parkinson's disease: a histological study. *Neurosci. Lett.* 643, 89–96.

Faville, R., Kottler, B., Goodhill, G.J., Shaw, P.J., and van Swinderen, B. (2015). How deeply does your mutant sleep? Probing arousal to better understand sleep defects in *Drosophila*. *Sci. Rep.* 5, 8454.

Feany, M.B., and Bender, W.W. (2000). A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* 404, 394–398.

Felix, J.S., and DeMars, R. (1969). The purine requirement of cells cultured from humans affected with the Lesch–Nyhan syndrome (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 62, 536–543.

- Feng, G., Hannan, F., Reale, V., Hon, Y.Y., Kousky, C.T., Evans, P.D., and Hall, L.M. (1996). Cloning and functional characterization of a novel dopamine receptor from *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci.* *16*, 3925–3933.
- Ferdousy, F., Bodeen, W., Summers, K., Doherty, O., Wright, O., Elsis, N., Hilliard, G., O'Donnell, J.M., and Reiter, L.T. (2011). *Drosophila* Ube3a regulates monoamine synthesis by increasing GTP cyclohydrolase I activity via a non-ubiquitin ligase mechanism. *Neurobiol. Dis.* *41*, 669–677.
- Fergestad, T., Bostwick, B., and Ganetzky, B. (2006). Metabolic disruption in *Drosophila* bang-sensitive seizure mutants. *Genetics* *173*, 1357–1364.
- Fernández-Hernández, I., Scheenaard, E., Pollarolo, G., and Gonzalez, C. (2016). The translational relevance of *Drosophila* in drug discovery. *EMBO Rep.* *17*, 471–472.
- Fernstrom, J.D., and Fernstrom, M.H. (2007). Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. *J. Nutr.* *137*, 1539S–1547S.
- Ferré, S., Fuxe, K., B. Fredholm, B., Morelli, M., and Popoli, P. (1997). Adenosine–dopamine receptor–receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* *20*, 482–487.
- Ferré, S., Torvinen, M., Antoniou, K., Irenius, E., Civelli, O., Arenas, E., Fredholm, B.B., and Fuxe, K. (1998). Adenosine A₁ receptor-mediated modulation of dopamine D₁ receptors in stably cotransfected fibroblast cells. *J. Biol. Chem.* *273*, 4718–4724.
- Ferré, S., Quiroz, C., Rea, W., Guitart, X., and García-Borreguero, D. (2019). Adenosine mechanisms and hypersensitive corticostriatal terminals in restless legs syndrome. Rationale for the use of inhibitors of adenosine transport. In *Advances in Pharmacology*, (Elsevier), pp. 3–19.
- Finger, S., Heavens, R.P., Sirinathsinghji, D.J., Kuehn, M.R., and Dunnett, S.B. (1988). Behavioral and neurochemical evaluation of a transgenic mouse model of Lesch-Nyhan syndrome. *J. Neurol. Sci.* *86*, 203–213.
- Foster, H.D., and Hoffer, A. (2004). The two faces of L-DOPA: benefits and adverse side effects in the treatment of Encephalitis lethargica, Parkinson's disease, multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Med. Hypotheses* *62*, 177–181.
- Fountain, S.J. (2013). Primitive ATP-activated P2X receptors: discovery, function and pharmacology. *Front. Cell. Neurosci.* *7*, 247.
- Fox, I., Andres, C., Gelfand, E., and Biggar, D. (1977). Purine nucleoside phosphorylase deficiency: altered kinetic properties of a mutant enzyme. *Science* *197*, 1084–1086.

Références bibliographiques

- Franco, R., Ferré, S., Agnati, L., Torvinen, M., Ginés, S., Hillion, J., Casadó, V., Lledó, P.-M., Zoli, M., Lluís, C., et al. (2000). Evidence for adenosine/dopamine receptor interactions: indications for heteromerization. *Neuropsychopharmacology* 23, S50–S59.
- Friedman, T.B. (1973). Observations on the regulation of uricase activity during development of *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.* 8, 37–45.
- Friedmann, T., Seegmiller, J.E., and Subak-Sharpe, J.H. (1969). Evidence against the existence of guanosine and inosine kinases in human fibroblasts in tissue culture. *Exp. Cell. Res.* 56, 425–429.
- Friggi-Grelín, F., Coulom, H., Meller, M., Gomez, D., Hirsh, J., and Birman, S. (2003a). Targeted gene expression in *Drosophila* dopaminergic cells using regulatory sequences from tyrosine hydroxylase. *J. Neurobiol.* 54, 618–627.
- Friggi-Grelín, F., Iché, M., and Birman, S. (2003b). Tissue-specific developmental requirements of *Drosophila* tyrosine hydroxylase isoforms. *Genesis* 35, 260–269.
- Fu, R., and Jinnah, H.A. (2012). Genotype-phenotype correlations in Lesch-Nyhan disease: moving beyond the gene. *J. Biol. Chem.* 287, 2997–3008.
- Fu, R., Ceballos-Picot, I., Torres, R.J., Larovere, L.E., Yamada, Y., Nguyen, K.V., Hegde, M., Visser, J.E., Schretlen, D.J., Nyhan, W.L., et al. (2014a). Genotype-phenotype correlations in neurogenetics: Lesch-Nyhan disease as a model disorder. *Brain* 137, 1282–1303.
- Fu, R., Chen, C.-J., and Jinnah, H.A. (2014b). Genotypic and phenotypic spectrum in attenuated variants of Lesch-Nyhan disease. *Mol. Genet. Metab.* 112, 280–285.
- Fu, R., Sutcliffe, D., Zhao, H., Huang, X., Schretlen, D.J., Benkovic, S., and Jinnah, H.A. (2015). Clinical severity in Lesch-Nyhan disease: the role of residual enzyme and compensatory pathways. *Mol. Genet. Metab.* 114, 55–61.
- Fumagalli, M., Lecca, D., Abbracchio, M.P., and Ceruti, S. (2017). Pathophysiological role of purines and pyrimidines in neurodevelopment: unveiling new pharmacological approaches to congenital brain diseases. *Front. Pharmacol.* 8, 941.
- Fuxe, K., Marcellino, D., Borroto-Escuela, D.O., Guescini, M., Fernández-Dueñas, V., Tanganelli, S., Rivera, A., Ciruela, F., and Agnati, L.F. (2010). Adenosine-dopamine interactions in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *CNS Neurosci. Ther.* 16, e18–e42.
- Gammella, E., Cairo, G., and Tacchini, L. (2010). Adenosine A_{2A} receptor but not HIF-1 mediates tyrosine hydroxylase induction in hypoxic PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* 88, 2007–2016.

- Gao, X., O'Reilly, É.J., Schwarzschild, M.A., and Ascherio, A. (2016). Prospective study of plasma urate and risk of Parkinson disease in men and women. *Neurology* 86, 520–526.
- García, M.G., Puig, J.G., and Torres, R.J. (2009). Abnormal adenosine and dopamine receptor expression in lymphocytes of Lesch–Nyhan patients. *Brain Behav. Immun.* 23, 1125–1131.
- García, M.G., Puig, J.G., and Torres, R.J. (2012). Adenosine, dopamine and serotonin receptors imbalance in lymphocytes of Lesch-Nyhan patients. *J. Inherit. Metab. Dis.* 35, 1129–1135.
- Garcia-Esparcia, P., Hernández-Ortega, K., Ansoleaga, B., Carmona, M., and Ferrer, I. (2015). Purine metabolism gene deregulation in Parkinson's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 41, 926–940.
- Gatto, C.L., and Broadie, K. (2011). *Drosophila* modeling of heritable neurodevelopmental disorders. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21, 834–841.
- Genro, J.P., Kieling, C., Rohde, L.A., and Hutz, M.H. (2010). Attention-deficit/hyperactivity disorder and the dopaminergic hypotheses. *Expert. Rev. Neurother.* 10, 587–601.
- Gilman, A.G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 615–649.
- Glick, N. (2006). Dramatic reduction in self-injury in Lesch-Nyhan disease following S-adenosylmethionine administration. *J. Inherit. Metab. Dis.* 29, 687.
- Goguel, V., Belair, A.-L., Ayaz, D., Lampin-Saint-Amaux, A., Scaplehorn, N., Hassan, B.A., and Preat, T. (2011). *Drosophila* amyloid precursor protein-like is required for long-term memory. *J. Neurosci.* 31, 1032–1037.
- Goldstein, M., Anderson, L.T., Reuben, R., and Dancis, J. (1985). Self-mutilation in Lesch-Nyhan disease is caused by dopaminergic denervation. *Lancet* 325, 338–339.
- Goldstein, M., Kuga, S., Kusano, N., Meller, E., Dancis, J., and Schwarcz, R. (1986). Dopamine agonist induced self-mutilative biting behavior in monkeys with unilateral ventromedial tegmental lesions of the brainstem: possible pharmacological model for Lesch-Nyhan syndrome. *Brain Res.* 367, 114–120.
- Göttle, M., Prudente, C.N., Fu, R., Sutcliffe, D., Pang, H., Cooper, D., Veledar, E., Glass, J.D., Gearing, M., Visser, J.E., et al. (2014). Loss of dopamine phenotype among midbrain neurons in Lesch-Nyhan disease. *Ann. Neurol.* 76, 95–107.

Références bibliographiques

Gotzes, F., Balfanz, S., and Baumann, A. (1994). Primary structure and functional characterization of a *Drosophila* dopamine receptor with high homology to human D1/5 receptors. *Recept. Channels* 2, 131–141.

Gray, J.H., Owen, R.P., and Giacomini, K.M. (2004). The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch.* 447, 728–734.

Greene, M.L., Boyle, J.A., and Seegmiller, J.E. (1970). Substrate stabilization: genetically controlled reciprocal relationship of two human enzymes. *Science* 167, 887–889.

Greer, C.L., Grygoruk, A., Patton, D.E., Ley, B., Romero-Calderon, R., Chang, H.-Y., Houshyar, R., Bainton, R.J., DiAntonio, A., and Krantz, D.E. (2005). A splice variant of the *Drosophila* vesicular monoamine transporter contains a conserved trafficking domain and functions in the storage of dopamine, serotonin, and octopamine. *J. Neurobiol.* 64, 239–258.

Groiss, S.J., Wojtecki, L., Südmeyer, M., and Schnitzler, A. (2009). Review: deep brain stimulation in Parkinson's disease. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 2, 379–391.

Grotewiel, M.S., Martin, I., Bhandari, P., and Cook-Wiens, E. (2005). Functional senescence in *Drosophila melanogaster*. *Ageing Res. Rev* 4, 372–397.

Gualtieri, C.T., and Schroeder, S.R. (1989). Pharmacotherapy for self-injurious behavior: preliminary tests of the D1 hypothesis. *Psychopharmacol. Bull.* 25, 364–371.

Guibinga, G.-H., Hsu, S., and Friedmann, T. (2010). Deficiency of the housekeeping gene hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) dysregulates neurogenesis. *Mol. Ther.* 18, 54–62.

Guibinga, G.-H., Hrustanovic, G., Bouic, K., Jinnah, H.A., and Friedmann, T. (2012). MicroRNA-mediated dysregulation of neural developmental genes in HPRT deficiency: clues for Lesch-Nyhan disease? *Hum. Mol. Genet.* 21, 609–622.

Guibinga, G.-H., Murray, F., and Barron, N. (2013). HPRT-deficiency dysregulates cAMP-PKA signaling and phosphodiesterase 10A expression: mechanistic insight and potential target for Lesch-Nyhan disease? *PLoS One* 8, e63333.

Guillot, T.S., and Miller, G.W. (2009). Protective actions of the vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) in monoaminergic neurons. *Mol. Neurobiol.* 39, 149–170.

Guo, J., Tang, H.-W., Li, J., Perrimon, N., and Yan, D. (2018). Xio is a component of the *Drosophila* sex determination pathway and RNA N⁶-methyladenosine methyltransferase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, 3674–3679.

Haga, H., Matsuo, K., Yabuki, Y., Zhang, C., Han, F., and Fukunaga, K. (2019). Enhancement of ATP production ameliorates motor and cognitive impairments in a mouse model of MPTP-induced Parkinson's disease. *Neurochem. Int.* 129, 104492.

- Hahn, N., Geurten, B., Gurvich, A., Piepenbrock, D., Kästner, A., Zanini, D., Xing, G., Xie, W., Göpfert, M.C., Ehrenreich, H., et al. (2013). Monogenic heritable autism gene neurologigin impacts *Drosophila* social behaviour. *Behav. Brain Res.* 252, 450–457.
- Hall, J.C. (1977). Portions of the central nervous system controlling reproductive behavior in *Drosophila melanogaster*. *Behav. Genet.* 7, 291–312.
- Han, K.-A., Millar, N.S., Grotewiel, M.S., and Davis, R.L. (1996). DAMB, a novel dopamine receptor expressed specifically in *Drosophila* mushroom bodies. *Neuron* 16, 1127–1135.
- Hardie, D.G. (2003). Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology* 144, 5179–5183.
- Hardie, S.L., and Hirsh, J. (2006). An improved method for the separation and detection of biogenic amines in adult *Drosophila* brain extracts by high performance liquid chromatography. *J. Neurosci. Methods* 153, 243–249.
- Harkness, R.A., McCreanor, G.M., and Watts, R.W.E. (1988). Lesch-Nyhan syndrome and its pathogenesis: purine concentrations in plasma and urine with metabolite profiles in CSF. *J. Inherit. Metab. Dis.* 11, 239–252.
- Harris, J.C., Lee, R.R., Jinnah, H.A., Wong, D.F., Yaster, M., and Bryan, R.N. (1998). Craniocerebral magnetic resonance imaging measurement and findings in Lesch-Nyhan syndrome. *Arch. Neurol.* 55, 547–553.
- Hearn, M.G., Ren, Y., McBride, E.W., Reveillaud, I., Beinborn, M., and Kopin, A.S. (2002). A *Drosophila* dopamine 2-like receptor: molecular characterization and identification of multiple alternatively spliced variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 14554–14559.
- Hegarty, S.V., Sullivan, A.M., and O’Keeffe, G.W. (2013). Midbrain dopaminergic neurons: a review of the molecular circuitry that regulates their development. *Dev. Biol.* 379, 123–138.
- Heigwer, F., Port, F., and Boutros, M. (2018). RNA interference (RNAi) screening in *Drosophila*. *Genetics* 208, 853–874.
- Henikoff, S., Nash, D., Hards, R., Bleskan, J., Woolford, J.F., Naguib, F., and Patterson, D. (1986). Two *Drosophila melanogaster* mutations block successive steps of de novo purine synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 3919–3923.
- Hersh, J.H., Page, T., Hand, M.E., Edwin Seegmiller, J., Nyhan, W.L., and Weisskopf, B. (1986). Clinical correlations in partial hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase deficiency. *Pediatr. Neurol.* 2, 302–304.

Références bibliographiques

- Himmelreich, S., Masuho, I., Berry, J.A., MacMullen, C., Skamangas, N.K., Martemyanov, K.A., and Davis, R.L. (2017). Dopamine receptor DAMB signals via Gq to mediate forgetting in *Drosophila*. *Cell. Rep.* **21**, 2074–2081.
- Hintermann, E., Griedert, N.C., Amherd, R., Brodbeck, D., and Meyer, U.A. (1996). Cloning of an arylalkylamine N-acetyltransferase (aaNAT1) from *Drosophila melanogaster* expressed in the nervous system and the gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 12315–12320.
- Hodge, L.D., and Glassman, E. (1967a). Purine catabolism in *Drosophila melanogaster*. II. Guanine deaminase, inosine phosphorylase and adenosine deaminase activities in mutants with altered xanthine dehydrogenase activities. *Genetics* **57**, 571–577.
- Hodge, L.D., and Glassman, E. (1967b). Purine catabolism in *Drosophila melanogaster*. I. Reactions leading to xanthine dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta.* **149**, 335–343.
- Hodgetts, R.B. (1972). Biochemical characterization of mutants affecting the metabolism of β -alanine in *Drosophila*. *J. Insect Physiol.* **18**, 937–947.
- Holland, C., Lipsett, D.B., and Clark, D.V. (2011). A link between impaired purine nucleotide synthesis and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **188**, 359–367.
- Holmes, J.C., and Fowler, N.O. (1962). Direct cardiac effects of dopamine. *Circ. Res.* **10**, 68–72.
- Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S., and Monk, M. (1987). HPRT-deficient (Lesch–Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* **326**, 292–295.
- Hornykiewicz, O. (1986). A quarter century of brain dopamine research. In *Dopaminergic Systems and Their Regulation*, G.N. Woodruff, J.A. Poat, and P.J. Roberts, eds. (London: Palgrave Macmillan UK), pp. 3–18.
- Hornykiewicz, O. (2002a). L-DOPA: from a biologically inactive amino acid to a successful therapeutic agent. *Amino Acids* **23**, 65–70.
- Hornykiewicz, O. (2002b). Dopamine miracle: from brain homogenate to dopamine replacement. *Mov. Disord.* **17**, 501–508.
- Hovemann, B.T., Ryseck, R.-P., Walldorf, U., Störtkuhl, K.F., Dietzel, I.D., and Dessen, E. (1998). The *Drosophila* ebony gene is closely related to microbial peptide synthetases and shows specific cuticle and nervous system expression. *Gene* **221**, 1–9.
- Howes, O.D., McCutcheon, R., Owen, M.J., and Murray, R.M. (2017). The role of genes, stress, and dopamine in the development of schizophrenia. *Biol. Psychiatry* **81**, 9–20.

- Howlett, I.C., Rusan, Z.M., Parker, L., and Tanouye, M.A. (2013). *Drosophila* as a model for intractable epilepsy: *gilgamesh* suppresses seizures in *para*^{bss1} heterozygote flies. *G3 (Bethesda)* 3, 1399–1407.
- Huang, W., Xu, Y., Zhang, Y., Zhang, P., Zhang, Q., Zhang, Z., and Xu, F. (2019). Metabolomics-driven identification of adenosine deaminase as therapeutic target in a mouse model of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 150, 282–295.
- Huyet, J., Ozeir, M., Burgevin, M.-C., Pinson, B., Chesney, F., Remy, J.-M., Siddiqi, A.R., Lupoli, R., Pinon, G., Saint-Marc, C., et al. (2018). Structural insights into the forward and reverse enzymatic reactions in human adenine phosphoribosyltransferase. *Cell. Chem. Biol.* 25, 666–676.
- Ipata, P.L. (2011). Origin, utilization, and recycling of nucleosides in the central nervous system. *Adv. Physiol. Educ.* 35, 342–346.
- Isotani, A., Yamagata, K., Okabe, M., and Ikawa, M. (2016). Generation of Hprt-disrupted rat through mouse←rat ES chimeras. *Sci. Rep.* 6, 24215.
- Ito, M., Masuda, N., Shinomiya, K., Endo, K., and Ito, K. (2013). Systematic analysis of neural projections reveals clonal composition of the *Drosophila* brain. *Curr. Biol.* 23, 644–655.
- Jaberi, E., Rohani, M., Shahidi, G.A., Nafissi, S., Arefian, E., Soleimani, M., Moghadam, A., Arzenani, M.K., Keramatian, F., Klotzle, B., et al. (2016). Mutation in *ADORA1* identified as likely cause of early-onset parkinsonism and cognitive dysfunction. *Mov. Disord.* 31, 1004–1011.
- Jain, S., Ton, T.G., Boudreau, R.M., Yang, M., Thacker, E.L., Studenski, S., Longstreth, Jr., W.T., Strotmeyer, E.S., and Newman, A.B. (2011). The risk of Parkinson disease associated with urate in a community-based cohort of older adults. *Neuroepidemiology* 36, 223–229.
- Jaiswal, M., Sandoval, H., Zhang, K., Bayat, V., and Bellen, H.J. (2012). Probing mechanisms that underlie human neurodegenerative diseases in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* 46, 371–396.
- Jakel, R.J., and Maragos, W.F. (2000). Neuronal cell death in Huntington's disease: a potential role for dopamine. *Trends Neurosci.* 23, 239–245.
- Jankovic, J., Caskey, T.C., Stout, J.T., and Butler, I.J. (1988). Lesch-nyhan syndrome: a study of motor behavior and cerebrospinal fluid neurotransmitters. *Ann. Neurol.* 23, 466–469.
- Jennings, A., and Rusakov, D.A. (2016). Do astrocytes respond to dopamine? *Opera Med. Physiol.* 2, 34–43.

Références bibliographiques

- Jiang, Y., Pitmon, E., Berry, J., Wolf, F.W., McKenzie, Z., and Lebestky, T.J. (2016). A genetic screen to assess dopamine receptor (DopR1) dependent sleep regulation in *Drosophila*. *G3 (Bethesda)* 6, 4217–4226.
- Jinnah, H.A., Gage, F.H., and Friedmann, T. (1990). Animal models of Lesch-Nyhan syndrome. *Brain Res. Bull.* 25, 467–475.
- Jinnah, H.A., Page, T., and Friedmann, T. (1993). Brain purines in a genetic mouse model of Lesch-Nyhan disease. *J. Neurochem.* 60, 2036–2045.
- Jinnah, H.A., Wojcik, B.E., Hunt, M., Narang, N., Lee, K.Y., Goldstein, M., Wamsley, J.K., Langlais, P.J., and Friedmann, T. (1994). Dopamine deficiency in a genetic mouse model of Lesch-Nyhan disease. *J. Neurosci.* 14, 1164–1175.
- Jinnah, H.A., Visser, J.E., Harris, J.C., Verdu, A., Larovere, L., Ceballos-Picot, I., Gonzalez-Alegre, P., Neychev, V., Torres, R.J., Dulac, O., et al. (2006). Delineation of the motor disorder of Lesch-Nyhan disease. *Brain* 129, 1201–1217.
- Jinnah, H.A., Ceballos-Picot, I., Torres, R.J., Visser, J.E., Schretlen, D.J., Verdu, A., Larovere, L.E., Chen, C.-J., Cossu, A., Wu, C.-H., et al. (2010). Attenuated variants of Lesch-Nyhan disease. *Brain* 133, 671–689.
- Jinnah, H.A., Sabina, R. I., and Van Den Berghe, G. (2013). Metabolic disorders of purine metabolism affecting the nervous system. In *Handbook of Clinical Neurology*, (Elsevier), pp. 1827–1836.
- Johnson, D.H., and Friedman, T.B. (1981). Purine resistant mutants of *Drosophila* are adenine phosphoribosyltransferase deficient. *Science* 212, 1035–1036.
- Johnson, D.H., and Friedman, T.B. (1983). Purine-resistant *Drosophila melanogaster* result from mutations in the adenine phosphoribosyltransferase structural gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 2990–2994.
- Johnson, D.H., Edström, J.-E., Burnett, J.B., and Friedman, T.B. (1987). Cloning of a *Drosophila melanogaster* adenine phosphoribosyltransferase structural gene and deduced amino acid sequence of the enzyme. *Gene* 59, 77–86.
- Johnson, E.C., Kazgan, N., Bretz, C.A., Forsberg, L.J., Hector, C.E., Worthen, R.J., Onyenwoke, R., and Brenman, J.E. (2010). Altered metabolism and persistent starvation behaviors caused by reduced ampk function in *Drosophila*. *PLoS One* 5, e12799.
- Johnson, M.M., Nash, D., and Henderson, J.F. (1980a). Metabolism of adenosine in larvae of *Drosophila melanogaster*. *Comp. Biochem. Physiol.* 66B, 549–553.
- Johnson, M.M., Nash, D., and Henderson, J.F. (1980b). Metabolism of guanine and guanosine in larvae of *Drosophila melanogaster*. *Comp. Biochem. Physiol.* 66B, 563–567.

- Johnson, M.M., Nash, D., and Henderson, J.F. (1980c). Purine metabolism in larvae of *Drosophila melanogaster* fed radioactive hypoxanthine, inosine or formate. *Comp. Biochem. Physiol.* 66B, 555–561.
- Johnson, T.A., Jinnah, H.A., and Kamatani, N. (2019). Shortage of cellular ATP as a cause of diseases and strategies to enhance ATP. *Front. Pharmacol.* *In press*.
- Jolly, D.J., Okayama, H., Berg, P., Esty, A.C., Filpula, D., Bohlen, P., Johnson, G.G., Shively, J.E., Hunkapillar, T., and Friedmann, T. (1983). Isolation and characterization of a full-length expressible cDNA for human hypoxanthine phosphoribosyl transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 477–481.
- Jordan, K.W., Morgan, T.J., and Mackay, T.F.C. (2006). Quantitative trait loci for locomotor behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 174, 271–284.
- Jose, P.A., Eisner, G.M., and Felder, R.A. (2002). Role of dopamine receptors in the kidney in the regulation of blood pressure: *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 11, 87–92.
- Juhász, G., Erdi, B., Sass, M., and Neufeld, T.P. (2007). Atg7-dependent autophagy promotes neuronal health, stress tolerance, and longevity but is dispensable for metamorphosis in *Drosophila*. *Genes Dev.* 21, 3061–3066.
- Jurecka, A. (2009). Inborn errors of purine and pyrimidine metabolism. *J. Inher. Metab. Dis.* 32, 247–263.
- Kang, T.H., and Friedmann, T. (2015). Alzheimer’s disease shares gene expression aberrations with purinergic dysregulation of HPRT deficiency (Lesch–Nyhan disease). *Neurosci. Lett.* 590, 35–39.
- Kang, T.H., Guibinga, G.-H., and Friedmann, T. (2011). HPRT deficiency coordinately dysregulates canonical Wnt and presenilin-1 signaling: a neuro-developmental regulatory role for a housekeeping gene? *PLoS One* 6, e16572.
- Kang, T.H., Park, Y., Bader, J.S., and Friedmann, T. (2013). The housekeeping gene hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) regulates multiple developmental and metabolic pathways of murine embryonic stem cell neuronal differentiation. *PLoS One* 8, e74967.
- Karam, C.S., Jones, S.K., and Javitch, J.A. (2019). Come fly with me: an overview of dopamine receptors in *Drosophila melanogaster*. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* *In press*.
- Kasture, A.S., Hummel, T., Sucic, S., and Freissmuth, M. (2018). Big lessons from tiny flies: *Drosophila melanogaster* as a model to explore dysfunction of dopaminergic and serotonergic neurotransmitter systems. *Int. J. Mol. Sci.* 19, pii: E1788.

Références bibliographiques

- Kawasaki, H., Shimaoka, M., Usuda, Y., and Utagawa, T. (2000). End-product regulation and kinetic mechanism of guanosine-inosine kinase from *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 972–979.
- Keebaugh, A.C., Mitchell, H.A., Gaval-Cruz, M., Freeman, K.G., Edwards, G.L., Weinshenker, D., and Thomas, J.W. (2011). PRTFDC1 Is a genetic modifier of HPRT-deficiency in the mouse. *PLoS One* **6**, e22381.
- Kelley, W.N., Rosenbloom, F.M., Henderson, J.F., and Seegmiller, J.E. (1967). A specific enzyme defect in gout associated with overproduction of uric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **57**, 1735–1739.
- Kelley, W.N., Greene, M.L., Rosenbloom, F.M., Henderson, J.F., and Seegmiller, J.E. (1969). Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency in gout. *Ann. Intern. Med.* **70**, 155–206.
- Kenny, P.J. (2011). Common cellular and molecular mechanisms in obesity and drug addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* **12**, 638–651.
- Keough, D.T., Rejman, D., Pohl, R., Zborníková, E., Hocková, D., Croll, T., Edstein, M.D., Birrell, G.W., Chavchich, M., Naesens, L.M.J., et al. (2018). Design of *Plasmodium vivax* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase inhibitors as potential antimalarial therapeutics. *ACS Chem. Biol.* **13**, 82–90.
- Khasnavis, T., Torres, R.J., Sommerfeld, B., Puig, J.G., Chipkin, R., and Jinnah, H.A. (2016). A double-blind, placebo-controlled, crossover trial of the selective dopamine D1 receptor antagonist ecopipam in patients with Lesch-Nyhan disease. *Mol. Genet. Metab.* **118**, 160–166.
- Khoja, S., Asatryan, L., Jakowec, M.W., and Davies, D.L. (2019). Dopamine receptor blockade attenuates purinergic P2X4 receptor-mediated prepulse inhibition deficits and underlying molecular mechanisms. *Front. Cell. Neurosci.* **13**, 331.
- Kim, D.S., and Palmiter, R.D. (2008). Interaction of dopamine and adenosine receptor function in behavior: studies with dopamine-deficient mice. *Front. Biosci.* **13**, 2311–2318.
- Kim, Y.-C., Lee, H.-G., Seong, C.-S., and Han, K.-A. (2003). Expression of a D1 dopamine receptor dDA1/DmDOP1 in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Gene Expr. Patterns* **3**, 237–245.
- Kim, Y.-C., Lee, H.-G., and Han, K.-A. (2007). D1 dopamine receptor dDa1 is required in the mushroom body neurons for aversive and appetitive learning in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **27**, 7640–7647.

- Kish, S.J., Fox, I.H., Kapur, B.M., Lloyd, K., and Hornykiewicz, O. (1985). Brain benzodiazepine receptor binding and purine concentration in Lesch-Nyhan syndrome. *Brain Res.* 336, 117–123.
- Klarsfeld, A., Leloup, J.-C., and Rouyer, F. (2003). Circadian rhythms of locomotor activity in *Drosophila*. *Behav. Processes* 64, 161–175.
- Klein, M.O., Battagello, D.S., Cardoso, A.R., Hauser, D.N., Bittencourt, J.C., and Correa, R.G. (2019). Dopamine: functions, signaling, and association with neurological diseases. *Cell. Mol. Neurobiol.* 39, 31–59.
- Knapp, D.J., and Breese, G.R. (2016). The use of perinatal 6-hydroxydopamine to produce a rodent model of Lesch-Nyhan disease. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 29, 265–277.
- Knight, D., Harvey, P.J., Iliadi, K.G., Klose, M.K., Iliadi, N., Dolezelova, E., Charlton, M.P., Zurovec, M., and Boulianne, G.L. (2010). Equilibrative nucleoside transporter 2 regulates associative learning and synaptic function in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 30, 5047–5057.
- Kohli, J.D., McNay, J.L., Rajfer, S.I., and Murphy, M.B. (1991). Peripheral dopamine receptors in cardiovascular therapy. *Hypertension* 17, 700–706.
- Koniszewski, N.D.B., Kollmann, M., Bigham, M., Farnworth, M., He, B., Büscher, M., Hütteroth, W., Binzer, M., Schachtner, J., and Bucher, G. (2016). The insect central complex as model for heterochronic brain development—background, concepts, and tools. *Dev. Genes. Evol.* 226, 209–219.
- Korn, E.D., Remy, C.N., Wasilejko, H.C., and Buchanan, J.M. (1955). Biosynthesis of the purines: VII. Synthesis of nucleotides from bases by partially purified enzymes. *J. Biol. Chem.* 217, 875–884.
- Kornberg, A., Lieberman, I., and Simms, E.S. (1955). Enzymatic synthesis of purine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 215, 417–427.
- Kremer, M.C., Jung, C., Batelli, S., Rubin, G.M., and Gaul, U. (2017). The glia of the adult *Drosophila* nervous system. *Glia* 65, 606–638.
- Kroll, J.R., Wong, K.G., Siddiqui, F.M., and Tanouye, M.A. (2015). Disruption of endocytosis with the dynamin mutant shibire^{ts1} suppresses seizures in *Drosophila*. *Genetics* 201, 1087–1102.
- Krügel, U., Kittner, H., Franke, H., and Illes, P. (2001). Stimulation of P2 receptors in the ventral tegmental area enhances dopaminergic mechanisms in vivo. *Neuropharmacology* 40, 1084–1093.

Références bibliographiques

- Kucerova, L., Broz, V., Fleischmannova, J., Santruckova, E., Sidorov, R., Dolezal, V., and Zurovec, M. (2012). Characterization of the *Drosophila* adenosine receptor: the effect of adenosine analogs on cAMP signaling in *Drosophila* cells and their utility for *in vivo* experiments. *J. Neurochem.* 121, 383–395.
- Kuehn, M.R., Bradley, A., Robertson, E.J., and Evans, M.J. (1987). A potential animal model for Lesch–Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. *Nature* 326, 295–298.
- Kumar, S., Chen, D., and Sehgal, A. (2012). Dopamine acts through cryptochrome to promote acute arousal in *Drosophila*. *Genes Dev.* 26, 1224–1234.
- Kumar, S., Mishra, A., and Krishnamurthy, S. (2017). Purinergic antagonism prevents mitochondrial dysfunction and behavioral deficits associated with dopaminergic toxicity induced by 6-OHDA in rats. *Neurochem. Res.* 42, 3414–3430.
- Kume, K., Kume, S., Park, S.K., Hirsh, J., and Jackson, F.R. (2005). Dopamine is a regulator of arousal in the fruit fly. *J. Neurosci.* 25, 7377–7384.
- Kuric, E., Wieloch, T., and Ruscher, K. (2013). Dopamine receptor activation increases glial cell line-derived neurotrophic factor in experimental stroke. *Exp. Neurol.* 247, 202–208.
- Lai, S.-L., and Lee, T. (2006). Genetic mosaic with dual binary transcriptional systems in *Drosophila*. *Nat. Neurosci.* 9, 703–709.
- Lake, C.R., and Ziegler, M.G. (1977). Lesch-Nyhan syndrome: low dopamine-beta-hydroxylase activity and diminished sympathetic response to stress and posture. *Science* 196, 905–906.
- Lang, S., Hilsabeck, T.A., Wilson, K.A., Sharma, A., Bose, N., Brackman, D.J., Beck, J.N., Chen, L., Watson, M.A., Killilea, D.W., et al. (2019). A conserved role of the insulin-like signaling pathway in diet-dependent uric acid pathologies in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* 15, e1008318.
- Lauber, M., Plecko, B., Pfiffner, M., Nuoffer, J.-M., and Häberle, J. (2017). The effect of S-adenosylmethionine on self-mutilation in a patient with Lesch–Nyhan disease. *JIMD Rep.* 32, 51–57.
- Laurent, C., Eddarkaoui, S., Derisbourg, M., Leboucher, A., Demeyer, D., Carrier, S., Schneider, M., Hamdane, M., Müller, C.E., Buée, L., et al. (2014). Beneficial effects of caffeine in a transgenic model of Alzheimer’s disease-like tau pathology. *Neurobiol. Aging* 35, 2079–2090.
- Lebestky, T., Chang, J.-S.C., Dankert, H., Zelnik, L., Kim, Y.-C., Han, K.-A., Wolf, F.W., Perona, P., and Anderson, D.J. (2009). Two different forms of arousal in *Drosophila* are

oppositely regulated by the dopamine D1 receptor ortholog DopR via distinct neural circuits. *Neuron* 64, 522–536.

Lecompte, M., Cattaert, D., Vincent, A., Birman, S., and Chérif-Zahar, B. (2019). The *Drosophila* ammonium transporter Rh50 is required for integrity of larval muscles and neuromuscular system. *J. Comp. Neurol. In press*.

Ledonne, A., and Mercuri, N.B. (2017). Current concepts on the physiopathological relevance of dopaminergic receptors. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 27.

Lee, G., Kikuno, K., Bahn, J.-H., Kim, K.-M., and Park, J.H. (2013). Dopamine D2 receptor as a cellular component controlling nocturnal hyperactivities in *Drosophila melanogaster*. *Chronobiol. Int.* 30, 443–459.

Lees, A.J., Hardy, J., and Revesz, T. (2009). Parkinson's disease. *Lancet* 373, 2055–2066.

Lesch, M., and Nyhan, W.L. (1964). A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function. *Am. J. Med.* 36, 561–570.

Levine, R.A., and Taylor, M.W. (1982). Mechanism of adenine toxicity in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 149, 923–930.

Lewers, J.C., Ceballos-Picot, I., Shirley, T.L., Mockel, L., Egami, K., and Jinnah, H.A. (2008). Consequences of impaired purine recycling in dopaminergic neurons. *Neuroscience* 152, 761–772.

Lima, S.Q., and Miesenböck, G. (2005). Remote control of behavior through genetically targeted photostimulation of neurons. *Cell* 121, 141–152.

Lindberg, D., Andres-Beck, L., Jia, Y.-F., Kang, S., and Choi, D.-S. (2018). Purinergic signaling in neuron-astrocyte interactions, circadian rhythms, and alcohol use disorder. *Front. Physiol.* 9, 9.

Liu, C., Plaçais, P.-Y., Yamagata, N., Pfeiffer, B.D., Aso, Y., Friedrich, A.B., Siwanowicz, I., Rubin, G.M., Preat, T., and Tanimoto, H. (2012a). A subset of dopamine neurons signals reward for odour memory in *Drosophila*. *Nature* 488, 512–516.

Liu, J., Li, C., Yu, Z., Huang, P., Wu, H., Wei, C., Zhu, N., Shen, Y., Chen, Y., Zhang, B., et al. (2012b). Efficient and specific modifications of the *Drosophila* genome by means of an easy TALEN strategy. *J. Genet. Genomics* 39, 209–215.

Liu, T., Darteville, L., Yuan, C., Wei, H., Wang, Y., Ferveur, J.-F., and Guo, A. (2008). Increased dopamine level enhances male-male courtship in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 28, 5539–5546.

Lloyd, K.G., Hornykiewicz, O., Davidson, L., Shannak, K., Farley, I., Goldstein, M., Shibuya, M., Kelley, W.N., and Fox, I.H. (1981). Biochemical evidence of dysfunction of

Références bibliographiques

brain neurotransmitters in the Lesch-Nyhan syndrome. *N. Engl. J. Med.* **305**, 1106–1111.

Lommen, E.J.P., Vogels, G.D., Zee, S.P.M.V.D., Trijbels, J.M.F., and Schretlen, E.D.A.M. (1971). Concentration of purine nucleotides in erythrocytes of patients with the Lesch-Nyhan syndrome before and during oral administration of adenine. *Acta Paediatr.* **60**, 642–646.

Long, X., Colonell, J., Wong, A.M., Singer, R.H., and Lionnet, T. (2017). Quantitative mRNA imaging throughout the entire *Drosophila* brain. *Nat. Methods* **14**, 703–706.

Ma, Z., Stork, T., Bergles, D.E., and Freeman, M.R. (2016). Neuromodulators signal through astrocytes to alter neural circuit activity and behaviour. *Nature* **539**, 428–432.

Machado, J., Abdulla, P., Hanna, W.J.B., Hilliker, A.J., and Coe, I.R. (2007). Genomic analysis of nucleoside transporters in *Diptera* and functional characterization of *DmENT2*, a *Drosophila* equilibrative nucleoside transporter. *Physiol. Genomics* **28**, 337–347.

Madeo, A., Di Rocco, M., Brassier, A., Bahi-Buisson, N., De Lonlay, P., and Ceballos-Picot, I. (2019). Clinical, biochemical and genetic characteristics of a cohort of 101 French and Italian patients with HPRT deficiency. *Mol. Genet. Metab.* **127**, 147–157.

Malmanche, N., and Clark, D.V. (2004). *Drosophila melanogaster* Prat, a purine de novo synthesis gene, has a pleiotropic maternal-effect phenotype. *Genetics* **168**, 2011–2023.

Mao, Z., and Davis, R.L. (2009). Eight different types of dopaminergic neurons innervate the *Drosophila* mushroom body neuropil: anatomical and physiological heterogeneity. *Front. Neural Circuits* **3**, 5.

Marella, S., Mann, K., and Scott, K. (2012). Dopaminergic modulation of sucrose acceptance behavior in *Drosophila*. *Neuron* **73**, 941–950.

Marques, N.F., Massari, C.M., and Tasca, C.I. (2018). Guanosine protects striatal slices against 6-OHDA-induced oxidative damage, mitochondrial dysfunction, and ATP depletion. *Neurotox. Res.* **35**, 475–483.

Marra, G., Vercelloni, P.G., Edefonti, A., Manzoni, G., Pavesi, M.A., Fogazzi, G.B., Garigali, G., Mockel, L., and Picot, I.C. (2012). Adenine phosphoribosyltransferase deficiency: an underdiagnosed cause of lithiasis and renal failure. *JIMD Rep.* **5**, 45–48.

Marsac, R., Pinson, B., Saint-Marc, C., Olmedo, M., Artal-Sanz, M., Daignan-Fornier, B., and Gomes, J.-E. (2019). Purine homeostasis is necessary for developmental timing, germline maintenance and muscle integrity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **211**, 1297–1313.

- Martin, C.A., and Krantz, D.E. (2014). *Drosophila melanogaster* as a genetic model system to study neurotransmitter transporters. *Neurochem. Int.* **73**, 71–88.
- Masino, S.A., Kawamura, M., and Ruskin, D.N. (2014). Adenosine receptors and epilepsy: current evidence and future potential. *Int. Rev. Neurobiol.* **119**, 233–255.
- Matthews, W.S., Solan, A., Barabas, G., and Robey, K. (1999). Cognitive functioning in Lesch-Nyhan syndrome: a 4-year follow-up study. *Dev. Med. Child Neurol.* **41**, 260–262.
- McClung, C., and Hirsh, J. (1998). Stereotypic behavioral responses to free-base cocaine and the development of behavioral sensitization in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **8**, 109–112.
- McCreanor, G.M., and Harkness, R.A. (1995). Lesch-Nyhan syndrome and its pathogenesis: normal nicotinamide-adenine dinucleotide but reduced ATP concentrations that correlate with reduced poly (ADP-ribose) synthetase activity in HPRT-deficient lymphoblasts. *J. Inherit. Metab. Dis.* **18**, 737–747.
- McCreanor, G.M., Harkness, R.A., and Watts, R.W.E. (1987). Reduced concentrations of purine nucleotides in hypoxanthine phosphoribosyltransferase-deficient human lymphoblasts. *Biochem. Soc. Trans.* **15**, 555–556.
- McFarland, N.R., Burdett, T., Desjardins, C.A., Frosch, M.P., and Schwarzschild, M.A. (2013). Postmortem brain levels of urate and precursors in Parkinson’s disease and related disorders. *Neurodegener. Dis.* **12**, 189–198.
- McGuire, S.E., Le, P.T., Osborn, A.J., Matsumoto, K., and Davis, R.L. (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* **302**, 1765–1768.
- McGurk, L., Berson, A., and Bonini, N.M. (2015). *Drosophila* as an *in vivo* model for human neurodegenerative disease. *Genetics* **201**, 377–402.
- McManaman, J., and Tam, D.A. (1999). Gabapentin for self-injurious behavior in Lesch-Nyhan syndrome. *Pediatr. Neurol.* **20**, 381–382.
- Meek, S., Thomson, A.J., Sutherland, L., Sharp, M.G.F., Thomson, J., Bishop, V., Meddle, S.L., Gloaguen, Y., Weidt, S., Singh-Dolt, K., et al. (2016). Reduced levels of dopamine and altered metabolism in brains of HPRT knock-out rats: a new rodent model of Lesch-Nyhan Disease. *Sci. Rep.* **6**, 25592.
- Meissner, G.W., Nern, A., Singer, R.H., Wong, A.M., Malkesman, O., and Long, X. (2019). Mapping neurotransmitter identity in the whole-mount *Drosophila* brain using multiplex high-throughput fluorescence *in situ* hybridization. *Genetics* **211**, 473–482.

Références bibliographiques

- Miller, S., and Collins, J.M. (1973). Metabolic purine pathways in the developing ovary of the housefly, *Musca domestica*. *Comp. Biochem. Physiol.* **44B**, 1153–1163.
- Miñana, M.D., Portolés, M., Jordá, A., and Grisolia, S. (1984). Lesch-Nyhan syndrome, caffeine model: increase of purine and pyrimidine enzymes in rat brain. *J. Neurochem.* **43**, 1556–1560.
- Mishra, A., Singh, S., and Shukla, S. (2018). Physiological and functional basis of dopamine receptors and their role in neurogenesis: possible implication for Parkinson's disease. *J. Exp. Neurosci* **12**, 1–8.
- Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., and Caron, M.G. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* **78**, 189–225.
- Miyazaki, I., Asanuma, M., Diaz-Corrales, F.J., Miyoshi, K., and Ogawa, N. (2004). Direct evidence for expression of dopamine receptors in astrocytes from basal ganglia. *Brain Res.* **1029**, 120–123.
- Mizuno, T. (1986). Long-term follow-up of ten patients with Lesch-Nyhan syndrome. *Neuropediatrics* **17**, 158–161.
- Moffatt, B.A., and Ashihara, H. (2002). Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. *The Arabidopsis Book* **1**, e0018.
- Mohr, S.E. (2014). RNAi screening in *Drosophila* cells and *in vivo*. *Methods* **68**, 82–88.
- Morgan, B.A., Johnson, W.A., and Hirsh, J. (1986). Regulated splicing produces different forms of dopa decarboxylase in the central nervous system and hypoderm of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* **5**, 3335.
- Moyer, J.D., and Henderson, J.F. (1983). Salvage of circulating hypoxanthine by tissues of the mouse. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* **61**, 1153–1157.
- Mustard, J.A., Beggs, K.T., and Mercer, A.R. (2005). Molecular biology of the invertebrate dopamine receptors. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **59**, 103–117.
- Nagatsu, T., and Sawada, M. (2009). L-dopa therapy for Parkinson's disease: past, present, and future. *Parkinsonism. Relat. Disord.* **15**, S3–S8.
- Nagatsu, T., Levitt, M., and Udenfriend, S. (1964). Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **239**, 2910–2917.
- Nall, A.H., Shakhmantsir, I., Cichewicz, K., Birman, S., Hirsh, J., and Sehgal, A. (2016). Caffeine promotes wakefulness via dopamine signaling in *Drosophila*. *Sci. Rep.* **6**, 20938.

- Nässel, D.R., and Elekes, K. (1992). Aminergic neurons in the brain of blowflies and *Drosophila*: dopamine- and tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons and their relationship with putative histaminergic neurons. *Cell Tissue Res.* 267, 147–167.
- Navarro, G., Borroto-Escuela, D.O., Fuxe, K., and Franco, R. (2015). Purinergic signaling in Parkinson's disease. Relevance for treatment. *Neuropharmacology* 104, 161–168.
- Nazario, L.R., da Silva, R.S., and Bonan, C.D. (2017). Targeting adenosine signaling in Parkinson's disease: from pharmacological to non-pharmacological approaches. *Front. Neurosci.* 11, 658.
- Neckameyer, W.S., and Quinn, W.G. (1989). Isolation and characterization of the gene for *Drosophila* tyrosine hydroxylase. *Neuron* 2, 1167–1175.
- Newcombe, D.S., Shapiro, S.L., Sheppard, G.L., and Dreifuss, F.E. (1966). Treatment of X-linked primary hyperuricemia with allopurinol. *JAMA* 198, 315–317.
- Neychev, V.K., and Jinnah, H.A. (2006). Sudden death in Lesch-Nyhan disease. *Dev. Med. Child Neurol.* 48, 923–926.
- Neychev, V.K., and Mitev, V.I. (2004). The biochemical basis of the neurobehavioral abnormalities in the Lesch–Nyhan syndrome: a hypothesis. *Med. Hypotheses* 63, 131–134.
- Nguyen, M.D., and Venton, B.J. (2015). Fast-scan cyclic voltammetry for the characterization of rapid adenosine release. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 13, 47–54.
- Nirenberg, M.J., Chan, J., Pohorille, A., Vaughan, R.A., Uhl, G.R., Kuhar, M.J., and Pickel, V.M. (1997). The dopamine transporter: comparative ultrastructure of dopaminergic axons in limbic and motor compartments of the nucleus accumbens. *J. Neurosci.* 17, 6899–6907.
- Nyhan, W.L. (1997). The recognition of Lesch-Nyhan syndrome as an inborn error of purine metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.* 20, 171–178.
- Nyhan, W.L. (2014). Nucleotide synthesis via salvage pathway. In *ELS*, John Wiley & Sons Ltd, ed. (John Wiley & Sons, Ltd).
- Nyhan, W.L., James, J.A., Teberg, A.J., Sweetman, L., and Nelson, L.G. (1969). A new disorder of purine metabolism with behavioral manifestations. *J. Pediatr.* 74, 20–27.
- Nyhan, W.L., Bakay, B., Connor, J.D., Marks, J.F., and Keele, D.K. (1970). Hemizygous expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in erythrocytes of heterozygotes for the Lesch-Nyhan syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 65, 214–218.

Références bibliographiques

- Nyhan, W.L., Johnson, H.G., Kaufman, I.A., and Jones, K.L. (1980). Serotonergic approaches to the modification of behavior in the Lesch-Nyhan syndrome. *Appl. Res. Ment. Retard.* *1*, 25–40.
- Nyhan, W.L., O'Neill, J.P., Jinnah, H.A., and Harris, J.C. (2000). Lesch-Nyhan syndrome. In *GeneReviews*, M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J. Bean, K. Stephens, and A. Amemiya, eds. (University of Washington, Seattle).
- Obata, F., and Miura, M. (2015). Enhancing S-adenosyl-methionine catabolism extends *Drosophila* lifespan. *Nat. Commun.* *6*, 8332.
- O'Donnell, A.F., Tiong, S., Nash, D., and Clark, D.V. (2000). The *Drosophila melanogaster* *ade5* gene encodes a bifunctional enzyme for two steps in the de novo purine synthesis pathway. *Genetics* *154*, 1239–1253.
- Ogasawara, N., Stout, J.T., Goto, H., Sonta, S., Matsumoto, A., and Caskey, C.T. (1989). Molecular analysis of a female Lesch-Nyhan patient. *J. Clin. Invest.* *84*, 1024–1027.
- Ogawa, A., Watanabe, K., and Minejima, N. (1985). Renal xanthine stone in Lesch-Nyhan syndrome treated with allopurinol. *Urology* *26*, 56–58.
- Okada, M., Mizuno, K., and Kaneko, S. (1996). Adenosine A1 and A2 receptors modulate extracellular dopamine levels in rat striatum. *Neurosci. Lett.* *212*, 53–56.
- de Oliveira, G.A.P., Rangel, L.P., Costa, D.C., and Silva, J.L. (2015). Misfolding, aggregation, and disordered segments in c-Abl and p53 in human cancer. *Front. Oncol.* *5*, 97.
- Onali, P., Olanas, M.C., and Bunse, B. (1988). Evidence that adenosine A2 and dopamine autoreceptors antagonistically regulate tyrosine hydroxylase activity in rat striatal synaptosomes. *Brain Res.* *456*, 302–309.
- Ong, C., Yung, L.-Y.L., Cai, Y., Bay, B.-H., and Baeg, G.-H. (2015). *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. *Nanotoxicology* *9*, 396–403.
- Ono, Y., Nakatani, T., Sakamoto, Y., Mizuhara, E., Minaki, Y., Kumai, M., Hamaguchi, A., Nishimura, M., Inoue, Y., Hayashi, H., et al. (2007). Differences in neurogenic potential in floor plate cells along an anteroposterior location: midbrain dopaminergic neurons originate from mesencephalic floor plate cells. *Development* *134*, 3213–3225.
- Oriel, C., and Lasko, P. (2018). Recent developments in using *Drosophila* as a model for human genetic disease. *Int. J. Mol. Sci.* *19*, 2041.
- Ou, J., He, Y., Xiao, X., Yu, T.-M., Chen, C., Gao, Z., and Ho, M.S. (2014). Glial cells in neuronal development: recent advances and insights from *Drosophila melanogaster*. *Neurosci. Bull.* *30*, 584–594.

- Ozeir, M., Huyet, J., Burgevin, M.-C., Pinson, B., Chesney, F., Remy, J.-M., Siddiqi, A.R., Lupoli, R., Pinon, G., Saint-Marc, C., et al. (2019). Structural basis for substrate selectivity and nucleophilic substitution mechanisms in human adenine phosphoribosyltransferase catalyzed reaction. *J. Biol. Chem.* **294**, 11980–11991.
- Page, T., Bakay, B., Nissinen, E., and Nyhan, W.L. (1981). Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase variants: correlation of clinical phenotype with enzyme activity. *J. Inherit. Metab. Dis.* **4**, 203–206.
- Papanikolopoulou, K., Mudher, A., and Skoulakis, E. (2019). An assessment of the translational relevance of *Drosophila* in drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **14**, 303–313.
- Parker, L., Padilla, M., Du, Y., Dong, K., and Tanouye, M.A. (2011a). *Drosophila* as a model for epilepsy: bss is a gain-of-function mutation in the para sodium channel gene that leads to seizures. *Genetics* **187**, 523–534.
- Parker, L., Howlett, I.C., Rusan, Z.M., and Tanouye, M.A. (2011b). Seizure and epilepsy: studies of seizure disorders in *Drosophila*. *Int. Rev. Neurobiol.* **99**, 1–21.
- Pastor-Anglada, M., and Pérez-Torras, S. (2018). Emerging roles of nucleoside transporters. *Front. Pharmacol.* **9**, 606.
- Patel, P.I., Framson, P.E., Caskey, C.T., and Chinault, A.C. (1986). Fine structure of the human hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 393–403.
- Paul, K.R., Molliex, A., Cascarina, S., Boncella, A.E., Taylor, J.P., and Ross, E.D. (2017). Effects of mutations on the aggregation propensity of the human prion-like protein hnRNPA2B1. *Mol. Cell. Biol.* **37**, pii: e00652-16.
- Pech, U., Pooryasin, A., Birman, S., and Fiala, A. (2013). Localization of the contacts between Kenyon cells and aminergic neurons in the *Drosophila melanogaster* brain using splitGFP reconstitution: splitGFP in *Drosophila* mushroom bodies. *J. Comp. Neurol.* **521**, 3992–4026.
- Pedley, A.M., and Benkovic, S.J. (2017). A new view into the regulation of purine metabolism: the purinosome. *Trends Biochem. Sci.* **42**, 141–154.
- Pelled, D., Sperling, O., and Zoref-Shani, E. (1999). Abnormal purine and pyrimidine nucleotide content in primary astroglia cultures from hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase-deficient transgenic mice. *J. Neurochem.* **72**, 1139–1145.
- Perrimon, N., Bonini, N.M., and Dhillon, P. (2016). Fruit flies on the front line: the translational impact of *Drosophila*. *Dis. Model. Mech.* **9**, 229–231.

Références bibliographiques

- Petru, L., Pavelcova, K., Sebesta, I., and Stiburkova, B. (2016). Genetic background of uric acid metabolism in a patient with severe chronic tophaceous gout. *Clin. Chim. Acta* 460, 46–49.
- Phillips, P.E.M., and Stamford, J.A. (2000). Differential recruitment of N-, P- and Q-type voltage-operated calcium channels in striatal dopamine release evoked by ‘regular’ and ‘burst’ firing. *Brain Res.* 884, 139–146.
- Piedimonte, F., Andreani, J.C., Piedimonte, L., Micheli, F., Graff, P., and Bacaro, V. (2015). Remarkable clinical improvement with bilateral globus pallidus internus deep brain stimulation in a case of Lesch–Nyhan disease: five-year follow-up. *Neuromodulation* 18, 118–122.
- Pinna, A., Serra, M., Morelli, M., and Simola, N. (2018). Role of adenosine A2A receptors in motor control: relevance to Parkinson’s disease and dyskinesia. *J. Neural Transm.* 125, 1273–1286.
- Pinson, B., Ceschin, J., Saint-Marc, C., and Daignan-Fornier, B. (2019). Dual control of NAD⁺ synthesis by purine metabolites in yeast. *Elife* 8, e43808.
- Pinto, C.S., and Seifert, R. (2006). Decreased GTP-stimulated adenylyl cyclase activity in HPRT-deficient human and mouse fibroblast and rat B103 neuroblastoma cell membranes. *J. Neurochem.* 96, 454–459.
- Pitmon, E., Stephens, G., Parkhurst, S.J., Wolf, F.W., Kehne, G., Taylor, M., and Lebestky, T. (2016). The D1 family dopamine receptor, DopR, potentiates hind leg grooming behavior in *Drosophila*. *Genes Brain Behav.* 15, 327–334.
- Plaçaïs, P.-Y., Trannoy, S., Isabel, G., Aso, Y., Siwanowicz, I., Belliart-Guérin, G., Vernier, P., Birman, S., Tanimoto, H., and Preat, T. (2012). Slow oscillations in two pairs of dopaminergic neurons gate long-term memory formation in *Drosophila*. *Nat. Neurosci.* 15, 592–599.
- Podgorska, M., Kocbuch, K., and Pawelczyk, T. (2005). Recent advances in studies on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters. *Acta Biochim. Pol.* 52, 749–758.
- Popoli, P., Blum, D., Martire, A., Ledent, C., Ceruti, S., and Abbracchio, M.P. (2007). Functions, dysfunctions and possible therapeutic relevance of adenosine A2A receptors in Huntington’s disease. *Prog. Neurobiol.* 81, 331–348.
- Porkka-Heiskanen, T., Strecker, R.E., Thakkar, M., Bjorkum, A.A., Greene, R.W., and McCarley, R.W. (1997). Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. *Science* 276, 1265–1268.

- Pörzgen, P., Park, S.K., Hirsh, J., Sonders, M.S., and Amara, S.G. (2001). The antidepressant-sensitive dopamine transporter in *Drosophila melanogaster*: a primordial carrier for catecholamines. *Mol. Pharmacol.* 59, 83–95.
- Pozzi, M., Piccinini, L., Gallo, M., Motta, F., Radice, S., and Clementi, E. (2014). Treatment of motor and behavioural symptoms in three Lesch-Nyhan patients with intrathecal baclofen. *Orphanet J. Rare Dis.* 9, 208.
- Puig, J.G., and Torres, R.J. (2010). Orphanet: Syndrome de Lesch Nyhan. https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=510.
- Puig, J.G., Torres, R.J., Mateos, F.A., Ramos, T.H., Arcas, J.M., Buño, A.S., and O'Neill, P. (2001). The spectrum of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency. Clinical experience based on 22 patients from 18 Spanish families. *Medicine (Baltimore)* 80, 102–112.
- Qi, C., and Lee, D. (2014). Pre- and postsynaptic role of dopamine D2 receptor DD2R in *Drosophila* olfactory associative learning. *Biology (Basel)* 3, 831–845.
- Quarta, D., Borycz, J., Solinas, M., Patkar, K., Hockemeyer, J., Ciruela, F., Lluís, C., Franco, R., Woods, A.S., Goldberg, S.R., et al. (2004). Adenosine receptor-mediated modulation of dopamine release in the nucleus accumbens depends on glutamate neurotransmission and N-methyl-D-aspartate receptor stimulation. *J. Neurochem.* 91, 873–880.
- Quinn, W.G., Harris, W.A., and Benzer, S. (1974). Conditioned behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 708–712.
- Raivio, K.O., and Seegmiller, J.E. (1973). Role of glutamine in purine synthesis and in guanine nucleotide formation in normal fibroblasts and in fibroblasts deficient in hypoxanthine phosphoribosyltransferase activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 299, 283–292.
- Rathbone, M.P., Middlemiss, P.J., Gysbers, J.W., Andrew, C., Herman, M.A.R., Reed, J.K., Ciccarelli, R., Di Iorio, P., and Caciagli, F. (1999). Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog. Neurobiol.* 59, 663–690.
- Reem, G.H. (1975). Phosphoribosylpyrophosphate overproduction, a new metabolic abnormality in the Lesch Nyhan syndrome. *Science* 190, 1098–1099.
- Reiter, L.T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., and Bier, E. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* 11, 1114–1125.

Références bibliographiques

Remy, C.N., Remy, W.T., and Buchanan, J.M. (1955). Biosynthesis of the purines: VIII. Enzymatic synthesis and utilization of α -5-phosphoribosylpyrophosphate. *J. Biol. Chem.* **217**, 885–896.

Reyhani-Rad, S., and Mahmoudi, J. (2016). Effect of adenosine A2A receptor antagonists on motor disorders induced by 6-hydroxydopamine in rat. *Acta Cir. Bras.* **31**, 133–137.

Reynolds, E.R. (2018). Shortened lifespan and other age-related defects in bang sensitive mutants of *Drosophila melanogaster*. *G3 (Bethesda)* **8**, 3953–3960.

Riemensperger, T., Isabel, G., Coulom, H., Neuser, K., Seugnet, L., Kume, K., Iche-Torres, M., Cassar, M., Strauss, R., Preat, T., et al. (2011). Behavioral consequences of dopamine deficiency in the *Drosophila* central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 834–839.

Riemensperger, T., Issa, A.-R., Pech, U., Coulom, H., Nguyễn, M.-V., Cassar, M., Jacquet, M., Fiala, A., and Birman, S. (2013). A single dopamine pathway underlies progressive locomotor deficits in a *Drosophila* model of Parkinson disease. *Cell. Rep.* **5**, 952–960.

Rinat, C., Zoref-Shani, E., Ben-Neriah, Z., Bromberg, Y., Becker-Cohen, R., Feinstein, S., Sperling, O., and Frishberg, Y. (2006). Molecular, biochemical, and genetic characterization of a female patient with Lesch-Nyhan disease. *Mol. Genet. Metab.* **87**, 249–252.

Rival, T., Soustelle, L., Strambi, C., Besson, M.-T., Iché, M., and Birman, S. (2004). Decreasing glutamate buffering capacity triggers oxidative stress and neuropil degeneration in the *Drosophila* brain. *Curr. Biol.* **14**, 599–605.

Robey, K.L., Reck, J.F., Giacomini, K.D., Barabas, G., and Eddey, G.E. (2003). Modes and patterns of self-mutilation in persons with Lesch-Nyhan disease. *Dev. Med. Child Neurol.* **45**, 167–171.

Rockson, S., Stone, R., Van der Weyden, M., and Kelley, W.N. (1974). Lesch-Nyhan syndrome: evidence for abnormal adrenergic function. *Science* **186**, 934–935.

Roeder, T. (2005). Tyramine and octopamine: ruling behavior and metabolism. *Annu. Rev. Entomol.* **50**, 447–477.

Rosenbloom, F.M., Kelley, W.N., Miller, J., Henderson, J.F., and Seegmiller, J.E. (1967). Inherited disorder of purine metabolism. Correlation between central nervous system dysfunction and biochemical defects. *JAMA* **202**, 175–177.

Rosenbloom, F.M., Henderson, J.F., Caldwell, I.C., Kelley, W.N., and Seegmiller, J.E. (1968). Biochemical bases of accelerated purine biosynthesis de novo in human fibroblasts lacking hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **243**, 1166–1173.

- Roshan, M.H.K., Tambo, A., and Pace, N.P. (2016). Potential role of caffeine in the treatment of Parkinson's disease. *Open Neurol. J.* 10, 42–58.
- Ross, A.E., and Venton, B.J. (2015). Adenosine transiently modulates stimulated dopamine release in the caudate-putamen via A1 receptors. *J. Neurochem.* 132, 51–60.
- Rothenfluh, A., and Heberlein, U. (2002). Drugs, flies, and videotape: the effects of ethanol and cocaine on *Drosophila* locomotion. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 639–645.
- Sachdeva, S., and Gupta, M. (2013). Adenosine and its receptors as therapeutic targets: an overview. *Saudi Pharm. J.* 21, 245–253.
- Saito, Y., and Takashima, S. (2000). Neurotransmitter changes in the pathophysiology of Lesch–Nyhan syndrome. *Brain Dev.* 22, S122–S131.
- Saito, Y., Ito, M., Hanaoka, S., Ohama, E., Akaboshi, S., and Takashima, S. (1999). Dopamine receptor upregulation in Lesch-Nyhan syndrome: a postmortem study. *Neuropediatrics* 30, 66–71.
- Sampat, R., Fu, R., Larovere, L.E., Torres, R.J., Ceballos-Picot, I., Fischbach, M., de Kremer, R., Schretlen, D.J., Puig, J.G., and Jinnah, H.A. (2011). Mechanisms for phenotypic variation in Lesch–Nyhan disease and its variants. *Hum. Genet.* 129, 71–78.
- Sankar, N., Machado, J., Abdulla, P., Hilliker, A.J., and Coe, I.R. (2002). Comparative genomic analysis of equilibrative nucleoside transporters suggests conserved protein structure despite limited sequence identity. *Nucleic Acids Res.* 30, 4339–4350.
- Saras, A., and Tanouye, M.A. (2016). Seizure suppression by high temperature via cAMP modulation in *Drosophila*. *G3 (Bethesda)* 6, 3381–3387.
- Sass, J.K., Itabashi, H.H., and Dexter, R.A. (1965). Juvenile gout with brain involvement. *Arch. Neurol.* 13, 639–655.
- Schiffmann, S.N., and Vanderhaeghen, J.-J. (1995). Implications de l'adénosine dans les noyaux de la base : interactions avec le système dopaminergique. *Médecine Sciences* 11, 169–176.
- Schram, K.H. (1998). Urinary nucleosides. *Mass Spectrom. Rev.* 17, 131–251.
- Schretlen, D.J., Harris, J.C., Park, K.S., Jinnah, H.A., and Del Pozo, N.O. (2001). Neurocognitive functioning in Lesch-Nyhan disease and partial hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 7, 805–812.
- Schretlen, D.J., Ward, J., Meyer, S.M., Yun, J., Puig, J.G., Nyhan, W.L., Jinnah, H.A., and Harris, J.C. (2005). Behavioral aspects of Lesch-Nyhan disease and its variants. *Dev. Med. Child Neurol.* 47, 673–677.

Références bibliographiques

Schulman, J.D., Greene, M.L., Fujimoto, W.Y., and Seegmiller, J.E. (1971). Adenine therapy for Lesch-Nyhan syndrome. *Pediatr. Res.* 5, 77–82.

Schulz, A., and Schöneberg, T. (2003). The structural evolution of a P2Y-like G-protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 278, 35531–35541.

Schwarzschild, M.A., Ascherio, A., Beal, M.F., Cudkowicz, M.E., Curhan, G.C., Hare, J.M., Hooper, D.C., Kieburtz, K.D., Macklin, E.A., Oakes, D., et al. (2014). Inosine to increase serum and cerebrospinal fluid urate in Parkinson disease: a randomized clinical trial. *JAMA Neurol.* 71, 141.

Sebesta, I., Krijt, J., Kmoch, S., and Hyanek, J. (1991). Urinary pterins in Lesch-Nyhan syndrome. *Adv. Exp. Med. Biol.* 309B, 261–264.

Seegmiller, J.E., Rosenbloom, F.M., and Kelley, W.N. (1967). Enzyme defect associated with a sex-linked human neurological disorder and excessive purine synthesis. *Science* 155, 1682–1684.

Selcho, M., Pauls, D., Han, K.-A., Stocker, R.F., and Thum, A.S. (2009). The role of dopamine in *Drosophila* larval classical olfactory conditioning. *PLoS One* 4, e5897.

Şentürk, M., and Bellen, H.J. (2018). Genetic strategies to tackle neurological diseases in fruit flies. *Curr. Opin. Neurobiol.* 50, 24–32.

Sepp, K.J., Schulte, J., and Auld, V.J. (2001). Peripheral glia direct axon guidance across the CNS/PNS transition zone. *Dev. Biol.* 238, 47–63.

Seugnet, L., Suzuki, Y., Vine, L., Gottschalk, L., and Shaw, P.J. (2008). D1 receptor activation in the mushroom bodies rescues sleep-loss-induced learning impairments in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 18, 1110–1117.

Seugnet, L., Suzuki, Y., Thimman, M., Donlea, J., Gimbel, S.I., Gottschalk, L., Duntley, S.P., and Shaw, P.J. (2009a). Identifying sleep regulatory genes using a *Drosophila* model of insomnia. *J. Neurosci.* 29, 7148–7157.

Seugnet, L., Galvin, J.E., Suzuki, Y., Gottschalk, L., and Shaw, P.J. (2009b). Persistent short-term memory defects following sleep deprivation in a *Drosophila* model of Parkinson disease. *Sleep* 32, 984–992.

Shaposhnikov, M., Proshkina, E., Shilova, L., Zhavoronkov, A., and Moskalev, A. (2015). Lifespan and stress resistance in *Drosophila* with overexpressed DNA repair genes. *Sci. Rep.* 5, 15299.

Shen, L.-H., Liao, M.-H., and Tseng, Y.-C. (2012). Recent advances in imaging of dopaminergic neurons for evaluation of neuropsychiatric disorders. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 1–14.

- Sheth, S., Brito, R., Mukherjea, D., Rybak, L., and Ramkumar, V. (2014). Adenosine receptors: expression, function and regulation. *Int. J. Mol. Sci.* *15*, 2024–2052.
- Shin-Buehring, Y.S., Osang, M., Wirtz, A., Haas, B., Rahm, P., and Schaub, J. (1980). Prenatal diagnosis of Lesch-Nyhan syndrome and some characteristics of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase and adenine phosphoribosyltransferase in human tissues and cultivated cells. *Pediatr. Res.* *14*, 825–829.
- Shirley, T.L., Lewers, J.C., Egami, K., Majumdar, A., Kelly, M., Ceballos-Picot, I., Seidman, M.M., and Jinnah, H.A. (2007). A human neuronal tissue culture model for Lesch-Nyhan disease. *J. Neurochem.* *101*, 841–853.
- Sidi, Y., and Mitchell, B.S. (1985). Z-nucleotide accumulation in erythrocytes from Lesch-Nyhan patients. *J. Clin. Invest.* *76*, 2416–2419.
- Sikora, P., Pijanowska, M., Majewski, M., Bieniaś, B., Borzęcka, H., and Zajczkowska, M. (2006). Acute renal failure due to bilateral xanthine urolithiasis in a boy with Lesch-Nyhan syndrome. *Pediatr Nephrol* *21*, 1045–1047.
- Silverstein, F.S., Johnston, M.V., Hutchinson, R.J., and Edwards, N.L. (1985). Lesch-Nyhan syndrome: CSF neurotransmitter abnormalities. *Neurology* *35*, 907–911.
- Sinnett, S.E., and Brenman, J.E. (2016). The role of AMPK in *Drosophila melanogaster*. In AMP-Activated Protein Kinase, M.D. Cordero, and B. Viollet, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 389–401.
- Skaper, S.D., and Seegmiller, J.E. (1976). Purine metabolism in thioguanine-resistant glioma cells. *Exp. Cell. Res.* *100*, 415–417.
- Skolnick, P., Marangos, P.J., Goodwin, F.K., Edwards, M., and Paul, S. (1978). Identification of inosine and hypoxanthine as endogenous inhibitors of [3H] diazepam binding in the central nervous system. *Life Sci.* *23*, 1473–1480.
- Smith, D.W., and Friedmann, T. (2000). Characterization of the dopamine defect in primary cultures of dopaminergic neurons from hypoxanthine phosphoribosyltransferase knockout mice. *Mol. Ther.* *1*, 486–491.
- Soliman, A.M., Fathalla, A.M., and Moustafa, A.A. (2018). Adenosine role in brain functions: pathophysiological influence on Parkinson's disease and other brain disorders. *Pharmacol. Rep.* *70*, 661–667.
- Song, J., and Tanouye, M. (2008). From bench to drug: human seizure modeling using *Drosophila*. *Prog. Neurobiol.* *84*, 182–191.

Références bibliographiques

- Sperlágh, B., and Vizi, S. (2011). The role of extracellular adenosine in chemical neurotransmission in the hippocampus and basal ganglia: pharmacological and clinical aspects. *Curr. Top. Med. Chem.* *11*, 1034–1046.
- Sperlágh, B., Heinrich, A., and Csölle, C. (2007). P2 receptor-mediated modulation of neurotransmitter release—an update. *Purinergic Signal.* *3*, 269–284.
- Srivastava, D.P., Yu, E.J., Kennedy, K., Chatwin, H., Reale, V., Hamon, M., Smith, T., and Evans, P.D. (2005). Rapid, nongenomic responses to ecdysteroids and catecholamines mediated by a novel *Drosophila* G-protein-coupled receptor. *J. Neurosci.* *25*, 6145–6155.
- St Johnston, D. (2002). The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nat. Rev. Genet.* *3*, 176–188.
- Stenesen, D., Suh, J.M., Seo, J., Yu, K., Lee, K.-S., Kim, J.-S., Min, K.-J., and Graff, J.M. (2013). Dietary adenine controls adult lifespan via adenosine nucleotide biosynthesis and AMPK, and regulates the longevity benefit of caloric restriction. *Cell. Metab.* *17*, 101–112.
- Stokes, A.H., Hastings, T.G., and Vrana, K.E. (1999). Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *J. Neurosci. Res.* *55*, 659–665.
- Stout, J.T., Chen, H.Y., Brennand, J., Caskey, C.T., and Brinster, R.L. (1985). Expression of human HPRT in the central nervous system of transgenic mice. *Nature* *317*, 250–252.
- Strausfeld, N.J., and Hirth, F. (2013). Deep homology of arthropod central complex and vertebrate basal ganglia. *Science* *340*, 157–161.
- Su, Y., Wang, T., Wu, N., Li, D., Fan, X., Xu, Z., Mishra, S.K., and Yang, M. (2019). Alpha-ketoglutarate extends *Drosophila* lifespan by inhibiting mTOR and activating AMPK. *Aging* *11*, 4183–4197.
- Sugamori, K.S., Demchyshyn, L.L., McConkey, F., Forte, M.A., and Niznik, H.B. (1995). A primordial dopamine D1-like adenylyl cyclase-linked receptor from *Drosophila melanogaster* displaying poor affinity for benzazepines. *FEBS Lett.* *362*, 131–138.
- Sulzer, D. (2007). Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* *30*, 244–250.
- Sulzer, D., Cragg, S.J., and Rice, M.E. (2016). Striatal dopamine neurotransmission: regulation of release and uptake. *Basal Ganglia* *6*, 123–148.
- Sun, F., Zeng, J., Jing, M., Zhou, J., Feng, J., Owen, S.F., Luo, Y., Li, F., Wang, H., Yamaguchi, T., et al. (2018a). A genetically encoded fluorescent sensor enables rapid and specific detection of dopamine in flies, fish, and mice. *Cell* *174*, 481–496.

- Sun, J., Xu, A.Q., Giraud, J., Poppinga, H., Riemensperger, T., Fiala, A., and Birman, S. (2018b). Neural control of startle-induced locomotion by the mushroom bodies and associated neurons in *Drosophila*. *Front. Syst. Neurosci.* *12*, 6.
- Surmeier, D.J. (2018). Determinants of dopaminergic neuron loss in Parkinson's disease. *FEBS J.* *285*, 3657–3668.
- Taira, T., Kobayashi, T., and Hori, T. (2003). Disappearance of self-mutilating behavior in a patient with Lesch-Nyhan syndrome after bilateral chronic stimulation of the globus pallidus internus. Case report. *J. Neurosurg.* *98*, 414–416.
- Takano, Y., Hase-Aoki, K., Horiuchi, H., Zhao, L., Kasahara, Y., Kondo, S., and Becker, M.A. (2005). Selectivity of febuxostat, a novel non-purine inhibitor of xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase. *Life Sci.* *76*, 1835–1847.
- Takeda, H., Inazu, M., and Matsumiya, T. (2002). Astroglial dopamine transport is mediated by norepinephrine transporter. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* *366*, 620–623.
- Theodosiou, N.A., and Xu, T. (1998). Use of FLP/FRT system to study *Drosophila* development. *Methods* *14*, 355–365.
- Thibault, S.T., Singer, M.A., Miyazaki, W.Y., Milash, B., Dompe, N.A., Singh, C.M., Buchholz, R., Demsky, M., Fawcett, R., Francis-Lang, H.L., et al. (2004). A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyBac. *Nat. Genet.* *36*, 283–287.
- Tonoki, A., Kuranaga, E., Tomioka, T., Hamazaki, J., Murata, S., Tanaka, K., and Miura, M. (2009). Genetic evidence linking age-dependent attenuation of the 26S proteasome with the aging process. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 1095–1106.
- Torres, R.J., and Puig, J.G. (2007). Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome. *Orphanet J. Rare Dis.* *2*, 48.
- Torres, R.J., and Puig, J.G. (2015). Hypoxanthine deregulates genes involved in early neuronal development. Implications in Lesch-Nyhan disease pathogenesis. *J. Inherit. Metab. Dis.* *38*, 1109–1118.
- Torres, R.J., Deantonio, I., Prior, C., and Puig, J.G. (2004). Adenosine transport in peripheral blood lymphocytes from Lesch-Nyhan patients. *Biochem. J.* *377*, 733–739.
- Torres, R.J., Prior, C., and Puig, J.G. (2007). Efficacy and safety of allopurinol in patients with hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency. *Metabolism* *56*, 1179–1186.

Références bibliographiques

- Townsend, M.H., Felsted, A.M., Burrup, W., Robison, R.A., and O'Neill, K.L. (2018a). Examination of hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase as a biomarker for colorectal cancer patients. *Molecular & Cellular Oncology* 5, e1481810.
- Townsend, M.H., Robison, R.A., and O'Neill, K.L. (2018b). A review of HPRT and its emerging role in cancer. *Med. Oncol.* 35, 89.
- True, J.R., Yeh, S.-D., Hovemann, B.T., Kemme, T., Meinertzhagen, I.A., Edwards, T.N., Liou, S.-R., Han, Q., and Li, J. (2005). *Drosophila* tan encodes a novel hydrolase required in pigmentation and vision. *PLoS Genet.* 1, e63.
- Tschirner, S.K., Gutzki, F., Kaefer, V., Seifert, R., and Schneider, E.H. (2015). Altered histamine neurotransmission in HPRT-deficient mice. *Neurosci. Lett.* 609, 74–80.
- Tschirner, S.K., Gutzki, F., Schneider, E.H., Seifert, R., and Kaefer, V. (2016). Neurotransmitter and their metabolite concentrations in different areas of the HPRT knockout mouse brain. *J. Neurol. Sci.* 365, 169–174.
- Ueno, T., Tomita, J., Tanimoto, H., Endo, K., Ito, K., Kume, S., and Kume, K. (2012). Identification of a dopamine pathway that regulates sleep and arousal in *Drosophila*. *Nat. Neurosci.* 15, 1516–1523.
- Ugur, B., Chen, K., and Bellen, H.J. (2016). *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases. *Dis. Model. Mech.* 9, 235–244.
- Uhl, G.R. (2003). Dopamine transporter: basic science and human variation of a key molecule for dopaminergic function, locomotion, and parkinsonism. *Mov. Disord.* 18, S71–S80.
- Ulrich, H., Abbracchio, M.P., and Burnstock, G. (2012). Extrinsic purinergic regulation of neural stem/progenitor cells: implications for CNS development and repair. *Stem. Cell. Rev. Rep.* 8, 755–767.
- Vaccaro, A., Issa, A.-R., Seugnet, L., Birman, S., and Klarsfeld, A. (2017). *Drosophila* clock is required in brain pacemaker neurons to prevent premature locomotor aging independently of its circadian function. *PLoS Genet.* 13, e1006507.
- Valzelli, L., Garattini, S., Bernasconi, S., and Sala, A. (1981). Neurochemical correlates of muricidal behavior in rats. *Neuropsychobiology* 7, 172–178.
- Varela-Echavarría, A., Cañedo, L., and Barrera-Saldaña, H.A. (1988). Human uricase loss: an evolutionary gain against disease. In *Cell Function and Disease*, L.E. Cañedo, L.E. Todd, L. Packer, and J. Jaz, eds. (Boston, MA: Springer US), pp. 219–223.
- van Swinderen, B., and Andretic, R. (2011). Dopamine in *Drosophila*: setting arousal thresholds in a miniature brain. *Proc. Biol. Sci.* 278, 906–913.

- Venken, K.J.T., Sarrion-Perdigones, A., Vandeventer, P.J., Abel, N.S., Christiansen, A.E., and Hoffman, K.L. (2016). Genome engineering: *Drosophila melanogaster* and beyond. Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol. 5, 233–267.
- Vickrey, T.L., and Venton, B.J. (2011). *Drosophila* dopamine2-like receptors function as autoreceptors. ACS Chem. Neurosci. 2, 723–729.
- Visser, J.E., Bär, P.R., and Jinnah, H.A. (2000). Lesch–Nyhan disease and the basal ganglia. Brain Res. Rev. 32, 449–475.
- Visser, J.E., Schretlen, D.J., Bloem, B.R., and Jinnah, H.A. (2011). Levodopa is not a useful treatment for Lesch–Nyhan disease. Mov. Disord. 26, 746–749.
- Voelker, R.A., Greenleaf, A.L., Gyurkovics, H., Wisely, G.B., Huang, S.-M., and Searles, L.L. (1984). Frequent imprecise excision among reversions of a P element-caused lethal mutation in *Drosophila*. Genetics 107, 279–294.
- Waddell, S. (2010). Dopamine reveals neural circuit mechanisms of fly memory. Trends Neurosci. 33, 457–464.
- Wallrath, L.L., Burnett, J.B., and Friedman, T.B. (1990). Molecular characterization of the *Drosophila melanogaster* urate oxidase gene, an ecdysone-repressible gene expressed only in the malpighian tubules. Mol. Cell. Biol. 10, 5114–5127.
- Watts, R.W.E. (1985). Defects of tetrahydrobiopterin synthesis and their possible relationship to a disorder of purine metabolism (the Lesch–Nyhan syndrome). Adv. Enzyme Regul. 23, 25–58.
- Watts, R.W., Spellacy, E., Gibbs, D.A., Allsop, J., McKeran, R.O., and Slavin, G.E. (1982). Clinical, post-mortem, biochemical and therapeutic observations on the Lesch–Nyhan syndrome with particular reference to the neurological manifestations. Q. J. Med. 51, 43–78.
- Watts, R.W.E., McKeran, R.O., Brown, E., Andrews, T.M., and Griffiths, M.I. (1974). Clinical and biochemical studies on treatment of Lesch–Nyhan syndrome. Arch. Dis. Child. 49, 693–702.
- Weber, M., Lauterburg, T., Tobler, I., and Burgunder, J.-M. (2004). Circadian patterns of neurotransmitter related gene expression in motor regions of the rat brain. Neurosci. Lett. 358, 17–20.
- Weltha, L., Reemmer, J., and Boison, D. (2019). The role of adenosine in epilepsy. Brain Res. Bull. 151, 46–54.
- White, K.E., Humphrey, D.M., and Hirth, F. (2010). The dopaminergic system in the aging brain of *Drosophila*. Front. Neurosci. 4, 205.

Références bibliographiques

Williams, W.J., and Buchanan, J.M. (1953). Biosynthesis of the purines: V. Conversion of hypoxanthine to inosinic acid by liver enzymes. *J. Biol. Chem.* 203, 583–593.

Wise, A., Tenezaca, L., Fernandez, R.W., Schatoff, E., Flores, J., Ueda, A., Zhong, X., Wu, C.-F., Simon, A.F., and Venkatesh, T. (2015). *Drosophila* mutants of the autism candidate gene *neurobeachin* (*rugose*) exhibit neuro-developmental disorders, aberrant synaptic properties, altered locomotion, and impaired adult social behavior and activity patterns. *J. Neurogenet.* 29, 135–143.

Wong, D.F., Harris, J.C., Naidu, S., Yokoi, F., Marengo, S., Dannals, R.F., Ravert, H.T., Yaster, M., Evans, A., Rousset, O., et al. (1996). Dopamine transporters are markedly reduced in Lesch-Nyhan disease *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 5539–5543.

Wood, A.W., Becker, M.A., and Seegmiller, J.E. (1973). Purine nucleotide synthesis in lymphoblasts cultured from normal subjects and a patient with Lesch-Nyhan syndrome. *Biochem. Genet.* 9, 261–274.

Wright, T.R. (1987). The genetics of biogenic amine metabolism, sclerotization, and melanization in *Drosophila melanogaster*. *Adv. Genet.* 24, 127–222.

Wright, T.R.F., Bewley, G.C., and Sherald, A.F. (1976). The genetics of dopa decarboxylase in *Drosophila melanogaster*. II. Isolation and characterization of dopa-decarboxylase-deficient mutants and their relationship to the α -methyl-dopa-hypersensitive mutants. *Genetics* 84, 287–310.

Wu, C.-L., and Melton, D.W. (1993). Production of a model for Lesch–Nyhan syndrome in hypoxanthine phosphoribosyltransferase–deficient mice. *Nat. Genet.* 3, 235–240.

Wu, M.N., Ho, K., Crocker, A., Yue, Z., Koh, K., and Sehgal, A. (2009). The effects of caffeine on sleep in *Drosophila* require PKA activity, but not the adenosine receptor. *J. Neurosci.* 29, 11029–11037.

Xu, K., Di Luca, D.G., Orrú, M., Xu, Y., Chen, J.-F., and Schwarzschild, M.A. (2016). Neuroprotection by caffeine in the MPTP model of parkinson's disease and its dependence on adenosine A2A receptors. *Neuroscience* 322, 129–137.

Yamagata, N., Ichinose, T., Aso, Y., Plaçais, P.-Y., Friedrich, A.B., Sima, R.J., Preat, T., Rubin, G.M., and Tanimoto, H. (2015). Distinct dopamine neurons mediate reward signals for short- and long-term memories. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 578–583.

Yamagata, N., Hiroi, M., Kondo, S., Abe, A., and Tanimoto, H. (2016). Suppression of dopamine neurons mediates reward. *PLoS Biol.* 14, e1002586.

Yamamoto, S., and Seto, E.S. (2014). Dopamine dynamics and signaling in *Drosophila*: an overview of genes, drugs and behavioral paradigms. *Exp. Anim.* 63, 107–119.

Yamamoto, S., Jaiswal, M., Charng, W.-L., Gambin, T., Karaca, E., Mirzaa, G., Wiszniewski, W., Sandoval, H., Haelterman, N.A., Xiong, B., et al. (2014). A *Drosophila*

genetic resource of mutants to study mechanisms underlying human genetic diseases. *Cell* 159, 200–214.

Yang, R., and Liang, B.T. (2012). Cardiac P2X₄ receptors: targets in ischemia and heart failure? *Circ. Res.* 111, 397–401.

Ye, Y., Xi, W., Peng, Y., Wang, Y., and Guo, A. (2004). Long-term but not short-term blockade of dopamine release in *Drosophila* impairs orientation during flight in a visual attention paradigm. *Eur. J. Neurosci.* 20, 1001–1007.

Yeh, J., Zheng, S., and Howard, B.D. (1998). Impaired differentiation of HPRT-deficient dopaminergic neurons: a possible mechanism underlying neuronal dysfunction in Lesch-Nyhan syndrome. *J. Neurosci. Res.* 53, 78–85.

Yellman, C., Tao, H., He, B., and Hirsh, J. (1997). Conserved and sexually dimorphic behavioral responses to biogenic amines in decapitated *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 4131–4136.

Yin, S., Zhang, X., Chen, S., Yang, W., Zheng, X., and Zheng, G. (2017). Adenosine A2A receptor gene knockout prevents l-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia by downregulation of striatal GAD67 in 6-OHDA-lesioned Parkinson's mice. *Front. Neurol.* 8, 88.

van der Zee, S.P., Schretlen, E.D., and Monnens, L.A. (1968). Megaloblastic anemia in the Lesch-Nyhan syndrome. *Lancet* 1, 1427.

van der Zee, S.P., Lommen, E.J., Trijbels, J.M., and Schretlen, E.D. (1970). The influence of adenine on the clinical features and purine metabolism in the Lesch-Nyhan syndrome. *Acta Paediatr. Scand.* 59, 259–264.

Zeng, C., Zhang, M., Asico, L.D., Eisner, G.M., and Jose, P.A. (2007). The dopaminergic system in hypertension. *Clin. Sci.* 112, 583–597.

Zhang, K., Guo, J.Z., Peng, Y., Xi, W., and Guo, A. (2007). Dopamine-mushroom body circuit regulates saliency-based decision-making in *Drosophila*. *Science* 316, 1901–1904.

Zhang, S., Yin, Y., Lu, H., and Guo, A. (2008). Increased dopaminergic signaling impairs aversive olfactory memory retention in *Drosophila*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 370, 82–86.

Zhang, Y.Q., Roote, J., Brogna, S., Davis, A.W., Barbash, D.A., Nash, D., and Ashburner, M. (1999). stress sensitive B encodes an adenine nucleotide translocase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 153, 891–903.

Références bibliographiques

Zhang, Y.X., Yamashita, H., Ohshita, T., Sawamoto, N., and Nakamura, S. (1995). ATP increases extracellular dopamine level through stimulation of P2Y purinoceptors in the rat striatum. *Brain Res.* 691, 205–212.

Zhao, H., French, J.B., Fang, Y., and Benkovic, S.J. (2013). The purinosome, a multi-protein complex involved in the de novo biosynthesis of purines in humans. *Chem. Commun.* 49, 4444.

Zoref-Shani, E., Bromberg, Y., Brosh, S., Sidi, Y., and Sperling, O. (1993). Characterization of the alterations in purine nucleotide metabolism in hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase-deficient rat neuroma cell line. *J. Neurochem.* 61, 457–463.

Annexes

1. Communications orales

- Association Lesch-Nyhan Action - Mai 2016, Bordeaux, France : « Étude des mécanismes pathogéniques de la maladie de Lesch-Nyhan en relation avec le système dopaminergique chez un organisme modèle, *Drosophila melanogaster* ».
- Journée de seconde année des doctorants de l'École Doctorale Cerveau, Cognition, Comportement (ED3C) - Avril 2017, Paris, France : « Study of the pathogenic mechanisms of Lesch-Nyhan disease in relation to the dopaminergic system in *Drosophila melanogaster* ».
- Ma thèse en 180 secondes : Finale PSL - Avril 2017, Paris, France : « Étude des mécanismes pathogéniques de la maladie de Lesch-Nyhan en relation avec le système dopaminergique chez un organisme modèle, *Drosophila melanogaster* ».
- Association Lesch-Nyhan Action - Juin 2017, Paris, France : « Étude des mécanismes pathogéniques de la maladie de Lesch-Nyhan en relation avec le système dopaminergique chez un organisme modèle, *Drosophila melanogaster* ».
- Congrès Lesch-Nyhan - Septembre 2017, Gênes, Italie : « Peut-on modéliser la maladie de Lesch-Nyhan chez *Drosophila melanogaster* ? »
- Association Lesch-Nyhan Action - Juin 2018, Paris, France : « Étude des mécanismes pathogéniques de la maladie de Lesch-Nyhan en relation avec le système dopaminergique chez un organisme modèle, *Drosophila melanogaster* ».
- Réunion de la Société Française des Erreurs Innées du Métabolisme (SFEIM) – Juin 2018, Bruxelles, Belgique : « Interaction entre la voie de recyclage des purines et le système dopaminergique chez la drosophile ». **Prix de la meilleure communication orale**
- Présentation au DIF (Droso Ile-de-France) - 4 Décembre 2018, Paris, France : « Towards a model of Lesch-Nyhan disease in *Drosophila* ».
- 20^{ème} Rencontre du Club de Neurobiologie des Invertébrés (CNI) - Mai 2019, Orléans, France : « Interaction between the dopaminergic system and purine metabolism in *Drosophila melanogaster* ».
- Association Lesch-Nyhan Action - Juin 2019, Poitiers, France : « Étude des mécanismes pathogéniques de la maladie de Lesch-Nyhan en relation avec le système dopaminergique chez un organisme modèle, *Drosophila melanogaster* ».

2. Communications affichées (poster)

- 17^{ème} Rencontre du Club de Neurobiologie des Invertébrés (CNI) - Juin 2016, Cassis, France : « Genetic study of a rare metabolic disorder affecting the dopaminergic system in *Drosophila melanogaster* ».
- 30^{ème} French *Drosophila* Meeting - Septembre 2016, Grasse, France : « Genetic study of a rare metabolic disorder affecting the dopaminergic system in *Drosophila melanogaster* ».
- 18^{ème} Rencontre du Club de Neurobiologie des Invertébrés (CNI) - Juin 2017, Dijon, France : « Adenine phosphoribosyltransferase deficiency in *Drosophila* as a potential new model for studying Lesch-Nyhan disease ».
- Dif Day - Juin 2017, Paris, France : « Adenine phosphoribosyltransferase deficiency in *Drosophila* as a potential new model for studying Lesch-Nyhan disease ».
- 19^{ème} Rencontre du Club de Neurobiologie des Invertébrés (CNI) - Mai 2018, Versailles, France : « Interaction between the purine recycling pathway and the dopaminergic system in *Drosophila melanogaster* ».
- Journées Ecole des Neurosciences Paris Ile-de-France - Septembre 2018, Troyes, France : « Interaction between the purine recycling pathway and the dopaminergic system in *Drosophila melanogaster* ».
- Neurofrance - Mai 2019, Marseille, France : « Study of the pathogenic mechanisms of Lesch-Nyhan disease in relation to the dopaminergic system in the *Drosophila* model ».
- Coldspring Harbor *Drosophila* Meeting - Octobre 2019, Coldspring Harbor, USA : « Interactions between dopamine homeostasis and the purine salvage pathway in the *Drosophila* brain ».

3. Formations doctorales

- « Connaître le marché de l'emploi des docteurs » - Octobre 2016, PSL Research University, Paris (7h)
- « S-Biblio » - Novembre 2016, Institut de Formation Doctorale, UPMC, Paris (4h)
- « Gérer sa bibliographie et ses PDF avec Zotero - fonctionnalités de base et avancées » - Décembre 2016, Institut de Formation Doctorale, UPMC, Paris (4h)
- Formation à l'éthique de la recherche et à l'intégrité scientifique - Décembre 2016, PSL Research University (1h)
- « Rédiger sa thèse avec une feuille de style Word - fonctionnalités de base et avancées » - Janvier 2017, Institut de Formation Doctorale, UPMC, Paris (4h)
- « Communication orale et prise de parole en public » pour le concours « Ma Thèse en 180 secondes » - Mars-Avril 2017, PSL Research University, Paris (20,5h)
- Prévention et Secours Civique de Niveau 1 - Novembre 2017, ESPCI, Paris (8h)
- Découvrir et accéder aux métiers de la R&D - Octobre 2018, PSL Research University, Paris (3,5h)

4. Liste de publications annexes en tant que co-auteur

- Cassar, M., Issa, A.-R., Riemensperger, T., Petitgas, C., Rival, T., Coulom, H., Iche-Torres, M., Han, K.-A., and Birman, S. (2015). A dopamine receptor contributes to paraquat-induced neurotoxicity in *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.* 24, 197–212.
- Augé, F., Petitgas, C., Burgevin, M.-C., Mockel, L., Olivier-Bandini, A., Gibert, J.-F., Chesney, F., Curet, O., Daignan-fornier, B., Pinson, B., et al. (2016). Recherche d'une thérapie de la maladie de Lesch-Nyhan : identification de molécules « HPRT-like » issue d'un criblage virtuel et à haut débit. *Archives de pédiatrie* 23, 1080–1081.
- Fernández-Ramos, A.A., Marchetti-Laurent, C., Poindessous, V., Antonio, S., Petitgas, C., Ceballos-Picot, I., Laurent-Puig, P., Bortoli, S., Lorient, M.-A., and Pallet, N. (2017). A comprehensive characterization of the impact of mycophenolic acid on the metabolism of Jurkat T cells. *Sci. Rep.* 7, 1–11.
- Issa, A.-R., Sun, J., Petitgas, C., Mesquita, A., Dulac, A., Robin, M., Mollereau, B., Jenny, A., Chérif-Zahar, B., and Birman, S. (2018). The lysosomal membrane protein LAMP2A promotes autophagic flux and prevents SNCA-induced Parkinson disease-like symptoms in the *Drosophila* brain. *Autophagy* 14, 1898–1910.
- Robin, M., Issa, A.R., Santos, C.C., Napoletano, F., Petitgas, C., Chatelain, G., Ruby, M., Walter, L., Birman, S., Domingos, P.M., et al. (2019). *Drosophila* p53 integrates the antagonism between autophagy and apoptosis in response to stress. *Autophagy* 15, 771–784.

RÉSUMÉ

L'adénine phosphoribosyltransférase (APRT) et l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HGPRT) sont deux enzymes majeures impliquées dans le recyclage des purines chez les Mammifères, une voie métabolique essentielle permettant la récupération des bases puriques dérivées de l'alimentation ou de la dégradation des nucléotides. La voie de sauvetage des purines est en effet moins coûteuse en énergie que la voie de synthèse *de novo* et son dysfonctionnement induit diverses pathologies. En particulier, des mutations héréditaires supprimant l'activité de l'HGPRT sont associées à la maladie de Lesch-Nyhan (MLN), une pathologie infantile rare liée à l'X caractérisée par une hyperuricémie et de graves troubles neurocomportementaux tels que dystonie, spasticité et automutilations. Des études ont montré que les patients présentent une diminution significative des taux de dopamine dans les ganglions de la base, sans que l'on comprenne clairement le lien entre la neurotransmission dopaminergique et l'absence d'activité de l'HGPRT. L'objectif de cette thèse a donc été d'étudier la relation entre le sauvetage des purines et le système dopaminergique chez un organisme modèle, la drosophile, afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la MLN. La drosophile n'a pas d'homologue de l'HGPRT, ce qui suggère que l'homologue de l'APRT, désignée *Aprt*, est l'unique enzyme de recyclage des purines chez cet organisme. Nos travaux montrent que des drosophiles mutantes déficientes en *Aprt* présentent des défauts physiologiques en partie comparables à ceux associés à l'absence d'HGPRT chez l'Homme, notamment un taux élevé d'acide urique ainsi que des altérations des marqueurs dopaminergiques et des troubles neurocomportementaux. À l'inverse, des perturbations génétiques du système dopaminergique induisent une diminution de l'expression et de l'activité de l'*Aprt*. Nos résultats confirment ainsi la conservation d'un lien physiologique entre le recyclage des purines et le système dopaminergique chez la drosophile, et indiquent de plus que cette régulation fait intervenir la signalisation adénosinergique. Ce nouveau modèle pourrait donc s'avérer utile à terme pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques permettant d'améliorer le traitement de cette maladie dramatique.

MOTS CLÉS

Adénine phosphoribosyltransférase (APRT) – Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HGPRT) – Voie de sauvetage des purines – Maladie de Lesch-Nyhan – Système dopaminergique – *Drosophila melanogaster*

ABSTRACT

Adenine phosphoribosyltransferase (APRT) and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) are two major enzymes involved in purine recycling in mammals, an essential metabolic pathway that allows the recovery of free purine bases derived from diet or the degradation of nucleotides. The purine salvage pathway is indeed less energy costly than *de novo* purine synthesis and its dysfunction induces various pathologies. In particular, inherited mutations suppressing HGPRT enzyme activity are associated with Lesch-Nyhan disease (LND), a rare X-linked metabolic and neurophysiological disorder in children, characterized by hyperuricemia and severe neurobehavioural disturbances such as dystonia, spasticity and compulsive self-injury. Studies have shown that LND patients have markedly reduced dopamine levels specifically in the basal ganglia, but the mechanisms linking the lack of HPRT activity and dopaminergic neurotransmission have not been elucidated to date. In this thesis work, we have been studying the relation between purine metabolism and the dopaminergic system in a model organism, *Drosophila*, with the aim to find new clues about the mechanisms involved in LND. No HGPRT homologue is present in the *Drosophila* genome, which suggests that the APRT homologue, named *Aprt*, is the only purine-recycling enzyme in this organism. Our work shows that *Aprt*-deficient flies have defects partly comparable to those associated with HGPRT deficiency in humans, notably an increase in uric acid levels, as well as alterations in dopaminergic markers and neurobehavioural defects. Conversely, genetic disruptions of the dopaminergic system decrease the expression and activity level of *Aprt*. Our results therefore confirm the conservation of a physiological link between purine recycling and the dopaminergic system in *Drosophila*, and further indicate that this regulation requires adenosinergic signaling. This new model could therefore prove valuable to find new therapeutic targets and possibly improve the cure of this dramatic disease.

KEYWORDS

Adenine phosphoribosyltransferase (APRT) – Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) – Purine salvage pathway – Lesch-Nyhan disease – Dopaminergic system – *Drosophila melanogaster*