

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences Biologique et Médicale

Option : Neurosciences et Pharmacologie

présentée et soutenue publiquement le

02 décembre 2009

par

Jonathan Chetrit

né le 25 avril 1983, à Bordeaux

**Les récepteurs dopaminergiques D5 du noyau sous-thalamique :
Implication dans la physiopathologie
de la maladie de Parkinson**

Membres du Jury

Mr. E. Hirsch
Mr. P. Salin
Mr. M. Savasta
Mr. B. Bioulac
Mr. E. Bezard
Mr. A. Benazzouz

Directeur de Recherche CNRS, Paris
Directeur de Recherche CNRS, Marseille
Directeur de Recherche Inserm, Grenoble
Professeur des Universités, Bordeaux
Directeur de Recherche Inserm, Bordeaux
Directeur de Recherche Inserm, Bordeaux

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

à Séverine,

à Lucas et Noah,

*C'est la somme de toi et moi,
C'est de nous deux la preuve par trois
qu'on s'aime et qu'on s'aimera
...quoi qu'il en soit...*

à mes parents,

à mon frère,

à mes sœurs.

à Hamid et Rabia,

*Je vous emprunte une petite phrase qui vous est familière,
« il paraît que le hasard est le nom que Dieu se donne lorsqu'il
ne veut pas être reconnu »
Alors je suis ravi que le hasard se soit montré un 25 novembre
2003, puis un 25 mai 2005 et enfin un 25 avril 2006...*

Merci au hasard pour cette belle rencontre

*Et surtout un grand merci à vous,
Pour m'avoir transmis votre passion,
Pour votre amitié indéfectible, pour votre soutien à toute
épreuve, pour votre générosité
Et pour tout ce qui fait que je vous aime tant...*

L'ensemble de ces travaux a été réalisé au sein du laboratoire « Mouvement Adaptation Cognition » (CNRS UMR 5227) de l'Université Victor Segalen Bordeaux 2.

Je remercie tout d'abord mon Directeur de thèse, **Abdelhamid Benazzouz**. Les mots me manquent pour exprimer tout le plaisir que j'ai eu à travailler sous ta direction. Ton soutien, ton expertise, ta bonne humeur, la confiance que tu me portes, sont autant de preuves qui scellent le respect et l'amitié que j'ai pour toi...

Je remercie le Professeur **Bernard Bioulac** et le Docteur **Jean-René Cazalets**, pour m'avoir successivement accueilli dans leur laboratoire, d'abord nommé 5543 puis 5527...mais nous ayant toujours permis de travailler dans les meilleures conditions, scientifiques et humaines...

Je tiens à remercier le Dr **Etienne Hirsch**, qui me fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Lisez ici ma profonde reconnaissance et toute ma gratitude.

Mes remerciements vont également aux Drs. **Pascal Salin** et **Marc Savasta** pour avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteurs.

Je remercie profondément le Professeur **Bernard Bioulac** et le Docteur **Erwan Bézard** pour avoir consenti à juger cette thèse.

Je vous exprime ici toute ma gratitude pour l'intérêt que vous avez bien consenti à porter à ce travail.

Je tiens également à remercier :

Tout les membres passés, et présents de la « Basal Gang Team », v1.8 ; v2.0...et bientôt v2.1 : **Christian Gross, François Gonon, Thomas Boraud, Philippe De Deurwaerdere, André Garenne, Martin Guthrie, Liliana Garcia, Sandra Dovero, Agnès Nadjar, Pauline Belujon, Cyril Dejan, Benjamin Pasquereau...**

A la BG'Team également, et à nos soirées au « 4'P UMR5227 » perdu dans un bureau Licence IV de la rotule (les initiés me comprendront...) :

Steevy Biroute, et nos longues discussions erotico-métaphysiques-computationnelles lors des déjeuners quotidiens,

Docteur la Fourche, et nos grands concours de dessins artistiques, que ce soit pour des repas de Noël, des soutenances de thèses, des cours de Master dans la bibliothèque de l'UMR...et accessoirement aussi pour ces prescriptions d'Haldol...

P'tit Bonhomme, pause-clope officiel de mes longues heures d'analyses à la plateforme, entourloupeur officiel de soirée « un dernier verre à la maison », photographe officiel de « Bordeaux 2009 », mais aussi mon coup de cœur officiel du Bat-3A,

Rachida Ammari, et nos « déboires » complices de fin de thèse,

Narima Politro, la plus basque de toute les bordelaises et nouvellement parisienne, juste de passage au labo, mais pour toujours avec nous...Muxu

Bérangère Ballion S.A.M., patronne-poche du « 4'P » pour nos « boires » de toute une thèse, nos souvenirs de Clermont-Ferrand, Genève, Washington, Pittsburgh, et surtout de Villenave d'Ornon...et accessoirement aussi pour avoir apporté son expertise de la « structure-vide » au service du papier PLoS et pour son don altruiste à « Handicap International » ...

Sylvia Navailles, tu n'auras pas eu l'occasion de me montrer tes talents de décapsuleuse de bouteilles de Krö, mais tu resteras néanmoins mon modèle « Monique Ranou »...

Claire Ofthetown, *la Ni* de la rotule, *la Tai* du comportement, *la Gao* de l'electrophy., *la PDD* de l'HPLC...bref, la plus sama des étudiantes que j'ai pu encadrer...un grand merci pour tous les services que tu m'as rendus en retour de...de...et bien de rien du tout...c'est pour ça que ça a encore plus de valeur à mes yeux...un grand MERCI...

Aux copains non-BG team, mais « 4'P » 4 ever : **Amandine Ipc, Quentin, Nico, Frédo Dido, Amandine Minni**, et à tout le « **Staff Bordeaux 2009** », avec mention spéciale pour **Delphine**, la plus charmante des secrétaires « non-auditionnée »...

Aux petits nouveaux et aux gens de passages : **Emilie, Rinske, Asier, Cristina, Jonathan**...ce fut court mais charmant...

Et enfin, « last, but not least », **Morin-MPTP** et **Minipouf** (« Minipoop et sa maman Stéphanie Lorin, la dame aux cheveux blancs ») je vous remercie grassement pour tous nos petit moments, partagés ici et là,

d'abord en cours, puis à la paillasse,

en correction de mémoires, puis dans les couloirs,

au « 4'P » évidemment, dans vos « garçonnières » assurément...

aux détours d'un ascenseur, ou dans la pénombre d'une chambre noire, plaisir d'offrir...joie de recevoir...

Et recevoir, j'en ai reçu beaucoup, bien plus que ce que j'en attendais...

MERCI, infiniment, et n'oubliez pas que Mr. Sheffield attend de pied ferme les visites de Sylvia et Grand-mère Yéta (ou encore Sisi et Châtaigne, comme vous voul' voul'...)

Et puis, 1983...4 everrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr...Friendship... 4 everrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr

Stéphanie, souvenirs souvenirs, du premier cours de LP toujours en retard, de ma désillusion de ton affectation avec moi, des premières manip périlleuses à Perrins, de tes troubles de l'équilibre (et pas que...), de tes premiers sacrifices, des préparations pour tes oraux, de tes anticorps « anti-mouse ou anti-souris (?!) »...

Aude, souvenirs souvenirs, de ton arrivée dans mon bureau (je suis un peu ton sauveur, hein ?), de nos rats lésés GP qui ont voulu ta mort (et la mienne...), de tes petites jupes inexistantes, de la « cale sèche »...

Mes remerciements les plus sincères vont également à **Anne Taupignon** et **Jérôme Baufreton**, pour nos collaborations et discussions autour du dît récepteur D5, toujours dans la bonne humeur caractéristique de ces deux habitants du dernier bureau au fond du couloir,

Grandes pensées à tous les squatteurs de la salle d'histo, **Laura** (et ses courses de sac), **Martine** (et ses coups de gueule légendaires), **Marie-Jeanne**, **Frédérique**...

Souvenir mémorable des sons hystérico-mystiques, mais non moins publiés, entendus lors de la journée du labo à Cap Sciences...

Sans oublier, l'équipe de **Marc Landry** du laboratoire INSERM U 862, pour leur « aide radiomarquée » en HIS et en GTP γ S, mais aussi et en particulier un énorme soutien de **Virginie**, et l'amitié sans faille de **Rabia**...

Enfin une pensée pour **Geneviève**, **Elisabeth**, **Marie-Françoise**, **Daniel**, **Nizam**, **Tho-Haï**, **Hugues**, **Jean-Marie**, **Anne** et tous ceux que j'ai oublié de nommés ici, mais qui ont pourtant contribué à ce que tout se passe bien pour moi durant ces trois dernières année...

J'allais oublier, je remercie également la « voix souriante » de la caissière de Casino... «Bonjour, et bienvenu à la caisse express ! Avez-vous un sac cabas ? »...Et bien pour la première fois, je vais répondre oui. Oui, j'ai un sac cabas, et il est plein de bonnes choses. Je l'ai remplis tout au long des ces trois années avec vous tous...Et les souvenirs qu'il renferme, resteront toujours dans mon sac cabas...

MERCI à TOUS

Résumés

Résumé

L'une des caractéristiques électrophysiologiques majeure de la maladie de Parkinson est l'émergence de bouffées de potentiels d'action au niveau du noyau sous-thalamique (NST). Des travaux récents menés *in vitro* ont soulevé l'hypothèse de l'implication des récepteurs dopaminergiques D5 (RD5) dans la genèse de cette activité pathologique.

Nous avons mis en évidence que les RD5, seuls récepteurs D1-like exprimés au niveau du NST, présentent une activité constitutive *in vivo*, et que celle-ci est bloquée par l'injection locale d' α -flupentixol. Le blocage de cette activité intrinsèque d'une part, améliore le comportement locomoteur d'animaux rendu hémiparkinsonien, et d'autre part réduit la tendance des neurones du NST à décharger en bouffées *in vivo* et *in vitro*, signature physiopathologique de la maladie de Parkinson. L'ensemble de ces données souligne le rôle clé des RD5 dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson, ce qui ouvre la voie à de nouvelles approches thérapeutiques...

Outre cette propriété d'agoniste inverse des RD5, l' α -flupentixol est connu pour ses propriétés antipsychotiques en tant qu'antagoniste des RD2. C'est pourquoi lorsqu'il est injecté de façon systémique il induit des troubles moteurs et une catalepsie caractérisés de syndrome extrapyramidaux, même chez les animaux contrôles. Les mécanismes électrophysiologiques qui sous-tendent cet état cataleptique n'ayant jamais été étudié auparavant, nous avons mis en évidence que l'administration, par voie intra-péritonéale, d' α -flupentixol induit des changements drastiques de l'activité électrique au sein du réseau des ganglions de la base. En effet, nous avons observé une augmentation de la fréquence de décharge des neurones du globus pallidus et une diminution de celle-ci au niveau du NST et de la substance noire *pars reticulata*, accompagnée d'une désorganisation de l'activité électrique au niveau de ces deux noyaux. Cette étude offre une vue d'ensemble sur les mécanismes électrophysiologiques à l'origine des effets secondaires extrapyramidaux induits par les antipsychotiques, et souligne le caractère fondamental de la désorganisation de l'activité électrique des ganglions de la base dans les troubles moteurs.

Mots clé : maladie de Parkinson, noyau sous-thalamique, récepteur D5, dopamine, antipsychotiques, syndromes extrapyramidaux.

Abstract

Burst-firing in the subthalamic nucleus (STN) is a hallmark of Parkinson's disease. Previous *in vitro* studies have raised the hypothesis of the involvement of dopamine D5 receptor (D5R) in the genesis of this pathological activity.

Here we have shown that D5R exert a constitutive activity *in vivo*, which can be blocked by local application of α -flupentixol. Blockade of this intrinsic activity improved locomotor behaviour in an animal model of Parkinson's disease and alleviate burst-firing of STN neurons both *in vitro* and *in vivo*. Taken together, these results highlight the key role play by local D5R in the pathophysiology of Parkinson's disease and open the way to new pharmacological treatment of the disease...

In addition to this property D5R inverse agonist, α -flupentixol is known for its antipsychotic properties as a D2R antagonist. Therefore, when injected systemically, it induced motor disturbances and catalepsy characterized as extrapyramidal motor side-effects. The electrophysiological mechanisms underlying this cataleptic state had never been studied before. Here we have demonstrated that the intra-peritoneal administration of α -flupentixol induced dramatic changes in the electrical activity of the basal ganglia network. Indeed, we observed an increase in firing rate of globus pallidus neurons and a decrease in both STN and substantia nigra *pars reticulata*, accompanied by a disorganisation of the electrical activity of these two nuclei. This study provides an overview of the electrophysiological mechanisms underlying extrapyramidal motor side-effects induced by antipsychotics, and stresses the fundamental nature of the disorganisation of the electrical activity in the basal ganglia network as a source of movement disorders.

Key Words: Parkinson's disease, subthalamic nucleus, dopamine D5 receptor, dopamine, antipsychotics, extrapyramidal motor side-effect.

Publications

Publications dans des revues à comité de lecture

Chetrit J., Ballion B., Laquitaine S., Belujon P., Morin S., Taupignon A.I., Bioulac B., Gross C.E. and Benazzouz A.

Involvement of Basal Ganglia Network in Motor Disabilities Induced by Typical Antipsychotics.

Plos One, 2009, 4(7), e6208. doi:10.1371/journal.pone.0006208

Bouali-Benazzouz R., Tai C-H., **Chetrit J.**, and Benazzouz A.

Intrapallidal injection of 6-OHDA induced changes in dopamine innervation and neuronal activity of globus pallidus.

Neuroscience, 2009, 116(2). doi:10.1016/j.neuroscience.2009.07.034

Ballion B., Frenois F., Zold C., **Chetrit J.**, Murer M.G. and Gonon F. D2 receptor stimulation, but not D1, restores striatal equilibrium in a rat model of Parkinsonism. *Neurobiology of Disease*, 2009, 35 376–384. doi:10.1016/j.nbd.2009.05.019

Chetrit J., Taupignon A., Morin S., Bouali-Benazzouz R., Kadiri N., Garret M., Bioulac B., Gross C.E. and Benazzouz A.

Involvement of subthalamic dopamine D5 receptors in Parkinson's disease.

(soumis)

Chetrit J., Morin S., Aristieta A. and Benazzouz A.

Acute versus chronic treatment with haloperidol: neuronal correlates in the subthalamic nucleus.

(en préparation)

Chetrit J., and Benazzouz A.

Dopaminergic control of the subthalamic nucleus. (Revue)

(en préparation)

Communications affichées

Chetrit J., Kadiri N., Belujon P., Bioulac B., Gross C.E., Taupignon A.I. and Benazzouz A.
Involvement of Dopamine D5 Receptor in the Pathophysiology of Parkinson's Disease. 8^{ème} colloque de la Société des Neurosciences, Montpellier, 22-25 Mai 2007.

Chetrit J., Kadiri N., Belujon P., Bioulac B., Gross C.E., Taupignon A.I. and Benazzouz A.
Involvement of Dopamine D5 Receptor in the Pathophysiology of Parkinson's Disease. 2nd Neuroscience Binational Conference France-Israel, Bordeaux, July 2-4 2007.

Taupignon A., Kadiri N., **Chetrit J.**, Tiberi M., Garret M., Benazzouz A. and Baufreton J.
Does the constitutive activity of D5 receptors interfere with firing patterns in the subthalamic nucleus? IBAGS, 2nd - 6th September 2007, Egmond aan Zee, the Netherlands

Taupignon A., Kadiri N., **Chetrit J.**, Baufreton J., Tiberi M., Garret M., Benazzouz A.
Molecules with inverse agonist action on D5 recombinant receptors reduce burst-firing potency of subthalamic neurons in rat brain slices. Dopamine 50 years Goteborg (Sweden) May 30 June 2, 2007

Chetrit J., Bouali-Benazzouz R., Kadiri N., Belujon P., Bioulac B., Gross C.E., Taupignon A.I. and Benazzouz A. *Involvement of Dopamine D5 Receptor in the Pathophysiology and Therapy of Parkinson's Disease*. Rencontre conjointe du Club des Ganglions de la base et du Club des Mouvements anormaux, Croisic, 4-6 Octobre 2007.

Chetrit J., Laquitaine S., Pauline Belujon P., Morin S., Taupignon A.I., Bioulac B., Gross C.E. and Benazzouz A. *Acute administration of flupentixol induces catalepsy with dramatic changes in basal ganglia neuronal activity*. 6th Federation of European Neuroscience Societies' forum, Geneva, July 12-16 2008.

Chetrit J., Ballion B., Laquitaine S., Belujon P., Morin S., Gonon F., Taupignon A., Bioulac B., Gross C.E. and Benazzouz A. *Hypokinesia and catalepsy induced by α -flupentixol are correlated with changes in neuronal activities of the basal ganglia*. 38th annual meeting of the Society for Neuroscience, Washington, DC, USA, November 15-19 2008.

Chetrit J., Taupignon A.I., Morin S., Bouali-Benazzouz R., Kadiri N., Garret M., Bioulac B., Gross C.E. and Benazzouz A. *Constitutive activity of subthalamic dopamine D5 receptors is a potential target for the treatment of Parkinson's disease*. 9^{ème} colloque de la Société des Neurosciences, Bordeaux, 26-29 Mai 2009.

Communications Orales

Implication des récepteurs dopaminergiques D5 dans la physiopathologie et la thérapie de la maladie de Parkinson. Rencontre conjointe du Club des Ganglions de la base et du Club des Mouvements anormaux, Croisic, 4-6 Octobre 2007.

Acute administration of flupentixol induced catalepsy with dramatic changes in basal ganglia neuronal activity. Rencontre conjointe du Club des Ganglions de la base et du Club des Mouvements anormaux, Clermont-Ferrand, 6-8 Juin 2008.

Les récepteurs dopaminergiques D5 du noyau sous-thalamique comme cible thérapeutique dans la maladie de Parkinson. Rencontre conjointe du Club des Ganglions de la base et du Club des Mouvements anormaux, Bordeaux, 25-26 Mai 2009.

Subthalamic nucleus D5 receptors: role in the pathophysiology and therapy of Parkinson's disease. 3rd Mediterranean Conference of Neuroscience. Alexandria Egypt, 16-18 December 2009.

Sommaire

PREAMBULE

INTRODUCTION

I. Maladie de Parkinson.....	24
1. Généralités.....	24
2. Symptômes.....	25
2.1. Troubles moteurs :.....	25
2.2. Troubles non moteurs :.....	26
3. Traitements.....	26
3.1. Traitement pharmacologique : la dopathérapie.....	27
3.2. Traitement chirurgical : stimulation à haute fréquence (SHF) du NST.....	28
II. Les ganglions de la base.....	29
1. Organisation anatomo-fonctionnelle.....	29
2. Le noyau sous-thalamique : plaque tournante des ganglions des la base.....	32
2.1. Considérations anatomiques du NST.....	32
2.2. Considérations fonctionnelles du NST.....	36
III. Le système dopaminergique.....	40
1. Les récepteurs dopaminergiques.....	42
1.1. Structure.....	42
1.2. Voies de Signalisation.....	44
1.3. Pharmacologie.....	47
1.4. Distribution des récepteurs DA au sein des ganglions de la base.....	49
2. Le cas du récepteur D5 : un récepteur constitutivement actif.....	53
2.1. Activité constitutive : Généralités.....	53
2.2. Activité constitutive des récepteurs D5 :.....	59
IV. Ganglions de la base et système dopaminergique : considérations physiopathologiques.....	61
1. Dopamine, noyau sous-thalamique et maladie e Parkinson.....	61
1.1. Modulation dopaminergique physiologique du NST :.....	61
1.2. Modulation dopaminergique physiopathologique du NST :.....	63
2. Dopamine, antipsychotiques et troubles moteurs.....	67
V. Objectif général du projet de recherche.....	69

MATERIEL & METHODES

I. Modèle d'étude.....	72
1. Lésion du système dopaminergique :.....	72
2. Lésion du Globus Pallidus :.....	73
3. Validations histologiques :.....	74
3.1. Vérification de la lésion dopaminergique:.....	74
3.2. Vérification de la lésion du GP :.....	75
4. Implantation de guide canule :.....	76
II. Substances pharmacologiques :.....	77

III. Enregistrements électrophysiologiques :	78
1. Enregistrement extracellulaire unitaire in vivo :	78
1.1. Chirurgie :	78
1.2. Caractéristique des pipettes :	79
1.3. Acquisition des signaux :	80
1.4. Analyse de l'activité neuronale enregistrée :	82
1.5. Validation du site d'enregistrement :	83
1.6. Analyses statistiques :	85
2. Patch-clamp in vitro :	86
2.1. Préparation des tranches :	86
2.2. Caractéristiques des pipettes :	88
2.3. Acquisition des signaux :	88
2.4. Analyses statistiques :	88
IV. Tests comportementaux :	89
1. Evaluation de l'activité motrice globale : actimétrie :	89
2. Evaluation de l'asymétrie : Stepping test :	89
3. Evaluation de la catalepsie : Bar test :	90
V. GTPγS :	90
1. Principe :	90
2. Protocole :	92
VI. Cytochrome Oxydase :	92
1. Principe :	92
2. Protocole :	93
RESULTATS	
I. Implication des récepteurs dopaminergique D5 dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson.	95
1. Résumé	95
2. Article 1 :	98
II. Implication des ganglions de la base dans la manifestation des troubles moteurs induit par les antipsychotiques typiques	120
1. Résumé	120
2. Article 2 :	123
3. Article 3 :	138
III. Publications annexes	158
1. Article 4 :	158
2. Article 5 :	168

CONCLUSION

PERSPECTIVES

BIBLIOGRAPHIE

Préambule

La dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques de la *pars compacta* de la substance noire (SNc) est la caractéristique essentielle de la physiopathologie de la maladie de Parkinson. L'apport original de Ehringer et Hornykiewicz en 1960 montrant la première preuve directe d'une déplétion sévère de dopamine dans le striatum chez les patients parkinsoniens, a défini la scène des champs de recherche sur le rôle de la dopamine dans la régulation de l'activité du striatum en conditions normale et pathologique, pour le demi siècle qui suivit. Les premières études de Hornykiewicz, Carlson et d'autres ont également fourni une solide base pour le développement de la dopathérapie dans le traitement de la maladie de Parkinson (pour revue, Hornykiewicz, 2001, 2002, 2006). Depuis, un nombre important de travaux nous a permis une meilleure compréhension de la régulation des fonctions des ganglions de la base par la dopamine (Campbell et al., 1985; Mintz and Herberg, 1986; Civelli et al., 1993; Nicola et al., 2000; Hassani et al., 1999; Ni et al., 2001a; Ni et al., 2001b).

Les ganglions de la base représentent la cible majeure des neurones dopaminergiques nigro-striés. Cet ensemble de structures sous-corticales traite les informations issues de l'ensemble du cortex cérébral et est impliqué dans le contrôle des comportements moteurs dans les aspects cognitifs, émotionnels et motivationnels du comportement (Graybiel, 2005 ; Mink, 1996). Il comprend un ensemble de structures sous-corticales dont le striatum, les segments interne et externe du globus pallidus (GPi - noyau entopédonculaire chez les rongeurs - et le GPe), la substance réticulée et compacte (SNc et SNr) et le noyau sous-thalamique (NST). On ne peut pas se passer des neurones dopaminergiques dans le contrôle des actes moteurs et des processus cognitifs et leur dysfonctionnement est impliqué dans les syndromes extrapyramidaux (dyskinésies iatrogènes, parkinsonisme) consécutifs à l'utilisation chronique de neuroleptiques, des antagonistes des récepteurs dopaminergiques. Ces évidences cliniques et précliniques ont vraisemblablement contribué à élaborer les

modèles anatomo-fonctionnels des ganglions de la base autour des neurones dopaminergiques (Albin et al., 1989 ; Alexander et Crutcher, 1990 ; DeLong et al., 1990). L'une des avancées majeures a été accomplie à la fin des années 1980 avec l'introduction de la notion de voies "directes et indirectes" dans le modèle des ganglions de la base (Albin et al., 1989) et une répartition différentielle des récepteurs dopaminergiques D1 et D2. Les D1 étant localisés sur les neurones de projection de la voie directe et les D2 sur ceux de la voie indirecte. Le striatum représentait la seule structure d'entrée des ganglions de la base transmettant les informations en provenance du cortex vers les structures de sortie des ganglions de la base via ces deux voies.

De toute évidence, le modèle anatomo-fonctionnel des ganglions de la base représente un schéma simplifié de ce réseau et cette vision réductrice a été examinée et contestée suite à de nombreux travaux réalisés au cours des années 90 (Surmeier and Kitai, 1993; Parent and Hazrati, 1995a, b; Levy et al., 1997; Nadjar et al., 2006). Ce modèle a été malgré tout la pierre angulaire de la recherche actuelle sur les ganglions de la base et a servi d'outil essentiel pour la relance des thérapies neurochirurgicales dans la maladie de Parkinson (Bergman et al., 1990; Benazzouz et al., 1993). Ceci a contribué à offrir une nouvelle place de choix au NST, considéré jusqu'à lors comme un simple relais de la voie indirecte. En effet, depuis une quinzaine d'années maintenant, de part sa position centrale d'un point de vue connectivité et fonctionnalité au niveau des ganglions de la base, le NST est devenu la cible chirurgicale dans la thérapie de la maladie de Parkinson (Limousin et al., 1995 ; Kumar et al., 1998 ; Houeto et al., 2000 ; Krack et al., 2003).

Au sein des ganglions de la base, le striatum est de loin la cible majeure des neurones dopaminergiques de la *pars compacta* de la substance noire (SNc). Bien que complexe et énigmatique, le rôle que joue la dopamine sur la régulation des ganglions de la base via la

modulation de l'activité striatale a été profondément étudié. Au cours des dix dernières années, un certain nombre de travaux ont mis en avant l'influence extrastriatale de la dopamine (pour revue, Smith and Villalba, 2008). Parmi les cibles de la SNc, le NST a été montré recevoir une innervation dopaminergique en provenance de collatérales issues des projections nigro-striées. Les neurones du NST expriment également des récepteurs dopaminergiques (pour revue, Smith and Kieval, 2000; Smith and Villalba, 2008) et des applications locales d'agents dopaminergiques modulent son activité électrophysiologique *in vitro* (Baufreton et al., 2003 ; 2005) *in vivo* (Hassani and Féger, 1999 ; Ni et al., 2001) et altèrent les comportements moteurs (Parry et al., 1994). Le nombre croissant d'arguments expérimentaux en faveur d'un contrôle dopaminergique opérant directement sur l'activité des neurones du NST suggère que l'altération fonctionnelle de l'activité électrique des neurones du NST observée au cours de la maladie de Parkinson pourrait inclure les déficits dopaminergiques striataux et extrastriataux.

Notre équipe a montré que la déplétion dopaminergique par injection locale de la 6-hydroxydopamine dans le NST induit un changement de la fréquence et du mode de décharge des neurones du NST (Ni et al., 2001). Une modulation dopaminergique directe du NST peut-elle être envisagée comme alternative thérapeutique ? Le travail expérimental de cette thèse s'inscrit dans ce champ de recherche en neuropharmacologie visant à une meilleure compréhension du rôle de la dopamine, striatale et extrastriatale, dans la modulation électrophysiologique du réseau des ganglions de la base. Au cours de cette thèse, un intérêt majeur a été donné au rôle des récepteurs dopaminergiques D5 dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson. Dans un second temps, nous avons évalué les réponses électrophysiologiques au sein des noyaux des ganglions de la base suite à l'injection de neuroleptiques.

Introduction

I. Maladie de Parkinson

1. Généralités

La maladie de Parkinson est une pathologie neurodégénérative décrite pour la première fois en 1817 par le médecin anglais James Parkinson comme « paralysie agitante ». Au cours de la maladie de Parkinson, toutes les voies dopaminergiques cérébrales sont atteintes. La plus touchée est la voie nigro-striée, mais le déficit concerne également les voies méso-limbique et méso-corticale qui peuvent jouer un rôle important dans le genèse des troubles cognitifs et certains aspects de l'akinésie (Jayov-Agid et Agid, 1980 ; Scatton et al., 1982). D'autre part, les neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée qui projettent sur les parties « motrices » (dorso-latérales) du striatum sont davantage affectés que ceux qui projettent sur les zones plus « cognitives » (ventrales) (pour revue, Agid, 1991).

La dégénérescence cellulaire n'est jamais totale, même dans les structures les plus vulnérables telle que la substance noire, mais diverses études laissent à penser que le processus dégénératif est continu. Dans la substance noire, la perte des neurones dopaminergiques est d'environ 1% par an environ, alors que chez le sujet normal, la dégénérescence est deux fois moins rapide (Riederer et al., 1976 ; Scherman et al., 1989). En outre, la perte neuronale au niveau de la substance noire est moins sévère que la déplétion en dopamine au niveau du striatum.

Les lésions de la voie dopaminergique nigro-striée constituent l'essentiel des anomalies observées, mais d'autres systèmes neuronaux sont aussi touchés. On note également une perte d'environ 70 % des voies noradrénergiques du locus coeruleus (Cash et al., 1987), et d'environ 50% des voies sérotoninergiques du raphé (Halliday et al., 1990).

2. Symptômes

2.1. Troubles moteurs :

Les troubles moteurs associés à la maladie de Parkinson sont souvent qualifiés de symptômes cardinaux. Ils regroupent les quatre manifestations les plus courantes et les plus handicapantes décrites chez les patients parkinsoniens.

Il s'agit tout d'abord de l'**akinésie** ou **bradykinésie**, qui correspondent respectivement à la raréfaction voir la privation du mouvement (Wilson, 1925) et à la lenteur de son exécution. En d'autres termes, les mouvements volontaires se caractérisent par un défaut d'initiation avec apparition d'un délai significatif entre la volonté de réaliser le mouvement et l'exécution de ce mouvement. Les activités de routines sont donc grandement perturbées.

La **rigidité** est assimilée à une hypertonie musculaire généralisée. Elle est continue et homogène. La commande volontaire descendante trouve le muscle dans un état de préparation anormale et nécessite la mise en route de mécanismes compensatoires pour surmonter les contraintes physiques additionnelles. La rigidité concerne la quasi-totalité des muscles avec une prédominance du versant fléchisseur sur le versant extenseur (Delwaide et al., 1986).

Les **tremblements de repos** constituent sans aucun doute le symptôme le plus caractéristique de la maladie de Parkinson. Il s'agit d'un tremblement qui commence généralement de façon unilatérale, il prédomine au niveau des extrémités des membres supérieurs. Les tracés accélérométriques montrent un pic de fréquence entre 4 et 6 Hz.

L'**instabilité posturale** est une manifestation tardive de la maladie, qui survient après de nombreuses années d'évolution. Elle se manifeste par des troubles de l'équilibre qui provoquent des chutes de plus en plus fréquentes. Il s'agit probablement du symptôme le plus incommode, puisque la mobilité est alors réduite et que la sécurité lors des déplacements est

compromise. Si l'instabilité posturale apparaît très tôt, il y a une forte possibilité qu'elle soit symptomatique d'une autre maladie que la maladie de Parkinson classique, dite idiopathique.

2.2. Troubles non moteurs :

La majorité des symptômes décrits chez le patient parkinsonien correspond à des symptômes moteurs. Cependant, les complications non motrices ont une place non négligeable au sein de cette pathologie. Ces complications regroupent des désordres cognitifs, psychiatriques, ainsi que des **troubles du système autonome** ou du **sommeil**. Il sont souvent des effets secondaires des traitements anti-parkinsoniens.

Parmi les troubles les plus fréquents, on peut noter les **démences** présentes chez 30% des patients parkinsoniens. Leurs bases neurobiologiques ne sont pas encore connues, cependant la dégénérescence des voies dopaminergiques et/ou cholinergiques semblent être impliquées (Hurtig et al., 2000 ; Apaydin et al., 2002). Parfois, les démences peuvent être accompagnées de **psychoses**, généralement caractérisées par des hallucinations visuelles (Goetz et Stebbins, 1995). La complication non motrice considérée comme la plus commune est sans nul doute la **dépression**. En effet, les systèmes monoaminergiques (dopamine, sérotonine, noradrénaline) seraient impliqués, les mécanismes précis restant inconnus (Olanow et al., 2001 ; Burn, 2002).

3. Traitements

Les modèles animaux de la maladie de Parkinson ont permis de développer des plusieurs stratégies thérapeutiques. Il n'existe cependant pas de traitement curatif agissant sur le processus de neurodégénérescence à l'origine de la maladie, mais seulement des traitements symptomatiques soulageant essentiellement les troubles moteurs de la maladie de Parkinson. Il s'agit d'abord d'une approche pharmacologique visant à compenser la déplétion

dopaminergique dans le système nerveux central par : i) le rétablissement des taux de dopamine circulant (dopathérapie), ii) la stimulation directe des récepteurs dopaminergiques (agonistes dopaminergiques), iii) la potentialisation de ces effets en inhibant la dégradation de la dopamine résiduelle (inhibiteurs enzymatiques). La dopathérapie étant le traitement pharmacologique de référence, seul ce point sera brièvement évoqué dans la suite de l'exposé. Il existe également une approche neurochirurgicale qui consiste en la stimulation cérébrale à haute fréquence du NST.

3.1. Traitement pharmacologique : la dopathérapie

Le traitement à la lévo-dopa (L-dopa), précurseur de la dopamine, est le traitement pharmacologique de référence. La L-dopa est efficace à long terme sur la triade symptomatique motrice « tremblement-rigidité-ralentissement ». Classiquement, on décrit trois étapes du traitement de la maladie de Parkinson :

- 1- la **lune de miel**, période variant de 3 à 6 ans, se définit par une qualité de vie pratiquement normale. C'est la période de meilleure efficacité du traitement à la L-dopa, pendant laquelle la triade symptomatique est nettement améliorée.
- 2- les périodes de **fluctuations et de complications motrices** qui affectent 60% des patients après 6 ans de traitement. La première fluctuation motrice est la détérioration de fin de dose (ou « wearing-off ») qui correspond à une perte d'efficacité du traitement à la L-dopa, les symptômes moteurs réapparaissent donc plus rapidement. Des phénomènes de blocage-déblocage (ou « on-off ») sont également présent durant cette période. L'efficacité du traitement varie chez un même patient parallèlement à la disponibilité plasmatique du médicament. Si le

taux est élevé, des périodes de dyskinésies sont mises en évidence, et inversement, lorsque le taux chute, des périodes d'akinésie et de bradykinésie apparaissent.

- 3- la troisième période, la plus handicapante, correspond à la **perte d'efficacité quasi-totale de la L-dopa** et à l'apparition de signes non L-dopa sensibles.

3.2. Traitement chirurgical : stimulation à haute fréquence (SHF) du NST

La SHF du NST améliore l'ensemble des symptômes moteurs majeurs de la maladie de Parkinson (Benazzouz et al., 1993 ; Limousin et al., 1995, 1998). Cette amélioration de la fonction motrice permet une diminution importante de la médication antiparkinsonienne (de l'ordre de 50 à 80% de la dose journalière) et même, chez un bon nombre de patients, l'arrêt total des médicaments dopaminergiques (Vingerhoets et al., 2002, Moro et al., 1999). C'est à travers cette diminution des médicaments que l'on voit une stabilisation de la réponse motrice avec une disparition progressive des dyskinésies et des dystonies «off». La SHF du NST semble avoir un effet essentiellement indirect sur les dyskinésies en relation avec l'arrêt ou la diminution de la dopathérapie (Russmann et al., 2004). L'efficacité sur les signes parkinsoniens est fortement corrélée à la réponse à la L-dopa qui est ainsi un des facteurs pronostics les plus importants de l'indication opératoire par stimulation sous-thalamique.

A long terme (5 ans), les bénéfices de la SHF du NST sont préservés, particulièrement en ce qui concerne le tremblement et la rigidité (Krack et al., 2003). En plus de ces effets moteurs, le suivi régulier des patients opérés par stimulation cérébrale profonde a révélé des modifications thymiques et comportementales nécessitant un suivi rapproché. Bien que présentant un avantage clinique évident ayant permis les interventions bilatérales et la réduction importante des effets secondaires, la stimulation cérébrale profonde présente

l'inconvénient de nécessiter l'implantation d'appareils de stimulation à demeure, amenant un certain risque infectieux et matériel et nécessite, pour être optimale, des réglages fréquents par une équipe entraînée. Ces désavantages laissent donc tout naturellement la porte ouverte à d'autres abords thérapeutiques pour cette maladie.

II. Les ganglions de la base

Les ganglions de la base (GB), appelés également noyaux gris centraux, forment un ensemble de structures sous-corticales qui s'inscrit dans le système extrapyramidal lié à la motricité semi-volontaire ou automatique. Leur rôle demeure longtemps mal connu. « Aussi sombre que le fond de ma cave... » dira même Kinnier-Wilson en 1920 pour qualifier la fonction des GB. Dès la fin des années 1940, Whittier et Carpenter montreront l'implication de la lésion du noyau sous-thalamique (NST), un noyau essentiel des GB, dans la mise en place de mouvement anormaux choréiques : les ballismes (Whittier 1947). Cependant, le véritable champ d'investigations sur la physiologie et la physiopathologie des GB s'ouvre avec la découverte en 1960 de la dégénérescence dopaminergique nigrale et l'hypodopaminergie striatale subséquente chez les patients parkinsonien (Ehringer and Hornykiewicz, 1960). Les GB sont désormais impliqués dans la régulation du mouvement volontaire.

1. Organisation anatomo-fonctionnelle

La motricité volontaire est essentiellement un phénomène d'origine corticale. Elle fait intervenir le cortex moteur primaire, l'aire prémotrice, l'aire motrice supplémentaire, ainsi que les cortex associatifs préfrontaux et pariétaux (**Figure 1**). L'activité de ces aires corticales

est régulée par un ensemble de boucles cortico-sous-cortico-corticales où interviennent les GB.

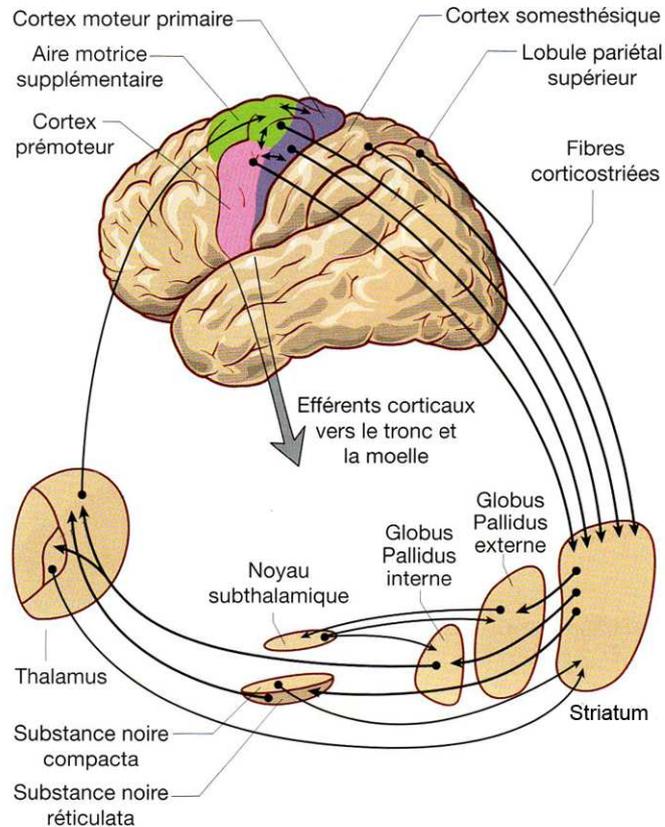


Figure 1 : Représentation schématique de la boucle cortico-sous-cortico-corticale de l'information motrice, faisant intervenir les ganglions de la base.

(D'après Graybiel et al., 1990)

D'après le modèle anatomo-fonctionnel classiquement admis des GB (Albin et al. 1989 ; Alexander et al. 1990), le striatum représente la structure d'entrée principale de l'information en provenance de plusieurs régions corticales et la substance noire réticulée (SNr) et le globus pallidus interne (GPi, équivalent du noyau entopédonculaire chez le rongeur) les structures de sortie, projetant principalement sur les noyaux moteur du thalamus. Les structures d'entrée et de sortie du réseau sont liées, soit par une voie directe

monosynaptique, soit par une voie indirecte polysynaptique faisant relais au niveau du globus pallidus externe (GPe, équivalent du GP chez le rongeur) et du noyau sous-thalamique (NST) (**Figure 2**). La voie directe à pour origine les neurones épineux de taille moyenne (MSN, medium spiny neuron) du striatum projetant sur la SNr et le GPi et exprimant la substance P (Bolam et Smith, 1990) alors que les MSN projetant sur le GPe expriment l'enképhaline (Gerfen 1990). L'activation de la voie directe striato-nigrale faciliterait le mouvement en désinhibant les neurones thalamo-corticaux, alors que l'activation de la voie indirecte striato-pallido-subthalamo-nigrale inhiberait le mouvement en renforçant l'inhibition de cette même voie (Garcia-cairasco et al., 1997). L'équilibre entre ces deux voies est assuré par l'innervation dopaminergique striatale issue de la substance noire compacte (SNc). Sa perte entraîne des troubles neurologiques important, comme la maladie de Parkinson.

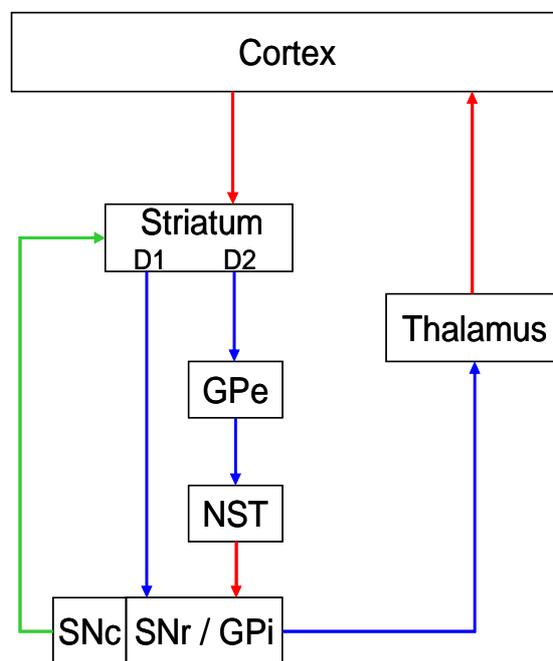


Figure 2 : Représentation schématique du circuit des ganglions de la base.

GPe et GPi (globus pallidus externe et interne) ; NST (noyau sous-thalamique) ; SNc et SNr (substance noire compacte et réticulée). Flèches bleues : inhibitions GABAèrgiques ; flèches rouges : excitations glutamatergiques ; flèches vertes : projections dopaminergiques. D1 et D2 : récepteurs dopaminergiques D1 et D2.

D'après Albin et al. (1989)

2. Le noyau sous-thalamique : plaque tournante des ganglions de la base.

2.1. Considérations anatomiques du NST

Le NST est l'un des plus petits noyaux des GB. L'utilisation de techniques modernes de traçage a permis de mettre en évidence que le NST est bien plus qu'un simple relais de la transmission pallidale. En effet, le NST envoie et reçoit des projections de la quasi-totalité des noyaux du réseau. Ceci souligne le fait que le NST joue un rôle crucial dans l'intégration de l'information au sein des GB.

2.1.1. Afférences

Le NST reçoit des projections massives en provenance du cortex (Kitai and Deniau, 1981; Afsharpour, 1985; Canteras et al., 1990; Degos et al., 2008) et du GPe (Carter and Fibiger, 1978). Le complexe parafasciculaire centromédian du thalamus (CM/PF) (Gerfen et al., 1982; Groenewegen and Berendse, 1990; Sadikot et al., 1992; Féger et al., 1994), l'aire tegmentale ventrale (ATV) (Hassani et al., 1997) et la SNc (Campbell et al., 1985; Hassani et al., 1997) projettent également sur le NST.

Projections cortico-subthalamiques :

Bien que le striatum soit communément considéré comme la principale structure d'entrée de l'information corticale du circuit des ganglions de la base, le NST reçoit également des projections excitatrices glutamatergiques du cortex (Kitai et Deniau, 1981; Bevan et al., 1995). Des évidences anatomiques indiquent que les projections cortico-subthalamique est exclusivement ipsilatéral (Afsharpour, 1985; Canteras et al., 1990). Chez le primate comme chez le rongeur, la plupart des afférences corticale du NST proviennent du cortex moteur primaire, de l'aire motrice supplémentaire (SMA), de la pre-SMA, et des partie

dorsale et ventrale du cortex pré-moteur (respectivement PMD et PMV) (Nambu et al., 1996, 1997, 2002; Degos et al., 2008). D'autres projections du cortex cingulaire, du cortex somatosensoriel, et du cortex insulaire ont été décrites chez les rongeurs et les primates, mais leur rôle reste encore mal connu (Künzle, 1977, 1978; Monakow et al., 1978; Kitaï et Deniau, 1981; Afsharpour, 1985b; Jurgens, 1984; Canteras et al., 1990; Rinvik et Ottersen, 1993).

Projections pallido-subthalamiques :

Les projections du GPe sur le NST sont l'une de ses principales afférences GABAérgiques (Fonnum et al., 1978; Oertel et Mugnaini, 1984, Smith et al., 1987, 1990a; Smith et Parent, 1988). Elles innervent la quasi-totalité du noyau (Parent et Hazrati, 1995). Chez le primate, des neurones de projection distincts ont été identifiés au niveau du GPe. 13,2% des neurones envoient des projections sur le NST, le GPi et la SNr, 18,4% uniquement sur le NST et le GPi, et 52,6% uniquement sur le NST et la SNr (Sato et al., 2000b). Les fibres pallidales innervent principalement les dendrites proximales et les corps cellulaires des neurones du NST, bien que les dendrites plus distales soient également innervées (Parent et Hazrati, 1995).

Projections thalamo-subthalamiques :

Des projections du complexe parafasciculaire centromédian du thalamus (CM / PF) ont été mises en évidence chez le rat (Gerfen et al., 1982; Sugimoto et Hattori, 1983; Sugimoto et al., 1983; Berendse et Groenewegen, 1990; Feger et al., 1994) et le singe (Saper et Loewy, 1982; Sadikot et al., 1992). Par rapport aux projections du GPe et du cortex, les projections du CM/PF sont relativement peu importantes (Parent et Hazrati, 1995b). Elles découlent d'un nombre restreint de neurones du CM/PF qui innervent une partie discrète du NST (Parent et Hazrati, 1995b). Des études neurochimiques, pharmacologiques et électrophysiologiques ont

confirmé que cette voie est excitatrice et que le neurotransmetteur utilisé est le glutamate (Mouroux et Feger, 1995; Scatton et Lehmann, 1982; Nicoullon et al., 1985).

Projections nigro-subthalamiques :

Comme nous l'avons mentionné ci-dessus, le NST établi également un lien réciproque avec la SNc (Mintz et al., 1986b; Kita et Kitai, 1987; Berendse et Groenewegen, 1990; Hassani et al., 1997). La notion de projection de la SNc vers le NST est soulevée puisque la présence de vésicules axonales dopaminergiques à été mise en évidence au niveau du NST (Brown et al., 1979). Il n'existe pas de claire organisation topographique de cette projection (Hassani et al., 1997). De plus, le NST exprime des récepteurs dopaminergiques postsynaptiques (voir partie III.1.4), et des études électrophysiologiques ont montré qu'il existe une modulation dopaminergique de l'activité des neurones du NST (voir partie IV.1.).

En plus des projections mentionnées précédemment, d'autres régions innervent minoritairement le NST chez le rongeur, comme le noyau pédonculopontin, le noyau réticulé du thalamus, la zona incerta, le locus coeruleus, l'hypothalamus, l'amygdale, le noyau du lit de la strie terminale, le complexe nucléaire parabrachial, le noyau tegmental dorsolatéral (Canteras et al., 1990 ; Parent and Cicchetti, 1998). Peu de données sont disponibles quant à leur impact sur l'activité du NST.

2.1.2. Éfférences

Le NST projette majoritairement sur les structures de sortie des GB, la SNr et le GPi, mais il projette également sur le GPe (Smith et al., 1998a). Chez le rat, les neurones du NST présentent un grand nombre de collatérales (Van Der Kooy and Hattori, 1980; Hammond and Yelnik, 1983; Kita et al., 1983). Des marquages intracellulaires (Hammond and Yelnik, 1983; Kita et al., 1983), des données électrophysiologiques (Hammond et al., 1983), et des marquages utilisant des transporteurs multimodaux (Bolam and Smith, 1992; Bevan et al., 1994a; Bevan et al., 1994b) indiquent qu'un seul et même neurone du NST, projette à la fois sur le GPe, le GPi et la SNr. D'autres projections vers le striatum (Beckstead, 1983; Kita and Kitai, 1987), la SNc (Mintz et al., 1986; Kita and Kitai, 1987; Groenewegen and Berendse, 1990), le noyau pédonculopontin (Hammond et al., 1983; Kita and Kitai, 1987; Parent and Smith, 1987) et même la moelle épinière ont été décrites. Plus récemment, des données anatomiques et électrophysiologiques ont mis en évidence l'existence d'une boucle cortico-subthalamo-corticale mettant en jeu les cortex sensori-moteur et préfrontal (Degos et al., 2008).

L'ensemble de ces données nous emmène à conclure sur la position centrale que tient le NST au sein du réseau des ganglions de base (**Figure 3**)

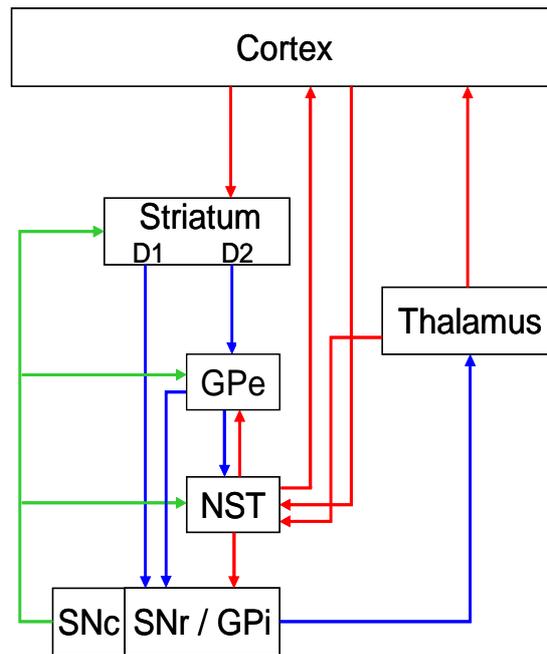


Figure 2 : Représentation schématique du circuit des ganglions de la base.

GPe et GPi (globus pallidus externe et interne) ; NST (noyau sous-thalamique) ; SNc et SNr (substance noire compacte et réticulée). Flèches bleues : inhibitions GABAérgiques ; flèches rouges : excitations glutamatérgiques ; flèches vertes : projections dopaminergiques. D1 et D2 : récepteurs dopaminergiques D1 et D2.

D'après Albin et al. (1989)

2.2. Considérations fonctionnelles du NST

Le rôle du NST comme acteur majeur du contrôle moteur est aujourd'hui indéniable. Son nom a longtemps été associé aux ballismes puisque des accidents vasculaires cérébraux dans la région du NST entraînent l'apparition de mouvements anormaux involontaires (Whittier 1947). Ces mouvements anormaux involontaires ont pu être reproduits chez le primate non-humain en inactivant le NST par des injections localisées d'agonistes des récepteurs GABA ou après lésion du noyau (Whittier 1947 ; Whittier and Mettler 1949 ; Hammond 1979 ; Crossman 1984).

Plus récemment, de nombreuses études ont mis en évidence son implication dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson. L'existence de modèles animaux de la maladie a permis une extension considérable des investigations consacrées aux conséquences fonctionnelles de la dégénérescence dopaminergique de la voie nigro-striée. L'administration intra-cérébrale de 6-hydroxydopamine (6-OHDA) chez le rongeur, ou l'administration systémique de 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (MPTP) chez le primate non-humain est à l'origine d'un grand nombre de perturbations fonctionnelles du réseau des GB. Les altérations les plus marquantes sont sans doute l'hyperactivité du NST et de ses cibles, tant au niveau électrophysiologique (Bergman et al., 1994 ; Kreiss et al., 1997 ; Ni et al., 2001) que métabolique (Vila et al., 1996 et 1999 ; Blandini et al., 1997 ; Benazzouz et al., 2004). D'après ces données, l'inhibition du NST devrait améliorer les symptômes cliniques de la maladie de Parkinson.

Dans le but de tester cette hypothèse, Bergman et al. (1990) et Aziz et al. (1991) ont évalué les effets d'une lésion du NST, soit par thermocoagulation soit à l'acide iboténique, chez le singe traité au MPTP. Tous les principaux troubles moteurs observés chez le singe MPTP, incluant akinésie, rigidité des membres et tremblements de repos, sont atténués par la lésion du NST. Cependant, cette lésion est associée à des états transitoires ou permanents d'hémiballisme. Le rétablissement de ce « parkinsonisme expérimental » corrobore donc l'hypothèse selon laquelle l'activité excessive du NST joue un rôle clé dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson, et confirme l'intérêt de ce noyau comme cible chirurgicale thérapeutique.

Afin d'éviter l'apparition d'effets non désirables et irréversibles, comme les mouvements anormaux involontaires décrit lors de la lésion du NST, Benazzouz et al. (1993) ont remplacé la lésion du NST par sa stimulation à haute fréquence (SHF). Cette technique était déjà connue pour induire des effets réversibles, graduels et contrôlables sur les troubles

fonctionnels, en particulier pour le traitement des tremblements (Benabid et al., 1987 et 1991). L'akinésie et la rigidité sont abolies par la SHF-NST chez le singe rendu hémiparkinsonien par l'injection intra-carotidienne unilatérale de MPTP (Benazzouz et al., 1993 et 1996). Ces effets bénéfiques obtenus chez le modèle animal de la maladie de Parkinson ont conduit à proposer la SHF-NST comme traitement thérapeutique chez des patients parkinsoniens humains (Pollak et al., 1993 ; Benabid et al., 1994). La SHF-NST unilatérale et bilatérale améliore de façon spectaculaires les principaux troubles moteurs de la maladie de Parkinson : akinésie, rigidité, troubles de la posture, dystonies en période « off » et même les tremblements de repos (Limousin et al., 1995a et b ; Pollak et al., 1996 ; Limousin et al., 1998, Krack et al., 1998 et 2003).

D'un point de vue métabolique, plusieurs études utilisant des techniques de marquages au 2-désoxyglucose (Schwartman et al., 1988 ; Mitchell et al., 1989 ; Palombo et al., 1990) ou encore des techniques de révélation du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale (complexe cytochrome oxidase) (Blandini et al., 1998 ; Vila et al., 2000 ; Benazzouz et al., 2004) ont confirmé que l'hyperactivité du NST est une caractéristique majeure de la maladie de Parkinson.

D'un point de vue électrophysiologique, une légère mais significative augmentation de la fréquence de décharge spontanée des neurones du NST a été rapportée chez le rat 6-OHDA et le singe MPTP (Bergman et al., 1994). De plus, des modifications dans le mode de décharge ont été constatées (Hassani et al., 1996 ; Vila et al., 2000 ; Bergman et al., 1994 ; Ni et al., 2001), et comme précédemment suggéré par Percheron (1993) et Marsden and Obeso (1994), cette désorganisation de l'activité électrique pourrait être une conséquence fonctionnelle crucial de la dégénérescence neuronale dopaminergique observée au cours de la maladie de Parkinson. En effet, les enregistrements effectués chez les modèles animaux rats 6-OHDA et singes MPTP ne sont pas tous en accord (Hollerman and Grace 1992 ; Bergman

et al., 1994 ; Hassani et al., 1996 ; Kreiss et al., 1997 ; Ni et al., 2001). La variable la plus couramment rapportée après déplétion du système dopaminergique, est le changement de mode de décharge des neurones du NST, et particulièrement l'augmentation de la proportion des neurones capables de décharger en bouffées de potentiels d'actions, également appelé « bursts ». La signification physiopathologique de la modification du caractère régulier du mode de décharge des neurones, et en particulier l'émergence de bouffées, est supportée par des données montrant une forte augmentation de la libération de neurotransmetteurs après stimulation par des bouffées, en comparaison avec une stimulation régulière (Dutton and Dyball 1979 ; Lundberg et al., 1986 ; Gonon et al., 1988 ; pour revue Lisman, 1997). D'un point de vue fonctionnel, le mode de décharge en bouffée est plus « efficace » que le mode régulier à la même fréquence de décharge (Bergman et al., 1994). Grâce à l'ensemble de ces données, nous pouvons considérer qu'après une déplétion dopaminergique, la décharge en bouffées correspond à une hyperactivité fonctionnelle pathologique, en comparaison avec le mode de décharge régulier et continu qui caractérise l'état normal. Pour exemple, il a été montré chez le rat 6-OHDA que la proportion de neurones dopaminergiques de la SNc subsistant à la lésion, tend à maintenir les niveaux extracellulaires de dopamine striatale (Zigmond et al., 1990). Le fait que les neurones de la SNc augmentent également leur activité en bouffées, constituerait un mécanisme compensatoire afin de maintenir l'homéostasie dopaminergique (Bezard and Gross 1998).

L'hyperactivité des neurones du NST décrite par le modèle d'Albin (1989) s'exprime donc non seulement d'un point de vue métabolique, mais également d'un point de vue électrophysiologique comme nous venons de le discuter. Cependant, les mécanismes cellulaires à l'origine de cette hyperactivité sont mal connus. Des études électrophysiologiques *in vitro* sur tranches de cerveau de rat, couplées à des

approches moléculaires menées par Baufreton et collaborateurs (2003 et 2005) proposent que les récepteurs dopaminergiques localisés au niveau du NST seraient capables de moduler le mode de décharge des neurones du NST.

III. Le système dopaminergique

La dopamine participe à un grand nombre de fonctions du système nerveux comme la perception sensorielle (rétine et bulbe olfactif), la régulation de certaines hormones de l'hypophyse, la thermorégulation, la mémoire, le plaisir, la récompense (Schultz et al., 1997), la motricité. Cette catécholamine est largement distribuée dans le système nerveux central des vertébrés, bien que les neurones capables de la produire ne représentent pas plus de 0,3% des cellules cérébrales. Les techniques permettant d'identifier les circuits utilisant la dopamine ont permis de distinguer 8 voies dopaminergiques majeures dans le cerveau. Quatre de celles-là prennent naissance dans le mésencéphale (**Figure 4**). Il s'agit d'abord du faisceau dopaminergique associé au circuit de la récompense. Il est constitué par la **voie méso- limbique** qui part des neurones de l'aire tegmentale ventrale et innervent plusieurs structures du [système limbique](#) dont le noyau accumbens. Cette voie est importante pour la mémoire et la motivation de nos comportements. En bloquant ce faisceau, les antipsychotiques réduisent les émotions intenses associées à la schizophrénie, par exemple. **La voie méso-corticale** part aussi de l'aire tegmentale ventrale mais innerve le cortex frontal et les structures avoisinantes. Certaines évidences montrent qu'un dysfonctionnement de cette voie pourrait être à l'origine des symptômes de la schizophrénie (hallucinations, désordre de la pensée...). Le blocage de ce faisceau avec des médicaments réduit les délires psychotiques, mais aussi le fonctionnement global des lobes frontaux. **La voie nigro-striée** qui projette des axones de la substance noire au striatum (noyau caudé et putamen), cette région impliquée dans le contrôle

moteur. La dégénérescence de ces neurones est d'ailleurs associée aux symptômes de tremblement et de rigidité musculaire associés à la maladie de Parkinson. Enfin, mentionnons une quatrième voie dopaminergique, la **voie tubéro-infundibulaire**, qui projette de l'hypothalamus à l'hypophyse et influence la sécrétion de certaines hormones comme la prolactine.

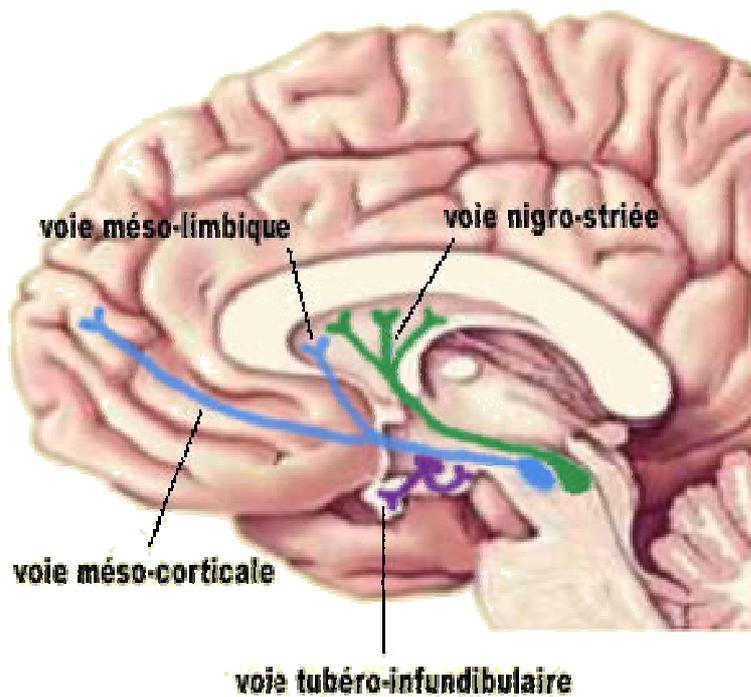


Figure 4 : Représentation schématique des quatre voies dopaminergiques centrales.

Les voies méso-corticale et méso-limbique proviennent de l'ATV et innervent respectivement le cortex préfrontal et le noyau accumbens. La voie nigro-striée naît dans la SNc et innerve le striatum alors que la voie tubéro-infundibulaire joint l'hypothalamus à l'éminence médiale.

Son action sur des récepteurs spécifiques permet de moduler entre autre le métabolisme, la mobilité, la différenciation et l'excitabilité cellulaire. Elle est également impliquée dans un certain nombre de pathologies comme la schizophrénie, l'addiction aux drogues et la maladie de Parkinson.

A l'échelle cellulaire, l'action d'un neuromédiateur dépend de sa fixation sur des récepteurs membranaires spécifiques, et de la transmission de ce signal à des voies de signalisation intracellulaire. Dans le cas de la dopamine, ces récepteurs appartiennent à la

superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et se répartissent en deux classes, nommées D1-like et D2-like.

1. Les récepteurs dopaminergiques

Les premiers travaux entrepris sur les récepteurs dopaminergiques (RD) portaient sur leurs propriétés pharmacologiques. Sur la base de la liaison d'agonistes et d'antagonistes, deux classes de récepteurs D1 et D2 ont été identifiées (Kebabian et Calne, 1979). Parallèlement à l'utilisation de composés discriminants chacune des deux classes de récepteurs, la modulation des voies de transductions intracellulaires a également été un critère de différenciation. En effet, la classe D1 est définie comme étant capable d'activer l'adénylate cyclase et de permettre l'accumulation d'AMPc, alors que la classe D2 au contraire inhibe son activité. Si cette différence fonctionnelle majeure a l'avantage d'être clairement identifiable et quantifiable dans la cellule, seule la détermination de profils pharmacologiques permet de différencier les récepteurs appartenant à chacune de ces classes (pour revue, Andersen et al 1990). A l'heure actuelle la famille des récepteurs à la dopamine est composée de sept récepteurs chez les vertébrés, quatre pour la classe D1 (D1a, D1b, D1c et D1d) et trois pour la classe D2 (D2, D3 et D4). Seulement 5 sont retrouvés chez les mammifères et sont répartis comme en deux familles, D1-like (RD1 et RD5) et D2-like (RD2, RD3, et RD4).

1.1. Structure

La plupart de nos connaissances de la nature moléculaire des récepteurs de la dopamine provient de leur isolement à partir de banques d'ADN complémentaires (ADNc) ou génomiques. L'analyse de leur séquence les classe dans leur grande famille des RCPG. Les membres de cette famille sont caractérisés par la présence de sept hélices hydrophobes

traversant la membrane plasmique. Elle compte un millier de membres (1% du génome humain) et on estime à l'heure actuelle qu'ils sont la cible de 60% des médicaments (Bockaert et Pin, 1999). La conservation importante des séquences de ces récepteurs, particulièrement au niveau des régions transmembranaires, est à l'origine des stratégies de clonage choisies pour les isoler (pour revue, Gingrich et Caron, 1993). L'utilisation de PCR avec amorces dégénérées ou le criblage de banque d'ADNc en conditions permissives ont permis d'isoler chez un grand nombre d'espèces les récepteurs à la dopamine. Ces méthodes ont aussi révélé des différences d'organisation génique puisque si les récepteurs de la classe D1-like n'ont pas d'introns, les récepteurs de la classe D2-like en possèdent.

Grâce aux séquences, on peut modéliser la structure de ces récepteurs (pour revue, Civelli et al 1993 ; O'Dowd 1993). Si les segments transmembranaires (TM) sont bien conservés, les régions intra et extracellulaires sont beaucoup plus variables. Des résidus hautement conservés au niveau des TM 2, 3, 5 et 6 participent à la liaison de la dopamine.

Les récepteurs D1-like possèdent une longue extrémité C-terminale cytoplasmique et une troisième boucle intra-cytoplasmique courte. A l'opposé les récepteurs D2-like ont une extrémité C-terminale très courte et une troisième boucle intra-cytoplasmique beaucoup plus longue (**figure 4**). Ces deux régions interviennent dans un certain nombre de régulations de l'activité du récepteur, la plus importante étant le couplage aux protéines G : les récepteurs D1-like sont associés préférentiellement à la sous-unité $G_{\alpha s}$ des protéines G, alors que les récepteurs D2-like sont principalement associées aux protéines $G_{\alpha_i}/G_{\alpha_0}$ (**Figure 5**).

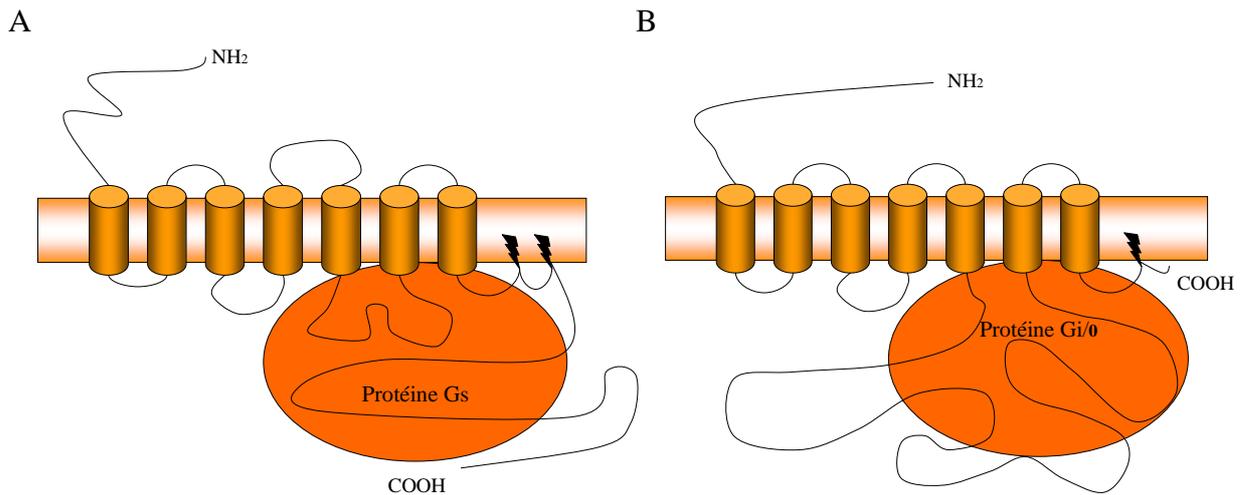


Figure 5 : Représentation schématique de la structure des récepteurs D1-like (A) et D2-like (B), ainsi que de leur couplage respectif aux protéines G.

1.2. Voies de Signalisation

Les [protéines G](#) représentent les principaux effecteurs des RCPG et répondent toutes au même mécanisme d'activation (**Figure 6**). À l'état inactif, la protéine G comprend les trois sous-unités $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$. La sous-unité $G\alpha$ lie une molécule de GDP ([guanosine diphosphate](#)) au niveau de son domaine GTPase. Selon le modèle classique, l'activation du récepteur par son agoniste, se traduit par des modifications structurales qui favorisent le couplage du récepteur à la protéine G. Il en résulte une diminution de l'affinité de la sous-unité $G\alpha$ pour le GDP, qu'elle expulse (Gilman 1987). L'état de transition qui suit, bien qu'instable, n'en reste pas moins un état de haute affinité pour le récepteur. La fixation du GTP (présent à de hautes concentrations) au niveau de la sous-unité $G\alpha$ « vide » clôturera finalement cette première phase d'activation. La conséquence majeure de l'échange GDP/GTP semble être une dissociation du complexe hétérotrimérique : $G\alpha$ -GTP et le complexe $G\beta\gamma$ (Neer 1995). Les sous-unités dissociées activent alors différents effecteurs spécifiques tels que [adénylate cyclase](#) (AC), [phospholipase C](#) (PLC). Pour terminer le cycle,

la déphosphorylation du GTP en GDP par l'action d'une RGS (Regulator of G-protein signaling) met fin au signal d'activation. Le complexe $G\alpha\beta\gamma$ se recompose, stabilisant la liaison du GDP au niveau de la sous-unité $G\alpha$ (De Vries 1995).

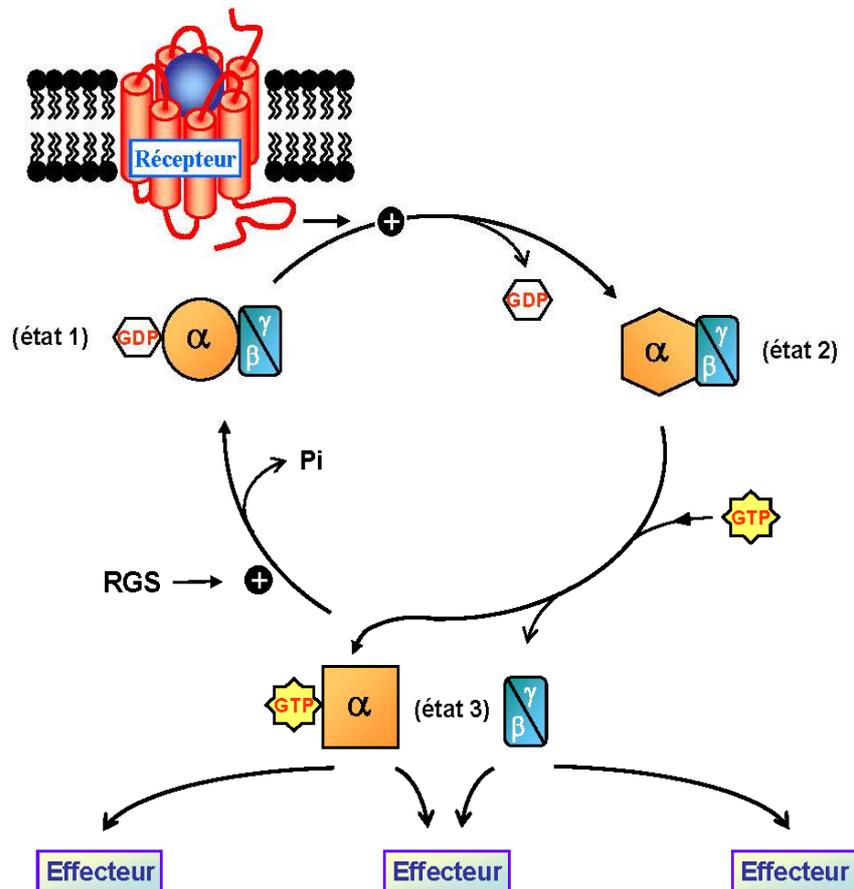


Figure 6 : Cycle d'activation des protéines G hétérotrimériques. Dans son état actif, un RCPG peut activer une protéine G en la faisant passer d'un état trimérique lié au GDP (état 1) à un état vide de nucléotide de haute affinité pour le récepteur. Selon le modèle classique, la liaison du GTP présent à haute concentration dans la cellule, entraîne d'une part la dissociation du complexe récepteur - protéine G (état 2) et d'autre part la dissociation de la protéine G en ses deux sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ (état 3).

La liaison d'un ligand sur son récepteur et l'activation successive de la protéine G, représentent les deux premières étapes indispensables à la transmission d'un signal à l'intérieur de la cellule. La protéine $G\alpha$ activée peut interagir avec différentes classes d'effecteurs dont l'adénylate cyclase. Selon le type de protéine G associé au récepteur, l'activité de l'adénylate cyclase sera activée ($G\alpha_s$, pour les récepteurs D1-like) ou inhibée ($G\alpha_i$, pour les récepteurs D2-like) (**Figure 7**).

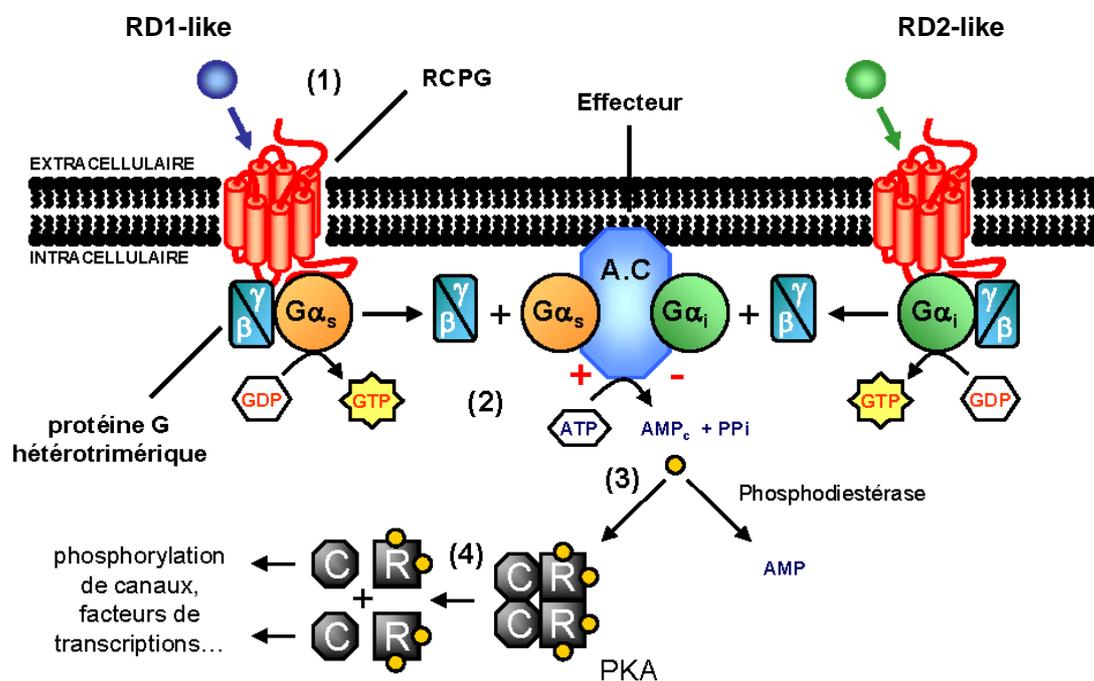


Figure 7 : RCPG et voie de signalisation AMPc dépendante. (1) activation du récepteur par un signal externe. (2) activation des protéines $G\alpha_s$ ou $G\alpha_i$. (3) activation via $G\alpha_s$ ou inhibition via $G\alpha_i$ de la production d'AMPc par l'adénylate cyclase (A.C). (4) activation de la protéine kinase A (PKA) par l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) suite à la dissociation de ses sous-unités régulatrices (R) et catalytiques (C).

L'une des conséquences principales de l'accumulation intracellulaire d'AMPc est l'activation de la protéine kinase AMPc dépendante (PKA), qui pourra, entre autre, phosphoryler des canaux potassique et moduler l'activité électrique des neurones. Ainsi,

l'activation de la PKA par la signalisation D1-like dépendante va diminuer la conductance potassique et entraîner ainsi une dépolarisation du neurone. A l'inverse, l'inactivation de la PKA par la signalisation D2-like dépendante va augmenter la conductance potassique et entraîner ainsi une hyperpolarisation du neurone. D'autres types de canaux ioniques dont les canaux calciques de type lent (L-types channel) peuvent être activés par la PKA, et concourir à la modulation de l'activité électrique des neurones (Baufreton 2003).

Le complexe $G\beta\gamma$ peut quant à lui moduler l'activité d'effecteurs au moins aussi nombreux que ceux contrôlés par les $G\alpha$. On retrouve des enzymes (phospholipases A2 et C...) (Katz 1992), l'adénylate cyclase (Federman 1992) ainsi qu'un nombre important de kinases (MAP kinases, tyrosines kinases...), et des canaux potassiques à rectification entrante ("GIRK: G protein-coupled inwardly rectifying K⁺").

1.3. Pharmacologie

Le critère majeur de classification des récepteurs a été la pharmacologie (pour revue voir Andersen et al., 1990; Keabian et Calne, 1979). Trouver des molécules qui distinguent entre elles les deux grandes familles D1 et D2 est simple. La dopamine possède une affinité micromolaire pour les récepteurs D1 et nanomolaire pour les D2. D'autre part, le SCH-23390 (7-chloro-2,3,4,5-tetrahydro-3-methyl-5-phenyl-1*H*-3-benzazepine-7-ol) est le prototype de l'antagoniste spécifique des récepteurs D1 et le SKF-38393 (2,3,4,5-tetrahydro-7,8-dihydroxy-1-phenyl-1*H*-3-benzazepine) celui des agonistes D1. Pour la classe D2, le quinpirole et la bromocriptine représentent des agonistes classiques alors que le raclopride et le spipéronne sont des antagonistes spécifiques. Beaucoup d'antagonistes dopaminergiques sont utilisés en clinique pour leur propriété antipsychotique (halopéridol ou chlorpromazine) (voir partie

IV.2.). Par contre, sans vouloir passer en revue de façon exhaustive toutes les molécules capables de moduler l'activité des récepteurs, il reste difficile de trouver des composés discriminant les différents récepteurs à l'intérieur de chaque classe (**Table 1**).

	D1-like		D2-like		
	D1	D5	D2	D3	D4
Agonistes					
Dopamine	0,9 - 2340	<0,9 - 261	2,8 - 474	5,1 - 24	30 - 46
Apomorphine	0,7 - 680	122 - 166	0,7 - 24	20 - 32	4
Bromocriptine	440 - 672	450	5,3 - 12,6	5 - 7,4	290 - 340
Quinpirole	1900	n.d.	4,8 - 576	5,1 - 24	30 - 46
SKF-38393	1 - 150	0,5 - 100	150 - 9560	5000	1000 - 1800
Antagonistes					
Butaclamol	0,9 - 3	.5 - 27	0,7 - 0,8	4,1 - 11,2	38 - 21
Clozapine	100 - 261	194 - 336	56 - 230	83 - 620	.09 - 42
Chlorpromazine	73 - 90	130 - 314	0,5 - 3	1,1 - 6,1	35
Halopéridol	27 - 203	33 - 151	0,6 - 1,2	2,7 - 7,8	2,3 - 5,1
Spipérone	99 - 350	135 - 4500	0,06 - 0,37	0,32 - 0,71	0,05 - 4
Raclopride	18 000	n.d.	.1 - 5	1,8 - 3,5	237 - 2400
SCH-23390	0,11 - 0,35	0,11 - 0,54	270 - 1100	314 - 800	3000 - 3560
Sulpiride	20 400 - 45 000	11 000 - 77 270	2,5 - 71	8 - 206	21 - 1000
α -flupentixol	36,1-200	n.d.	3,8	60	n.d.

Table 1 : Pharmacologie usuelle dopaminergique.

Ce tableau exprime l'affinité (K_i en mmol) de plusieurs agents dopaminergiques pour les différents sous types de récepteurs dopaminergiques. On peut noter qu'il est extrêmement difficile d'obtenir un agent pharmacologique spécifique d'un sous-type donné.

D'autres moyens moins directs peuvent également stimuler le système dopaminergique. Il s'agit de substances pharmacologiques qui ont un effet sur la biosynthèse, la dégradation ou la biodisponibilité de la dopamine (**Figure 8**). Elles sont largement utilisées dans le traitement de maladies comme la maladie de Parkinson (stimulation de la synthèse de dopamine par la Lévodopa et diminution de la dégradation par des inhibiteurs de la MAO-B et la COMT), le traitement des psychoses, des troubles déficitaires de l'attention avec

hyperactivité -TDAH- , ou des dépressions (inversion ou blocage du système de recapture des monoamines par les amphétamines, le méthylphénydate, ou le bupropion et la cocaïne).

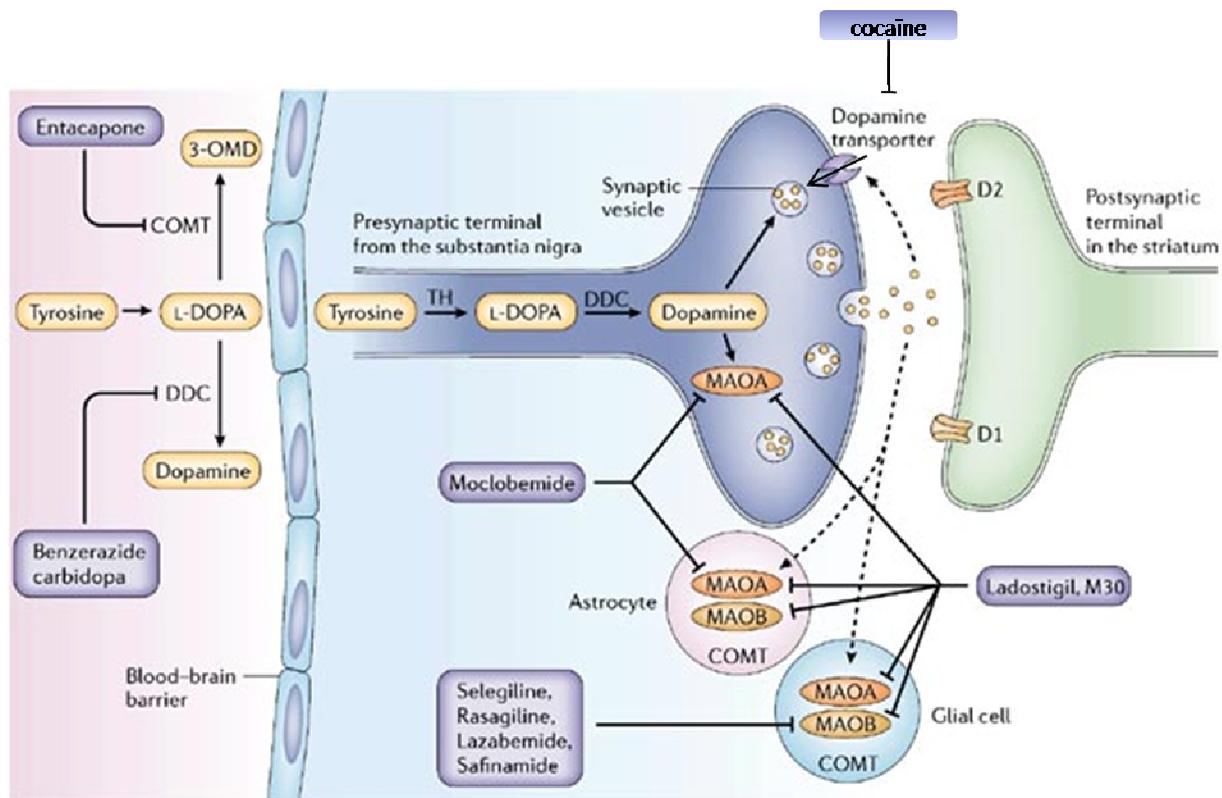


Figure 8 : Stratégies pharmacologiques activatrices du système dopaminergique.

Principales substances pharmacologiques qui ont un effet sur la biosynthèse, la dégradation ou la biodisponibilité de la dopamine

D'après Moussa B. H. Youdim, Dale Edmondson & Keith F. Tipton, 2006.

1.4. Distribution des récepteurs DA au sein des ganglions de la base

L'expression des cinq types de récepteurs dopaminergique au sein des différentes structures du réseau des GB n'est pas clairement établie. Bien que des études de binding autoradiographique aient été réalisées très tôt, il a fallu attendre le développement d'outils cellulaires et moléculaires plus spécifiques (hybridation *in situ*, RT-PCR, production d'anticorps spécifiques pour l'immunolocalisation...) pour obtenir une cartographie de la distribution des récepteurs dopaminergiques au sein du réseau. Il n'existe cependant pas,

encore à l'heure actuelle, de représentation sûre de l'expression des récepteurs puisque beaucoup d'études reste encore controversées. A la lumière des connaissances actuelles, nous allons donc essayer d'établir cette cartographie des RD au sein des GB (**Figure 9**), qui semble essentielle à la compréhension des mécanismes physiopathologique de la régulation de l'acte moteur.

Au niveau du striatum, il est couramment admis que les MSN expriment de façon différentielle les RD1 et les RD2 selon qu'ils projettent sur la SNr et le GPi (voie directe) ou le GPe (voie indirecte) (DeLong 1990 ; Gerfen 1990). Cependant, la ségrégation totale de ces différentes voies reste controversée puisque des études de RT-PCR ont montré une plus grande coexpression des RD1 et RD2 au niveau des MSN que celle prédite par les études d'hybridation *in situ* (Nicola et al., 2000 ; Surmeier et al., 1993). Des études d'immunohistochimie n'ont pas permis de trancher sur la question puisque certains révèlent une forte ségrégation de l'expression des RD1 et des RD2 (Hersch and Ciliax 1995 ; Lei and Jiao 2004) alors que d'autres démontrent une coexpression certaine au niveau des mêmes MSN (Nadjar et al., 2006 ; Aizman O 2000). L'hypothèse de la ségrégation des RD1 et RD2 au niveau du striatum à été très utile dans la compréhension du fonctionnement de la circuiterie des ganglions de la base. Mais il ne faut pas oublier que d'autres sous-types de récepteurs dopaminergiques (D3 et D4) sont également exprimés au niveau du striatum (Smith and Villalba 2008 ; Nicola et al., 2000). La colocalisation de ces différents sous-types et les RD1 et RD2 eux-mêmes, soulève l'hypothèse d'une interaction fonctionnelle entre les différents sous-types de récepteurs dopaminergique au niveau d'un même neurone au sein des GB (Smith and Villalba, 2008). Par exemple, une interaction RD1-RD3 est proposée dans la physiopathologie des dyskinésies induite par le traitement L-DOPA (Le Moine et al., 1996 ; Bezard et al., 2003 ; Guigoni et al., 2005 ; Aubert et al., 2005 ; Berthet et al., 2009).

Bien que le striatum soit de loin la principale cible des neurones dopaminergiques, le GP et le NST reçoivent aussi des afférences dopaminergiques en provenance de la SNc. La modulation dopaminergique extrastriatale est moins connue, mais n'en reste pas moins un élément capital à la compréhension du circuit moteur (pour revue Smith 2000 et 2008). Elle pourrait même expliquer des observations paradoxales qui ont été faites, en comparaison avec le modèle classique des ganglions de la base.

Au niveau du pallidum, on connaît deux populations neuronales distinctes, les neurones de projection pallidostriataux et les neurones pallidosubthalamiques expriment la parvalbumine et sont au nombre de 60%. Des expériences d'hybridation *in situ* (Smith and Kieval 2000) ont permis de mettre en évidence que les deux populations expriment des récepteurs D2. Les ARNm des RD3 et RD4 ont également été détectés, mais bien que quelques neurones les coexpriment avec les RD2, la majorité des neurones expriment un seul type de récepteur dopaminergique (Gurevich and Joyce, 1999).

Au niveau du NST, les deux familles de récepteurs dopaminergiques ont pu être mis en évidence par des expériences de binding autoradiographiques (Boyson et al., 1986 ; Savasta et al., 1986 ; Bouthenet et al., 1987 ; Johnson et al., 1994 ; Flores et al., 1999) ou d'hybridation *in situ* (Svenningsson and Le Moine, 2002 ; Flores et al., 1999). Cependant, les controverses ne cessent de grandir quant à la localisation pré et/ou post synaptique de ces récepteurs. En ce qui concerne les RD2-like, les ARNm des RD2 et des RD3 ont été révélés au niveau des corps cellulaires des neurones du NST, mais pas ceux des RD4, ce qui suggérerait que les RD4 sont présents exclusivement sur les afférences du NST (Flores et al., 1999). Les ARNm codant pour les RD5 ont été révélés dans une seule étude d'hybridation *in*

situ (Svenningsson et Le Moine 2002). Elle démontre cependant une forte expression des RD5, alors que celle des RD1 est indétectable. En accord avec cette étude, d'autres équipes ont pu mettre en évidence l'absence d'expression des ARNm codant pour les RD1 au niveau du NST chez le rats ou l'Homme (Boyson et al., 1986 ; Fremeau et al., 1991 ; Augood et al., 2000). En combinant les expériences d'hybridation et d'autoradiographie, les résultats tendent à prouver que les RD1 se situent exclusivement sur les afférences du NST alors que les RD5 sont présent sur les corps cellulaires. L'étude de l'expression des RD5 est réapparue récemment suite à la production d'un anticorps spécifique de ce sous-type (Ciliax et al., 2000 ; Khan et al., 2000). De nombreux corps cellulaires ont pu être marqués au niveau du NST.

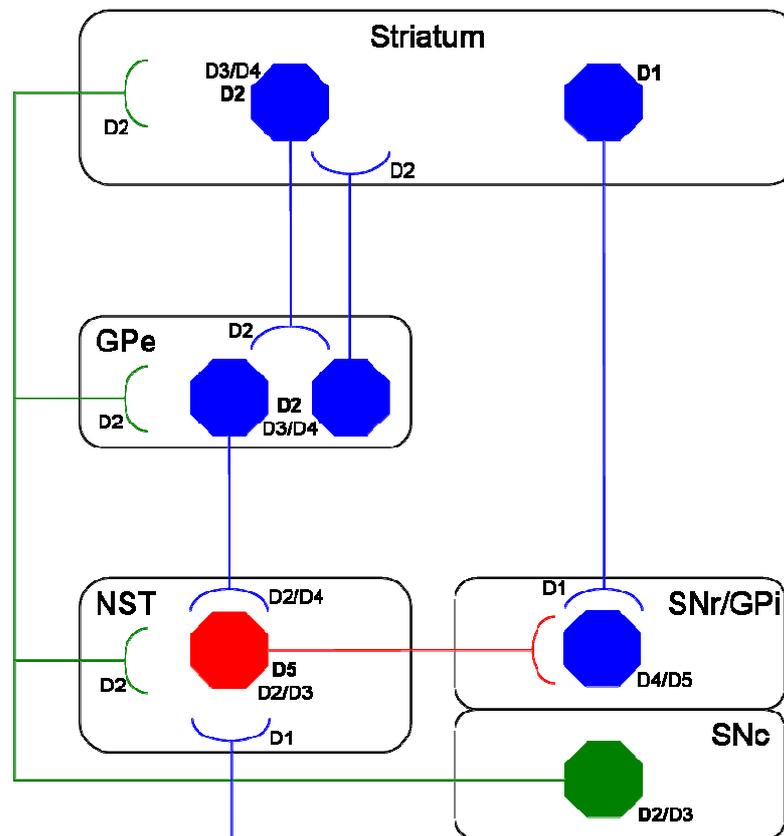


Figure 9 : Localisation anatomique des récepteurs DA au sein des ganglions de la base. Les fibres GABA sont en bleu; les fibres DA en vert et les fibres glutamatergiques en rouge. SNc: substance noire *pars compacta* et *pars reticulata* ; GPe et GPi: globus pallidus externe et interne ; NST: noyau sous-thalamique. PV : parvalbumine ; Enk : enképhaline.

(D'après Smith, 2000 et 2008, Bevan et al. 2006.)

2. Le cas du récepteur D5 : un récepteur constitutivement actif

2.1. Activité constitutive : Généralités

2.2.1. Définition de l'activité constitutive : notion d'agoniste inverse

Les modèles classiques décrivant l'activation des RCPGs proposent l'existence d'un équilibre entre deux états fonctionnels distincts du récepteur: un état inactif R et un état actif R* (**Figure 10**).

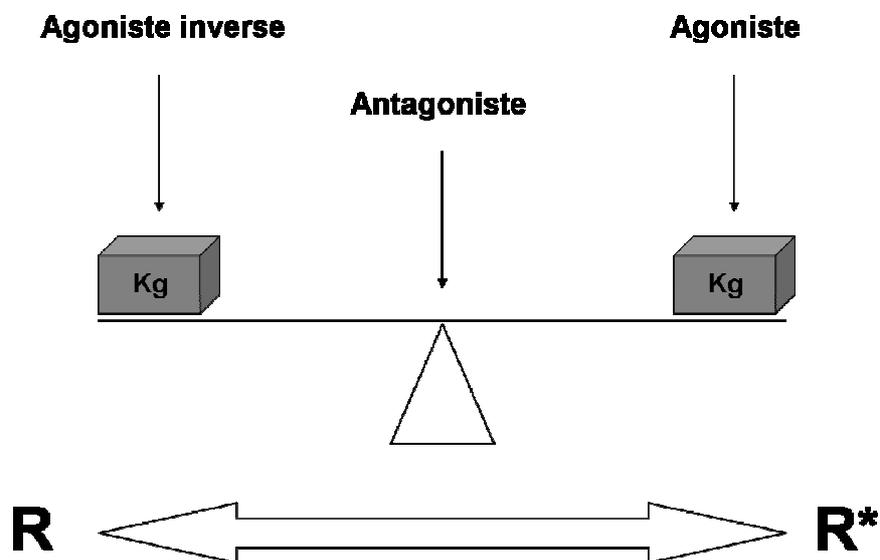


Figure 10 : Influence des ligands sur l'équilibre entre les deux états d'un récepteur.

Les récepteurs existent soit sous la forme inactive R, soit sous la forme active R*. La position de l'équilibre entre ces formes varie en fonction de chaque récepteur et est altérée par la présence de ligands de ces récepteurs. Les agonistes stabilisent la forme R* alors que les agonistes inverses stabilisent la forme R et les antagonistes définissant le point d'équilibre.

Dans ce modèle initialement introduit par Monod., (1965), le récepteur non lié à un ligand est considéré comme quiescent et le changement de conformation du récepteur suite à la liaison d'un ligand définit son efficacité (Clarke and Bond, 1998) (**Figure 11**). Ainsi, la fixation d'un agoniste sur son récepteur entraîne un effet dose dépendant (par exemple

augmentation de la concentration d'AMPc pour les RD1-like) qui nous permet d'évaluer son efficacité comprise entre 0 et 1, alors que l'efficacité d'un antagoniste est nulle. Les agonistes modifient l'équilibre entre R et R* de par leur plus forte affinité pour R* et favorisent donc la stabilisation de cette forme. Par contre, les antagonistes ont une affinité identique pour les deux formes. Ainsi, en absence d'agoniste (ou en présence d'antagoniste), l'équilibre entre R et R* détermine le niveau d'**activité basale** du récepteur. Ce modèle théorique a été adapté aux RCPGs (Bond et al., 1995; Costa and Herz, 1989; Leff et al., 1997; Samama et al., 1993).

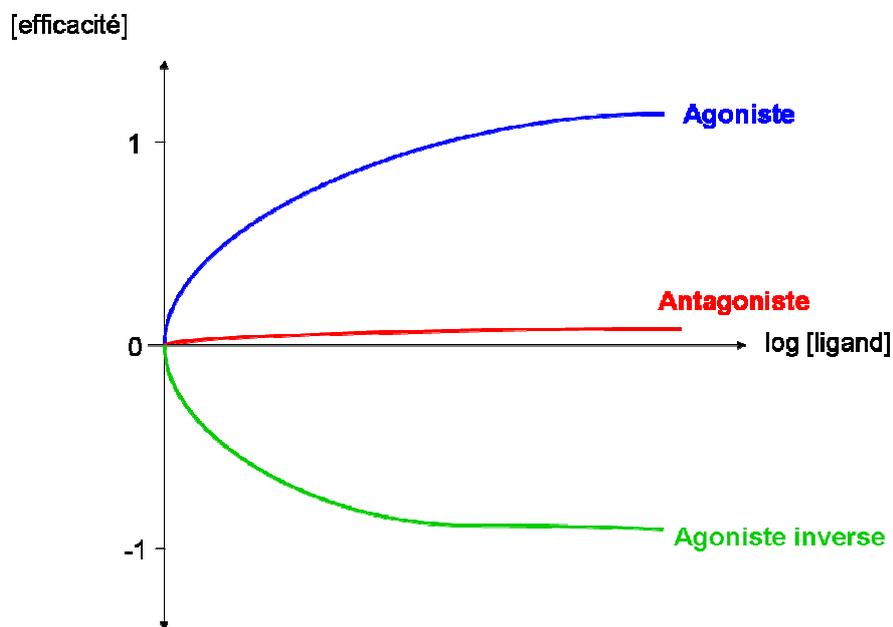


Figure 11 : Efficacité des différents ligands en fonction de leur concentration.

L'efficacité des ligands d'un récepteur est définie par leur capacité à produire une réponse. L'efficacité d'un agoniste est comprise entre 0 et 1 alors que celle d'un agoniste inverse est comprise entre -1 et 0. Celle d'un antagoniste est nulle.

Plusieurs études (De Lean et coll., 1980; Kenakin, 2004; Samama et coll., 1993) ont mis en évidence la capacité de certains ligands des RCPG à limiter l'activation des protéines G et/ou à diminuer le taux de formation basale de second messager en absence d'agoniste, c'est-à-dire à réduire l'**activité constitutive** du récepteur (ou activité spontanée du récepteur en absence de l'agoniste). Cette activité constitutive est due à une isomérisation spontanée du

récepteur de la forme R à R*, la forme R* interagissant efficacement avec la protéine G pour initier la régulation des effecteurs. La majorité des ligands ayant permis la mise en évidence de ce phénomène étaient initialement caractérisés comme des antagonistes. Or, la diminution de l'activité constitutive d'un récepteur étant un phénomène actif, il a été défini comme *agonisme*; le fait que la réponse observée soit opposée à celle d'un agoniste normal a permis de qualifier ces ligands d'**agonistes inverses (Figure 11)**. Dans le modèle classique d'activation du récepteur à deux états, les agonistes inverses possèdent une plus forte affinité pour les récepteurs sous la forme R, ce qui diminue la proportion de récepteurs R* et réduit donc l'activité basale du système de transduction (Milligan et coll., 1995) (**Figure 10**). De même que l'agonisme est associé à une efficacité, la propriété moléculaire associée à l'agonisme inverse possède une efficacité négative comprise entre 0 et -1 (**Figure 11**). Il est intéressant de noter que la mise en évidence d'agonistes inverses remet en question la notion d'antagoniste. En effet, l'absence d'effet en condition basale doit être évaluée sur ces systèmes constitutivement actifs avant de pouvoir attribuer le terme «vrai antagoniste neutre» à un ligand (Kenakin, 2004). Ces systèmes permettent donc de distinguer un antagoniste d'un agoniste inverse, lequel se comporte exactement comme un antagoniste compétitif sur un récepteur ne possédant pas d'activité constitutive (Kenakin, 2001). Pour cela, l'identification d'un agoniste, d'un antagoniste et d'un agoniste inverse dépend de l'état d'activité basale dans lequel se trouve le RCPG (Milligan et Bond, 1997).

2.2.2. Expression de l'activité constitutive in vitro

Les caractéristiques des agonistes inverses peuvent être observées dans des systèmes exprimant des taux élevés d'un récepteur possédant une forte activité effectrice basale. Pour cela, la majorité des études disponibles sont réalisées sur des lignées cellulaires transfectées pour exprimer les récepteurs natifs ou mutés (Milligan et al., 1995).

Les techniques de biologie moléculaire ont permis de générer des mutations spécifiques au niveau des régions impliquées dans le couplage des récepteurs aux protéines G et modifier ainsi l'activité basale des récepteurs. Les récepteurs adrénergiques ont constitué un outil de choix dans la génération de ces mutants constitutifs (Allen et al., 1991; Ren et al., 1993; Samama et al., 1993). En effet, que ce soit pour les récepteurs $\alpha 2$ ou $\beta 2$, les auteurs ont rapporté une augmentation considérable de la sensibilité des réponses biologiques pour ces récepteurs possédant des mutations localisées au niveau de la partie C-terminale de la troisième boucle intracellulaire. Ces mutants entraînent une activation constitutive de leur voie de transduction, traduite respectivement par la diminution du taux d'AMPC pour les $\alpha 2$ (Ren et al., 1993) et son augmentation pour les $\beta 2$ (Samama et al., 1993), et ceci en absence d'agoniste.

Il existe également des récepteurs natifs, présentant une activité constitutive. Celle-ci a déjà été rapportée dans la littérature pour les récepteurs dopaminergiques D5 (Tiberi et al 1994) ou encore pour les récepteurs 5-HT_{1D}, 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C} (Barker et al., 1994; Grotewiel and Sanders-Bush, 1999; Thomas et al., 1995) lorsqu'ils sont exprimés dans des systèmes hétérologues.

Il est cependant important de noter que l'expression d'une activité constitutive de récepteurs natifs relève d'une surexpression de ces récepteurs dans des systèmes d'expression hétérologue. En effet, de même que la mutation d'un récepteur peut modifier l'équilibre entre les formes R et R*, des niveaux d'expression élevés des récepteurs augmenteraient l'activité basale du système. Cette hypothèse est clairement supportée par les données montrant que l'augmentation des taux d'expression des récepteurs β 2-adrénergiques natifs dans des lignées cellulaires entraîne une augmentation de l'activité basale de l'adénylate cyclase (Adie and Milligan, 1994; Samama et al., 1993). Ainsi, le niveau d'activité basale d'un système, et donc le taux de récepteurs à activité constitutive, peut être augmenté si la concentration en récepteur est augmentée, mais aussi si la concentration en protéine G est augmentée (Burstein et al., 1995).

Il est donc primordiale, mais non moins délicat, d'évaluer l'activité constitutive d'un RCPG, dans des conditions « physiologiques », *in vivo*.

2.2.3. Expression de l'activité constitutive *in vivo*

Bien qu'il soit relativement aisé d'induire l'activité constitutive d'un récepteur et de mettre en évidence les propriétés d'agoniste inverse de nombreux composés dans des systèmes recombinants, démontrer de telles propriétés dans des systèmes natifs *in vivo* reste encore un challenge. La stratégie la plus couramment employée et la plus sélective permettant de sonder cette activité basale *in vivo* est d'utiliser une approche pharmacologique (Harvey et al., 1999; Millan et al., 1999b; Morisset et al., 2000). Cette approche est basée sur l'identification préalable de composés présentant des propriétés distinctes d'agoniste, d'agoniste inverse et d'antagoniste dans des systèmes recombinants. Ensuite, les différents ligands caractérisés sont

testés sur un système *in vivo*. La mise en évidence d'une activité constitutive d'un récepteur repose sur l'identification d'effets opposés des agonistes inverses par rapport aux agonistes, alors que les antagonistes sont sans effet par eux-mêmes et bloquent à la fois les effets des agonistes et agonistes inverses. Grâce à cette approche pharmacologique, Harvey et al., (1999) et De Deurwaerdere et al., (2004) ont pu valider l'existence d'une activité constitutive *in vivo* des récepteurs 5-HT₂, alors que Millan et al. (1999b) ont montré que les récepteurs 5-HT_{1B} n'existent pas sous une forme active de façon constitutive dans des systèmes natifs *in vivo*.

2.2.4. Signification physiologique de l'activité constitutive

D'un point de vue théorique ou pratique, on peut penser qu'il n'existe pas raison de croire que l'utilisation d'un agoniste inverse présente des avantages par rapport à l'utilisation d'un antagoniste dans la plupart des situations rencontrées en clinique. En effet, les drogues sont généralement utilisées simplement pour entrer en compétition avec l'agoniste endogène afin de limiter son action ou de réguler sa libération. Dans ce cadre, la puissance d'une molécule, sa biodisponibilité et sa sélectivité sont les propriétés indispensables à son efficacité clinique.

Cependant, de nombreux cas suggèrent l'utilisation avantageuse des agonistes inverse par rapport aux antagonistes. Cet aspect prend tout son sens si le tissu considéré se trouve sous un contrôle tonique médié par l'activité constitutive d'un récepteur. Quelques exemples dans la littérature suggèrent l'existence de ce tonus chronique élevé dans certaines maladies, c'est-à-dire où l'activité constitutive d'un RCPG constitue l'entité pathologique, et où seul un traitement avec un agoniste inverse peut être efficace. C'est le cas de la rétinite pigmentée et

l'hyperthyroïdisme (pour revue, Spiegel 1996) ou de certaines maladies auto-immunes (pour revue, De Ligt et coll., 2000). Dans ce contexte, il est clair qu'un traitement avec un antagoniste serait profitable, mais pas aussi efficace qu'un traitement avec un agoniste inverse (Milligan et al., 1995). La surexpression ou l'expression inappropriée de RCPGs, entraînant une activité constitutive, a également été rapportée comme étant à l'origine de pathologies comme les tumeurs endocrines (De Herder et al., 1994). Aussi, dans le cerveau de patients schizophrènes, il a été reporté des taux considérablement élevés de récepteurs dopaminergiques de type D4. Cette étude de Seeman et al., (1993) constitue un exemple d'une surexpression de récepteurs dans lequel des agonistes inverses sélectifs pour le récepteur D4 offrirait un bénéfice thérapeutique considérable par rapport à un antagoniste.

2.2. Activité constitutive des récepteurs D5 :

Tiberi et Caron ont montré en 1994 que l'activité indépendante de l'agoniste de récepteurs appartenant à une même famille (même ligand naturel) peut être sensiblement différente, comme c'est le cas des RD1 et des RD5. L'expression hétérologue des RD5 dans les cellules HEK entraîne une activation constitutive considérable de l'adénylate cyclase alors que celle des RD1 est quasi nulle.

Avec le RD5, des antipsychotiques aux propriétés d'antagonistes D2 comme la fluphénazine, l' α -flupentixol, ou le butaclamol, diminuent l'activité basale de l'adénylate cyclase (Cai et al 1999). Par contre, le SCH 23390 est sans effet. On peut donc considérer ces antagonistes comme agonistes inverses des RD5. De plus, cette baisse d'activité est accompagnée d'une perte de couplage à Gs pouvant atteindre les 80%. Une des premières analyse d'expression des RD1 et RD5 humain dans des cellules hétérologues CHO avait

montré que la stimulation de l'adénylate cyclase était 20 fois plus forte pour les RD5 que pour les RD1 (Pedersen et al 1994).

La recherche des régions importantes pour cette activité constitutive a été entreprise grâce à la fabrication de chimères entre les RD1 et les RD5 humains. Les mutations Phé 264 Ile et Leu 286 Ala rendent les RD1 constitutivement actif (Charpentier et al 1996, Cho et al 1996). Plus précisément, la substitution entre les acides aminés Phé 264 pour le RD1 et Ile 288 pour le RD5 permet d'invertir les activités basales de ces récepteurs (Charpentier et al 1996). Une des conséquences de l'apparition de cette activité constitutive induite des RD1 est l'émergence d'une inhibition agoniste-indépendante de l'adénylate cyclase et une augmentation de la phosphorylation des récepteurs par les GRK (G-protein coupled Receptor Kinase), comme celle observée pour les récepteurs adrénergiques α_2 et β_2 (Pei et al 1994).

Il existe très peu de données concernant l'implication des RD5 dans la régulation de l'acte moteur, principalement car la pharmacologie manque cruellement d'agents suffisamment spécifiques des RD5 pour en caractériser le rôle. Cependant, l'existence de souris K.O. pour les RD1 ou RD5, a rendu possible l'étude de ce récepteur, malgré toute les limites que l'on attribut à ce genre d'outils. Des caractérisations comportementales (Centonze D et al 2003 ; Holmes A et al 2001), ont établi que les RD5 joueraient un rôle inhibiteur modéré dans la modulation de l'acte moteur normal. Ces effets minimes pourraient s'expliquer par une éventuelle compensation du K.O. par les RD1 restants. D'un point de vue électrophysiologique, des études menées récemment au laboratoire par Baufreton et collaborateurs (2003 et 2005) ont permis de mettre en évidence l'importance des RD5 du NST dans la régulation du mode de décharge des neurones : leur activation favoriserait l'émergence de bouffées de potentiels d'action (voir partie IV.1.), caractéristique physiopathologique de la maladie de Parkinson.

IV. Ganglions de la base et système dopaminergique : considérations physiopathologiques

Comme nous l'avons vu précédemment, il y a de plus en plus d'évidences qui tendent à confirmer le rôle important que la dopamine peut jouer au niveau du NST. Ce noyau reçoit des projections dopaminergiques (Meibach and Katzman, 1979; Campbell et al., 1985; Hassani et al., 1997) et expriment des récepteurs dopaminergiques (Dawson et al., 1988a; Dawson et al., 1988b; Flores et al., 1999, Svenningson 2002) qui sous-tendent les réponses fonctionnelles du NST à de nombreux agents dopaminergiques (Ruskin and Marshall, 1995; Kreiss et al., 1996 ; Hassani et al 1997 ; Ni et al 2001). D'autre part, la modulation dopaminergique du NST jouerait un rôle clé dans les altérations retrouvées chez les modèles expérimentaux de troubles moteurs de type parkinsoniens.

1. Dopamine, noyau sous-thalamique et maladie e Parkinson

1.1. Modulation dopaminergique physiologique du NST :

Les premières études de la modulation dopaminergique du NST ont été réalisées chez le rat, après des injections microiontophorétiques d'agents dopaminergiques (Campbell et al., 1985; Mintz et al., 1986a). Cependant, les résultats rapportés sont contradictoires. En effet, alors que Campbell (1985) avait montré que l'application locale de dopamine diminuait de façon significative la fréquence de décharge de la plupart des neurones du NST, Mintz et collaborateurs (1986) ont montré que la dopamine exerce une influence principalement excitatrice sur l'activité des neurones du NST. Ceci sera confirmé par d'autres études électrophysiologiques (Ni 2001a et 2001b). En effet, des études lésionnelles menées par Ni et collaborateurs (2001), ont révélées que l'injection de 6-OHDA au niveau du NST diminue la

fréquence de décharge des neurones et augmente légèrement la proportion des neurones déchargeant en bouffées. Ce qui conforte l'hypothèse de Mintz selon laquelle la dopamine aurait une action excitatrice sur les neurones du NST.

Les effets opposés observés lors de l'application locale de dopamine peuvent s'expliquer par le fait que les neurones du NST expriment à la fois des RD1-like et des RD2-like (Martres et al., 1985; Boyson et al., 1986; Savasta et al., 1986; Bouthenet et al., 1987; Mansour et al., 1992; Johnson et al., 1994; Kreiss et al., 1996; Flores et al., 1999). De plus, des études *in vivo* ont permis de mettre en évidence que la dopamine ou la stimulation des RD1 peuvent à la fois inhiber ou exciter l'activité évoquée ou spontanée des neurones (Kitai et al., 1976; Norcross and Spehlmann, 1978; pour revue Nicola et al., 2000). Des études *in vitro* ont également montré que les effets excitateurs ou inhibiteurs des agonistes D1-like sont dépendants de l'état de dépolarisation membranaire des neurones (Hernandez-Lopez et al., 1997). Ces auteurs ont mis en évidence que lorsque le potentiel de membrane est maintenu au dessus de -60mV ou à -80 mV, des potentiels proche de ceux observés *in vivo* respectivement au cours des vagues d'activation corticale et au repos (Wilson & Kawaguchi, 1996), les D1-like facilitent l'activation cellulaire. Enfin, d'autres évidences en faveur d'un effet excitateur des agonistes D1-like sont apportées par l'étude de l'expression du proto-oncogène *c-fos* (Berretta et al., 1992; Gerfen et al., 1990).

L'ensemble de ces données laisse penser que la dopamine aurait une influence excitatrice sur les neurones du NST, ce qui va à l'encontre de l'hypothèse selon laquelle l'hyperactivité subthalamique observée au cours de la maladie de Parkinson serait due, au moins en partie à la perte de l'innervation dopaminergique directe nigrosubthalamique.

Cependant les mécanismes exacts entraînant cette hyperactivité pathologique du NST, qui n'est en aucun cas remise en question, restent à élucider.

1.2. Modulation dopaminergique physiopathologique du NST :

En effet, il ne fait nuls doutes que le NST est le siège de modifications électrophysiologiques dramatiques au cours de la maladie de Parkinson. Et ce, que se soit chez des patients parkinsoniens (Benazzouz et al 2002, Hutchison et al 1998 et 2004) ou chez les modèles animaux de la maladie de Parkinson, le rat 6-OHDA (Hassani 1996 ; Kreiss 1997 ; Vila et al 2000 ; Ni et al 2001) et le singe MPTP (Bergman et al 1994). Les modifications les plus reproduites d'une étude à l'autre restent le changement affectant dans le mode de décharge des neurones du NST. En effet, alors qu'en conditions contrôles ces neurones déchargent majoritairement de façon tonique, régulière ou légèrement irrégulière, la déplétion dopaminergique qui intervient dans la maladie de Parkinson entraîne une désorganisation drastique du mode de décharge entraînant les neurones du NST à décharger en bouffées, les potentiels d'action sont alors émis de façon groupée, à haute fréquence (**Figure 12**).

Comment est-ce que la dopamine module l'activité des neurones du NST en conditions pathologiques ? Quel est le rôle de la dopamine dans la mise en place de ces modifications électrophysiologiques ? Pourrait-on supprimer ces modifications pathologiques par des « mécanismes dopaminergiques » ? Ce sont autant de questions auxquelles nous allons tenter de répondre dans la partie qui suit.

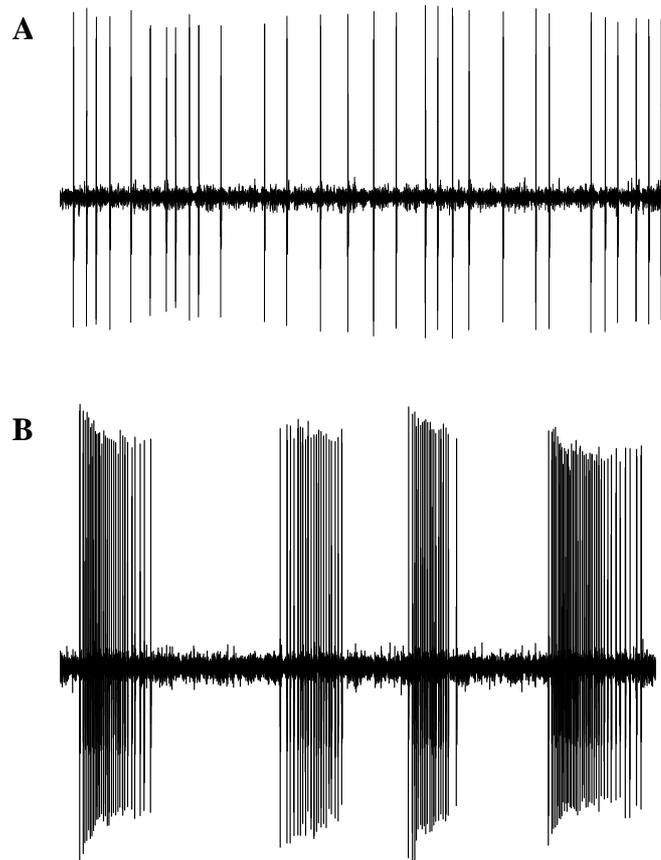


Figure 12 : Changement dans le mode de décharge des neurones du NST en conditions pathologiques.

En conditions contrôles les neurones du NST décharge de façon régulière (A) alors qu'une déplétion dopaminergique entraîne un mode de décharge en bouffées (B).

1.2.1. Origine de l'hyperactivité du NST en conditions pathologiques

Plusieurs études ont déjà montré que les effets de la dopamine sur le NST sont différents selon que le système dopaminergique nigro-strié est intact ou non (Kreiss 1997, Hassani et Féger 1999). Cependant les résultats rapportés sont une fois de plus en désaccord. Hassani montre que l'injection par infusion d'apomorphine diminue la fréquence de décharge chez le rat intact alors qu'elle l'augmente chez le rat lésé. Cet effet serait médiés par les RD2

puisque seul, le quinpirole reproduit les mêmes effets. Kreiss et collaborateurs ont réalisé des injections intraveineuses de ces mêmes substances et montrent des effets totalement opposés : une augmentation de l'activité subthalamique chez le rat intact après injection d'apomorphine, alors qu'ils observent une diminution chez le rat ayant subi une lésion du système dopaminergique. D'autres études montrent quant à elles que la dopamine a une action excitatrice sur l'activité des neurones du NST, et ce quelque soit l'état du système dopaminergique (Ni et al 2001), et que cette action serait médiée par les RD1.

Ces différences peuvent s'expliquer par les voies d'administrations utilisées. En effet, la prédiction que les neurones du NST deviennent hyperactifs lorsque le système dopaminergique est déplété (Albin et DeLong 1989, Alexander et Crutcher 1990) est basée sur l'hypothèse de la déplétion en dopamine striatale et donc de la levée d'inhibition GABAergique pallido-subthalamique (Miller and DeLong, 1987; Albin et al., 1989; Robledo and Féger, 1991). En accord avec cette hypothèse, les neurones pallidaux montrent une activité diminuée chez les rats lésés (Miller and DeLong, 1987; Pan and Walters, 1988; Filion and Tremblay, 1991), et les neurones du NST sont hyperactifs également lorsque le GP a été détruit (Ryan et Clark, 1992; Ryan et al., 1992). Cependant ces données restent controversées et la revue publiée par Levy et collaborateurs (1997) laisse entrevoir que d'autres mécanismes que la levée d'inhibition GABAergique pallido-subthalamique peuvent également intervenir pour expliquer l'hyperactivité du NST.

Ceci pourrait être le cas de la perte d'innervation dopaminergique directe nigro-subthalamique. En effet, il a été montré que l'injection de 6-OHDA au niveau du NST modifie la fréquence mais aussi le mode de décharge des neurones du NST (Ni et al. 2001).

Un autre élément qui ne peut pas être exclu concerne l'augmentation de l'influx exciteur exercé sur le NST (Overton et Greenfield, 1995; Hassani et al., 1996), potentiellement par le cortex qui représente l'afférence majeure glutamatergique que reçoit le NST (Afsharpour, 1985; Rouzair-Dubois and Scarnati, 1987; Canteras et al., 1990). De plus la stimulation corticale augmente la proportion des neurones déchargeant en bouffées (Kitai and Deniau, 1981; Fujimoto and Kita, 1993) et exprimant *c-fos* dans le NST (Wan et al 1992).

1.2.2. Les récepteurs dopaminergiques contrôlent le mode de décharge des neurones du NST in vitro

Des travaux récents du laboratoire ont montré que les bouffées de potentiels d'action, qu'elles soient spontanées ou évoquées, sont potentialisées par l'application d'agoniste des récepteurs D1-like (Baufreton et al. 2003) *in vitro*. Cependant, n'ayant pas à disposition d'outils pharmacologiques suffisamment puissants et spécifiques pour discriminer les RD1 et les RD5 au sein de la famille des RD1-like, l'équipe a utilisé une technique de RT-PCR sur cellule unique pour déterminer quel type de récepteur dopaminergique était impliqué dans la genèse de ces bouffées. Les neurones capables de décharger en bouffées expriment les RD5 et non les RD1 (Baufreton et al 2003). La même équipe a montré que les bouffées de potentiels d'action sont potentialisées par l'activation des RD5 (augmentation de la durée des bouffées et du nombre de potentiels d'action par bouffée) alors qu'elles sont inhibées par l'activation des récepteurs D2 qui hyperpolarisent les neurones capables de décharger en bouffées, les plaçant ainsi hors de la gamme de potentiel où les bouffées peuvent être déclenchées (Baufreton et al 2005). L'ensemble de ces travaux suggère que les différents types de récepteurs dopaminergiques localisés au niveau du NST seraient capables de contrôler le mode de décharge des neurones de ce noyau (**Figure13**).

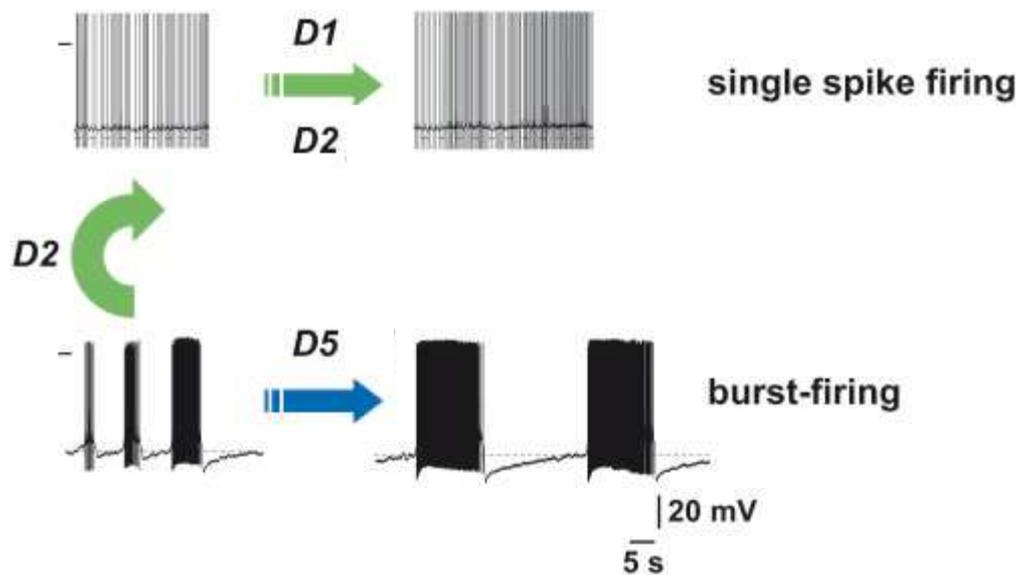


Figure 13 : Les récepteurs dopaminergiques contrôlent le mode de décharge des neurones du NST. Dans la maladie de Parkinson, les neurones du NST déchargent en bouffées, propriété conférée par les RD5, alors que le mode de décharge régulier en conditions contrôles est sous-tendu par l'activation des RD2 (d'après Baufreton et al., 2005).

2. Dopamine, antipsychotiques et troubles moteurs

Les traitements cliniques par des antipsychotiques peuvent être associés à l'apparition de troubles moteurs de type parkinsonien comme l'hypokinésie et la catalepsie. D'autres troubles peuvent y être associés comme les dyskinésies tardives. Ces effets secondaires moteurs sont définis comme étant des syndromes extrapyramidaux (EPS), et sont supposés être dus aux propriétés d'antagoniste des RD1 et RD2 des antipsychotiques (Ban et Lehmann, 1974 ; Richelson, 1984 ; Ehmann et al., 1987). Les drogues ayant de grandes susceptibilités à déclencher des EPS sont définies comme étant des « antipsychotiques typiques » (ex : halopéridol, flupentixol...) (Seeman et Van Tol, 1994, Chetrit et al 2009) alors que les drogues dépourvues d'effets secondaires moteurs sont définis comme des « antipsychotiques atypiques » (ex : clozapine) (Coward, 1992 ; Meltzer et al, 1999).

La plupart des travaux réalisés ont tenté de distinguer les sites et les mécanismes d'actions des antipsychotiques typiques et atypiques. Une hypothèse est que les antipsychotiques typiques ont une plus grande susceptibilité à induire des EPS de par leur affinité plus prononcée pour les RD2 (Farde et al., 1988; Farde and Nordstrom, 1992; Farde et al., 1992; Kapur et al., 2000; Mukherjee et al., 2001). La plus grande partie de ces études est consacrée à l'expression de *c-fos* au niveau du striatum (Nguyen et al., 1992 ; Robertson et al., 1992 ; MacGibbon et al., 1994). En effet, tous les antipsychotiques partagent le fait d'induire une expression de *c-fos* prononcée au niveau du noyau accumbens (Wan et al 1995), ce qui pourrait être mis en relation avec l'activité thérapeutique antipsychotique de ces drogues. Cependant, seuls les antipsychotiques typiques semblent induire l'expression de *c-fos* dans la partie dorsolatérale du striatum, partie dite sensori-motrice riche en RD2 (Boyson SJ 1986). De plus, cette étude a également montré qu'il peut exister une corrélation entre l'intensité du marquage *c-fos* observé dans le striatum et la sévérité des EPS induits par différents antipsychotiques. Ainsi, l'halopéridol est la substance testée qui induit la plus grande expression de *c-fos* et les troubles moteurs les plus prononcés, alors que l'expression de *c-fos* est bien moins importante pour la chlorpromazine et la risperidone, produisant des EPS moins sévères, tout en ayant les mêmes effets thérapeutiques (même marquage *c-fos* observé au niveau du noyau accumbens).

Cependant, peu d'études se sont intéressées aux mécanismes électrophysiologiques qui sous-tendent l'apparition d'EPS induite par les antipsychotiques typiques. Notons néanmoins une étude réalisée par Bruggman et collaborateurs (Bruggman et al 1997), qui a montré que les antipsychotiques affectaient l'activité électrique de la SNr de façon différentielle selon qu'ils soient qualifiés de typiques ou atypiques.

V. Objectif général du projet de recherche

L'objectif général de ce travail de thèse s'inscrit dans l'optique d'une meilleure compréhension de la physiopathologie des ganglions de la base et son implication dans la manifestation des désordres moteurs associés à la maladie de Parkinson et aux effets secondaires extrapyramidaux consécutifs à l'utilisation des antipsychotiques typiques.

La première partie de ce travail a consisté à vérifier l'hypothèse selon laquelle l'activité constitutive des récepteurs dopaminergiques D5 est impliquée dans la genèse de l'activité pathologique en bouffées des neurones du NST et par conséquent la manifestation des désordres moteurs de type parkinsonien. Pour répondre à cette question, nous avons choisi d'utiliser une approche pharmacologique. L'utilisation d'un agoniste inverse, l' α -flupentixol, appliqué localement au niveau du NST, nous a permis de bloquer cette activité intrinsèque et ainsi d'évaluer son impact dans le contexte de la maladie de Parkinson en utilisant plusieurs approches expérimentales chez un modèle animal de cette maladie, le rat 6-OHDA.

L'effet de l'injection locale de l' α -flupentixol dans le NST a été étudié sur:

- 1- l'hypolocomotion et l'asymétrie induite par la lésion unilatérale de la voie dopaminergique nigro-striée en utilisant les techniques d'actimétrie (*open field*) et le test d'ajustement des pas (*stepping test*),
- 2- l'activité électrique en bouffées des neurones du NST utilisant la technique d'enregistrement électrophysiologiques extracellulaires chez le rat anesthésié à l'uréthane,

- 3- l'hyperactivité métabolique du NST et de sa cible principale, la SNr en utilisant l'analyse histochimique de la cytochrome oxidase, un marqueur de l'activité neuronale (pour revue, Hirsch et al., 2000).

Dans un second temps, nous avons voulu caractériser les effets comportementaux et électrophysiologiques de l'injection systémique de l' α -flupentixol. En plus de son rôle d'agoniste inverse des récepteurs dopaminergiques D5, l' α -flupentixol possède aussi les propriétés d'antagoniste des récepteurs D2 faisant de lui un antipsychotique typique utilisé classiquement en psychiatrie. Nous avons donc étudié les effets de l'injection intrapéritonéale aiguë de l' α -flupentixol sur le comportement moteur (hypokinésie et catalepsie) et les corrélats électrophysiologiques associés en réalisant des enregistrements extracellulaires des neurones de l'ensemble des structures des ganglions de la base à savoir le NST, le GP, la SNr et deux populations du striatum (les neurones de projection striato-nigraux et striato-pallidaux). Cette étude nous a permis de proposer une vue d'ensemble des modifications de l'activité neuronale au sein du réseau des ganglions de la base induits par une injection aiguë de cet antipsychotique typique, l' α -flupentixol. Cependant, afin d'étudier les troubles moteurs associés à un traitement chronique, nous avons choisi d'utiliser un autre antipsychotique capable d'induire des dyskinésies tardives en plus d'une hypokinésie et catalepsie.

Dans un troisième temps, nous avons comparé les effets d'un traitement aigu et d'un traitement chronique de l'halopéridol sur le comportement moteur et sur l'activité électrique des neurones du NST. L'halopéridol étant un antipsychotique typique connu pour induire des dyskinésies tardives chez l'homme quand il est utilisé de façon prolongée.

*Matériel
&
Méthodes*

I. Modèle d'étude

Toutes les expériences ont été réalisées sur des rats mâles de souche Wistar d'un poids compris entre 280 et 380g. Placés à l'animalerie du laboratoire sous un cycle de 12h de jour / 12h de nuit et à température constante de 22°C, les animaux sont nourris *ad libitum* et ont libre accès à l'eau. Toutes les expériences ont été réalisées en accord avec la directive du 24 Novembre 1986 (86/609/EEC) du Conseil de la Communauté Européenne, concernant l'utilisation d'animaux de laboratoire.

1. Lésion du système dopaminergique :

Les animaux sont rendus hémiparkinsoniens par une injection stéréotaxique unilatérale de 6-hydroxydopamine (6-OHDA) dans le faisceau médian du télencéphale (MFB, medial forebrain bundle) selon les coordonnées stéréotaxiques de l'atlas du cerveau de rat (Paxinos et Watson, 1996). En effet, au niveau du MFB se trouvent les fibres dopaminergiques issues de la SNc qui projettent sur le striatum. En injectant la 6-OHDA, toxine spécifique des neurones catécholaminergiques, à cet endroit, les corps cellulaires des neurones dopaminergiques nigraux seront lésés de façon rétrograde, mimant ainsi la dégénérescence caractéristique de la maladie de Parkinson.

Avant l'anesthésie par injection intra péritonéale (i.p.) d'hydrate de chloral à 8% (5 ml/kg), le rat est traité à la désipramine 0,4% (5 ml/kg) (inhibe la recapture de la noradrénaline, donc protège les neurones noradrénergiques de la lésion à la 6-OHDA).

Le rat traité et anesthésié est ensuite placé sur un cadre stéréotaxique (KOPF, Unimecanique, France). Le crâne est mis à nu puis séché afin de distinguer les repères anatomiques à la surface du crâne : bregma et lambda. A l'aide de l'atlas stéréotaxique de Paxinos et Watson, le MFB est atteint en déplaçant la canule des coordonnées suivantes : AP (antéropostérieur) :

-2,8 mm par rapport au bregma ; L (latéral) : -2,0 mm par rapport à la ligne médiane ; DV (dorsoventral) : -8,4 mm par rapport à la surface (**Figure 14**). La 6-OHDA (12,5 µg) est dissoute dans un volume de 2,5 µl de NaCl 0,9% et injectée dans le MFB.

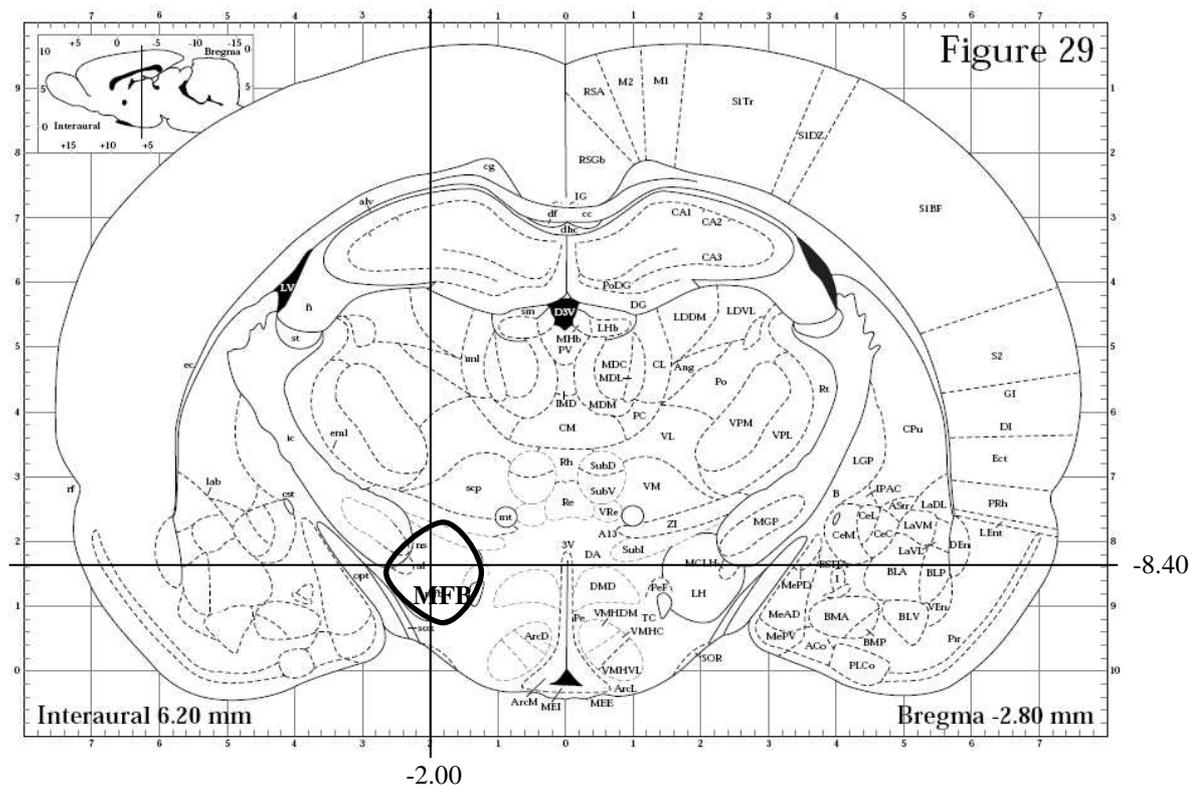


Figure 14 : Localisation du MFB par ses coordonnées stéréotaxiques sur une coupe frontale de cerveau de rat (D'après Paxinos et Watson, 1996).

2. Lésion du Globus Pallidus :

De la même façon que pour la lésion du système dopaminergique, le rat anesthésié à l'hydrate de chloral 8% est placé sur un cadre stéréotaxique et le GP est atteint en déplaçant la canule des coordonnées suivantes : AP (antéropostérieur) : -1,0 mm par rapport au bregma ; L (latéral) : -3,0 mm par rapport à la ligne médiane ; DV (dorsoventral) : -6,5 mm par rapport à la surface. 0,4 µl d'acide iboténique à 8mg/ml dissout en PBS stérile à pH7.4 est injectée dans le GP. La mort des neurones interviendra suite à un choc excitotoxique puisque l'acide iboténique va stimuler de façon intense les récepteurs au glutamate et provoquer une entrée

massive de calcium dans la cellule. Le neurone ne parvient plus à réguler son homéostasie et entre en apoptose suite à l'activation des caspases.

3. Validations histologiques :

3.1. Vérification de la lésion dopaminergique:

L'immunohistochimie de la tyrosine hydroxylase (TH) a permis de vérifier l'étendue de la lésion du système dopaminergique. Brièvement, les coupes de 20 μm sont fixées dix minutes dans du PAF 4 %, les peroxydases endogènes sont ensuite inhibées trente minutes par de l' H_2O_2 0,3 %, puis les coupes sont saturées et perméabilisées trente minutes dans du PBS 0,1M-BSA 1 %-Triton X-100 0,3 %. Elles sont alors incubées toute la nuit à température ambiante avec un anticorps primaire anti-TH (fait chez la souris) dilué au 1/10000^e. Après rinçage en PBS, elles sont incubées deux heures avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à l'enzyme HRP dilué au 1/1000^e. Les coupes sont alors rincées en PBS, puis révélées avec de la DAB (Kit DAB Vector). La réaction est stoppée par de l'eau distillée, les lames sont déshydratées puis claires au xylène avant d'être montées entre lames et lamelles. La figure 15 montre d'une part la perte unilatérale de l'innervation dopaminergique striatale (A) et d'autre part la diminution considérable de neurone TH immunoractifs au niveau de la SNc (B), suite à l'injection unilatérale de 6-OHDA au niveau du MFB.

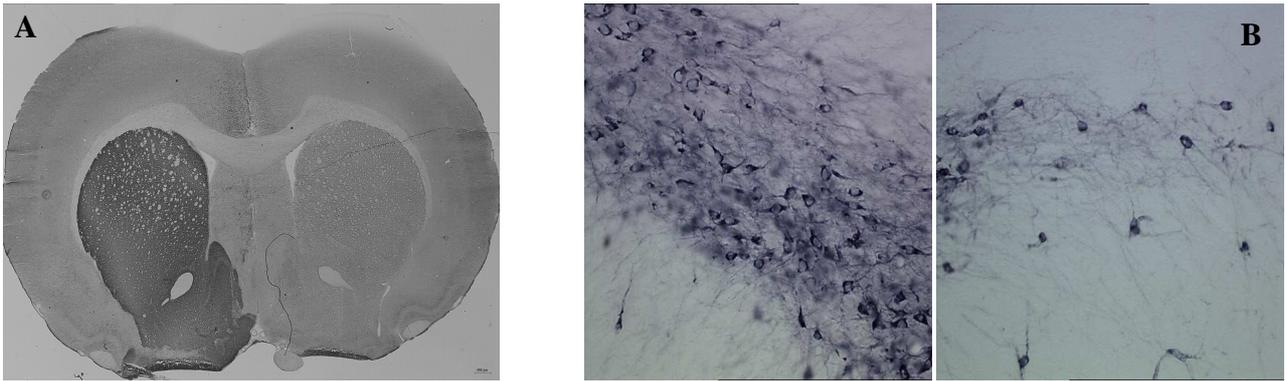


Figure 15 : Vérification de la lésion du système dopaminergique.

Coupe de striatum (A) et de SNc (B) montrant un marquage de la tyrosine hydroxylase. L'injection de 6-OHDA au niveau du MFB va entraîner la destruction des fibres dopaminergiques allant de la SNc au Striatum de façon antérograde et la perte massive de corps cellulaire au niveau de la SNc de façon rétrograde. L'absence de marquage reflète donc une lésion dopaminergique unilatérale totale.

3.2. Vérification de la lésion du GP :

La mort cellulaire des neurones du globus pallidus est appréciée par une coloration au crésyl violet. Brièvement, les coupes de 20 μm sont déshydratées dans des bains croissants d'alcool puis réhydratées, avant d'être incubées environ deux minutes dans une solution de crésyl violet filtrée à 40%. Enfin, les coupes sont déshydratées et claircies au xylène avant d'être montées entre lames et lamelles (**Figure 16**).

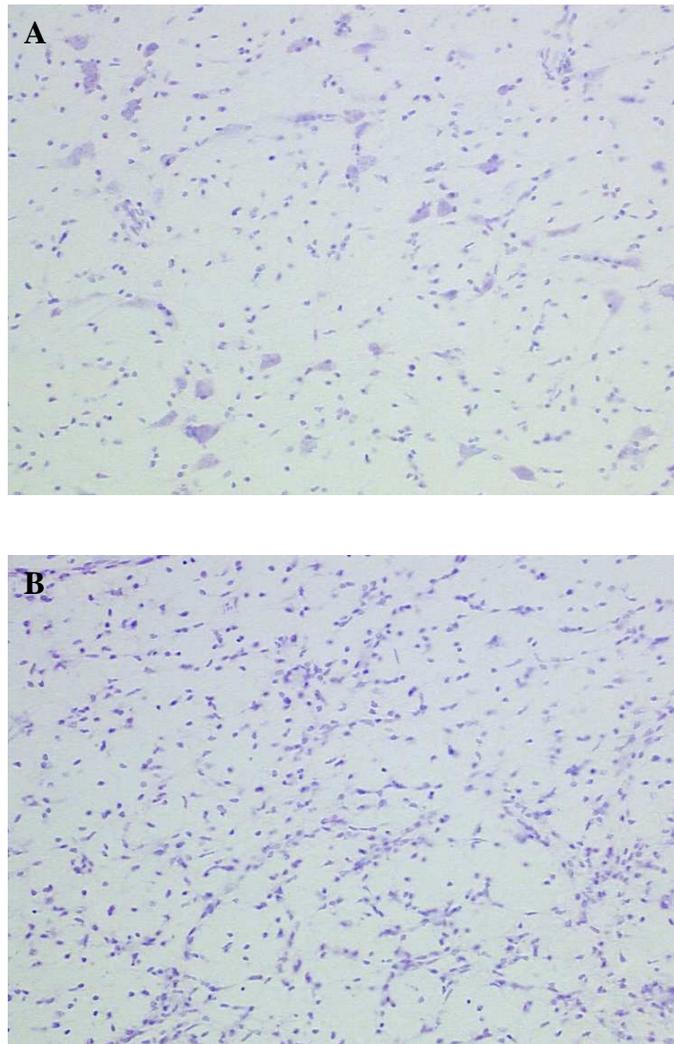


Figure 16 : Vérification de la lésion du globus pallidus.

Coloration au crésyl violet montrant la perte de corps cellulaire neuronaux au niveau du GP après injection d'acide iboténique (B) en comparaison avec le coté controle (A).

4. Implantation de guide canule :

L'implantation consiste à positionner un guide canule 1mm au dessus du NST afin de pouvoir réaliser des injections locales de substances pharmacologiques sur des animaux éveillés. Les implantations seront réalisées sur des rats préalablement lésés à la 6-OHDA. La préparation de l'animal se fait de la même façon que pour la lésion, deux semaines après celle-ci. Une fois le guide canule positionné aux coordonnées stéréotaxique du NST (AP :

- 3,8 mm ; L : 2,5 mm ; P : - 7,5 mm) un casque en ciment dentaire est coulé sur le crâne pour maintenir le guide canule en place. Pour les expériences de comportement, une canule sera descendue dans le guide canule de façon à injecter la substance pharmacologique localement au niveau du NST, dans un volume de l'ordre du nanolitre.

II. Substances pharmacologiques :

Au cours de cette étude, différentes substances pharmacologiques dopaminergiques ont été utilisées. Leur nom usuel, leur propriété, la concentration à laquelle elles ont été utilisées (en injection intra-péritonéale, locale au niveau du NST, et *in vitro* sur tranche de cerveau contenant le NST) ainsi que le fournisseur de chacune d'entre elles sont indiqués dans la table 2.

Nom	Propriété(s)	Concentration				Fournisseur
		<i>in vivo</i> i.p.	<i>in vivo</i> locale	<i>ex vivo</i>	<i>in vitro</i>	
SKF 38393	agoniste D1-like	x	x	10^{-4} - 10^{-9}		Sigma
SCH 23390	antagoniste D1-like	x	x	10^{-4} - 10^{-9}		Sigma
flupentixol fluphénazine butaclamol	agoniste inverse D5 antagoniste D2	0,3 mg/kg	4 µg	10^{-4} - 10^{-9}	1 µM 2 µM 2 µM	Sigma
raclopride	antagoniste D2	x	4 µg	x	5 µM	Sigma
halopéridol	antagoniste D2	1 mg/kg	x	x		Sigma

Table 2 : Agents dopaminergiques utilisés pour les différentes expériences.

Les concentrations utilisées pour les expériences *in vivo* ont été déterminées sur la base d'une étude bibliographique montrant des effets sur l'activité motrice spontanée des rats (Hess et al., 1988, Pitts et al., 2000). Pour les expériences *in vitro*, nous nous sommes basés sur les travaux antérieurs menés au laboratoire (Baufreton et al., 2003 et 2005). Pour le GTPγS *ex vivo*, nous avons réalisés des courbes dose-réponse pour chacun des agents testés.

III. Enregistrements électrophysiologiques :

1. Enregistrement extracellulaire unitaire in vivo :

1.1. Chirurgie :

Les animaux sont préalablement anesthésiés à l'uréthane 20% dissous dans du NaCl 0,9 % (1,3 g/kg). Les rats sont disposés et immobilisés sur le cadre stéréotaxique, lui-même placé dans une cage de Faraday. Une incision cutanée médiosagittale est réalisée dans le scalp afin de mettre à nu la boîte crânienne, laquelle est ensuite séchée afin de distinguer les repères anatomiques bregma et lambda. A l'aide de l'atlas stéréotaxique de Paxinos et Watson (1996), la position théorique des structures ciblées est déterminée selon les coordonnées suivantes :

- Striatum : AP : +1,2 mm ; L : -3 mm ; P : 3,5 – 5,5 mm
- Globus Pallidus : AP : -1mm ; L : -3 mm ; P : 5,7 – 7,3 mm
- Noyau sous-thalamique : AP : -3,8mm ; L : -2,5 mm ; P : 6,8 – 8,2 mm
- Substance noire *pars réticulata* : AP : -5,3 mm ; L : -2,5 mm ; P : 7,5 – 8,6 mm

Les coordonnées antéro-postérieure (par rapport au bregma) et latérale (par rapport à la ligne médiane) sont alors reportées sur les axes gradués du cadre stéréotaxique afin de repérer l'aplomb du site d'enregistrement. Une craniectomie est alors réalisée à l'aide d'une fraise permettant le passage et le placement de l'électrode d'enregistrement selon les trois valeurs des coordonnées stéréotaxiques. La dure mère est ensuite dégagée avant de descendre l'électrode dans la structure souhaitée.

1.2. Caractéristique des pipettes :

Les microélectrodes sont préparées à partir de capillaires de verre (150F, WPI, UK) étirés à l'aide d'une étireuse horizontale (WPI, UK). L'extrémité de l'électrode d'enregistrement est cassée sous microscope afin d'obtenir une ouverture dont le diamètre interne est inférieur à $1\mu\text{m}$. L'impédance est mesurée et comprise entre 6 et $11\text{M}\Omega$. Elles sont remplies d'une solution de NaCl 0,9% contenant 4% de bleu de Pontamine.

Pour les enregistrements électrophysiologiques des neurones du NST avec injection locale de drogues au niveau du site d'enregistrement, des doubles électrodes sont confectionnées. Les mêmes électrodes d'enregistrement sont préparées au préalable, puis unifiées à l'aide de colle à composite dentaire à une pipette d'injection angulée dont l'ouverture est de $20\mu\text{m}$. La distance entre les deux extrémités des pipette est d'environ $200\mu\text{m}$. La figure 17 schématise une « double pipette ».

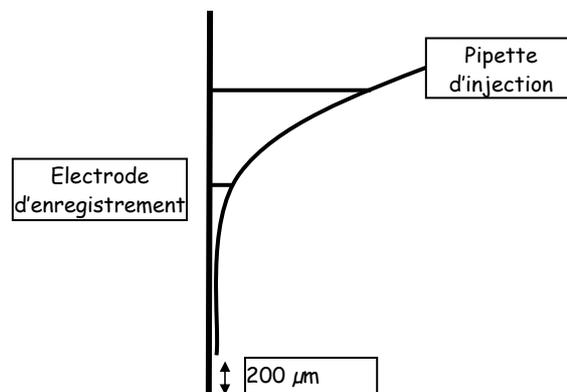


Figure 17 : Schéma d'une double pipette

Les pipettes d'enregistrement et d'injection sont étirées, cassées respectivement à moins d' $1\mu\text{m}$ et $20\mu\text{m}$, assemblées, en espaçant les pointes d'environ $200\mu\text{m}$, et collées (avec de la colle à composite dentaire) sous une loupe binoculaire. Des barreaux sont ajoutés pour solidifier la double pipette.

1.3. Acquisition des signaux :

Les enregistrements extracellulaires unitaires des neurones des structures extra-striatales sont réalisés chez les rats anesthésiés à l'uréthane 20%. Il s'agit de rats contrôles ou ayant subi une lésion du système dopaminergique trois semaines auparavant. L'activité spontanée des neurones est filtrée (bande passante entre 300 Hz et 3 KHz) et amplifiée grâce au système « Neurolog » (Digitimer, USA). L'acquisition du signal est réalisée à l'aide du système « PowerLab » (AD Instruments, USA). L'activité spontanée du neurone est enregistrée de façon continue toutes les dix minutes. Les 30 premières minutes sont utilisées pour s'assurer de la stabilité de l'activité du neurone. Ensuite, la drogue est injectée par voie intra-péritonéale, ou localement au niveau du site d'enregistrement. L'activité neuronale est enregistrée durant 1 à 2 heures jusqu'à l'obtention d'un éventuel retour au niveau de base.

Pour les enregistrements extracellulaires unitaires *in vivo* des neurones striataux, quatre types de neurones peuvent être enregistrés. Les neurones toniques du striatum (TAN : tonically active neurons) sont caractérisés par leur fréquence de décharge régulière comprise entre 2 et 6 Hz. Ils sont supposés être les interneurones cholinergiques. Les interneurones GABA (FSI : fast spiking interneurons) sont caractérisés par la durée de leurs potentiels d'actions, qui est bien plus faible que celle de tout les autres types neuronaux du striatum, ainsi que par leur capacité à décharger en courte bouffées de 2 à 5 potentiels d'actions en réponse à une stimulation corticale (Mallet et al., 2005 et 2006). Ces deux populations d'interneurones n'ont pas été étudiées ici, nous nous sommes intéressés uniquement aux deux autres populations de neurones striataux, les neurones de projections, également appelés neurones épineux de taille moyenne (MSN : medium spiny neurons). Ils projettent directement sur le GP et la SNr. Les MSNs ont été enregistrés dans la partie dorsolatérale du striatum en parallèle avec l'enregistrement de l'activité électrocorticale (EEG). Chez le rat anesthésié à l'uréthane, l'activité corticale montre un rythme caractérisé par des ondes lentes

de large amplitude, dont la fréquence avoisine les 1 Hz. Une stimulation antidromique de la SNr nous a permis de différencier et d'identifier les MSN striato-pallidiaux (de la voie indirecte) et striato-nigraux (de la voie directe), comme précédemment publié par Mallet et collaborateur en 2006. Une électrode bipolaire concentrique (SNEX-100, Rhodes Medical Instrument, USA) est implantée dans le partie dorsale de la SNr (AP : -4,9 mm ; L : -2,4 mm ; P : -8 mm). Les neurones striato-nigraux répondent à la stimulation antidromique de la SNr suivant les critères suivants : (1) latence constance de la réponse, (2) loi du « tout-ou-rien » selon que l'intensité de la stimulation est ajustée juste au dessus ou en dessous du seuil de déclenchement des potentiels d'action, et (3) collision des potentiels d'actions antidromique et orthodromique. La plupart des MSNs étant silencieux ou déchargent à très faible fréquence (<0.1Hz), le potentiel d'action orthodromique requis pour la collision est évoqué par une stimulation cortical, et induira la stimulation antidromique de la SNr alternativement 30 ms ou 3 ms après (**Figure 18**).

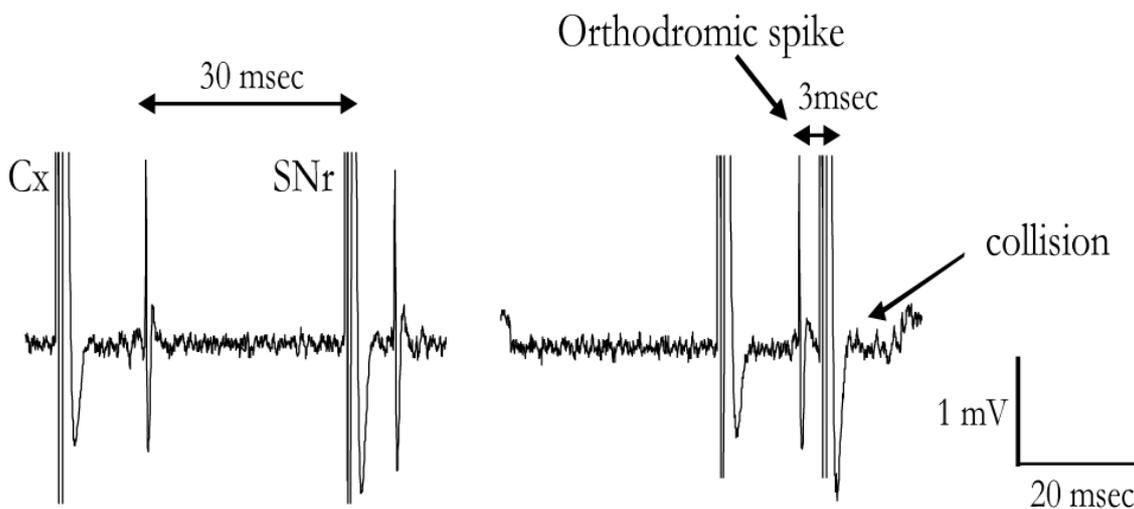


Figure 18 : Identification antidromique des neurones striato-nigraux.

La stimulation corticale engendre un potentiel d'action dit orthodromique au niveau des MSN enregistrés. La stimulation antidromique de la SNr déclenchée 3msec après l'apparition du PA orthodromique provoque une collision entre le PA orthodromique et le PA antidromique qui disparaît alors lorsqu'on est en présence d'un MSN striato-nigral.

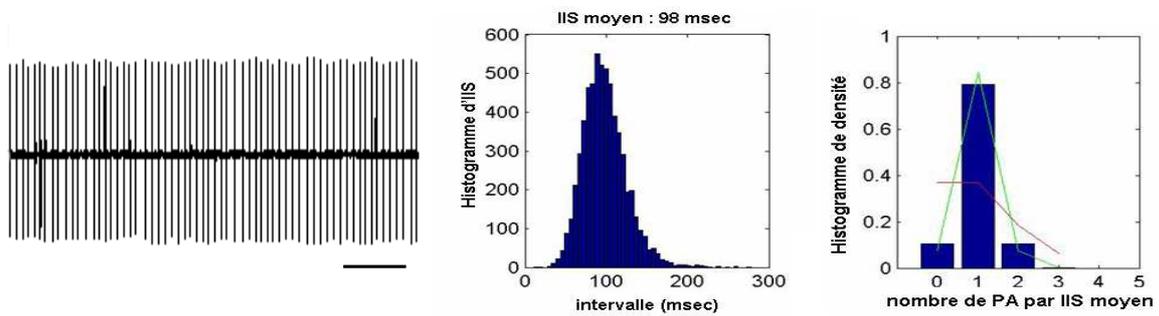
Les MSNs qui ne présentent pas les caractéristiques électrophysiologiques des interneurones, et qui ne répondent pas à la stimulation antidromique de la SNr sont qualifiés comme neurones striato-pallidaux (Mallet et al., 2005). En utilisant un double marquage, les mêmes auteurs ont pu montrer que ces MSNs expriment les ARNm de l'enképhaline, reconnu comme étant un marqueur spécifique des neurones de projections striato-pallidaux.

Dans le but de tester la dynamique striatale en réponse à la stimulation corticale, nous avons utilisés un protocole qui consiste en l'application de vingt paires de stimulation émises à intervalle de 100 ms, comme précédemment décrit (Mallet et al., 2005). Les index utilisés ont donc été l'intensité de stimulation corticale requise pour évoquer 50 % de réponse (10 potentiels d'action sur 20 paires de stimulation), et le nombre de réponse observé obtenu pour une intensité de stimulation corticale donnée.

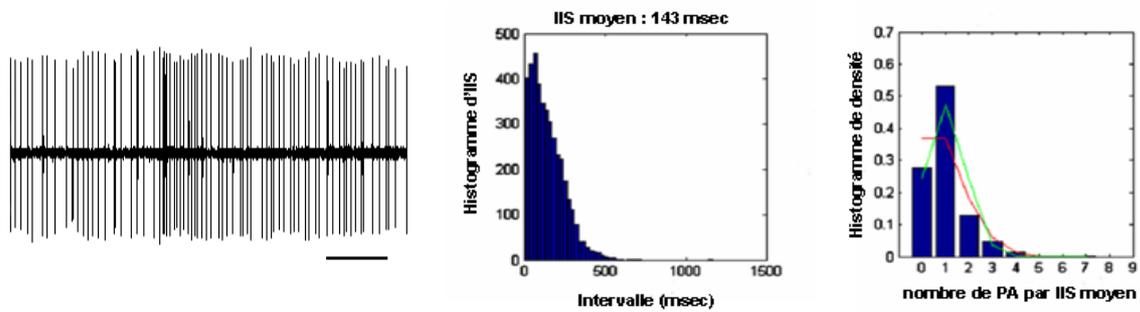
1.4. Analyse de l'activité neuronale enregistrée :

Les enregistrements sont analysés en « off-line » en utilisant trois logiciels de traitement du signal. « Spike histogram » (ADInstruments, USA) permet dans un premier temps de discriminer les potentiels d'action du bruit de fond. Seul « Neuroexplorer » (AlphaIOmega, Allemagne) permet de déterminer les paramètres électrophysiologiques comme la fréquence moyenne de décharge correspondant au nombre de potentiels d'action par seconde, l'intervalle moyen entre les potentiels d'action (IIS), ou encore le coefficient de variation de l'IIS, défini comme le ration de la déviation standard sur l'IIS moyen, ici utilisé comme indice de régularité du mode de décharge. Ensuite, nous avons utilisé un algorithme mis au point au Laboratoire « pattern » nous permettant de déterminer le mode de décharge des neurones selon la méthode de Kaneoke et Vitek (1996). Cette méthode est basée sur le concept de distribution de densité et une définition statistique rigoureuse du mode de décharge. Ainsi, trois modes sont déterminés : régulier, irrégulier, et en bouffées (**Figure 19**).

A- Régulier



B- Irrégulier



C- Bouffées

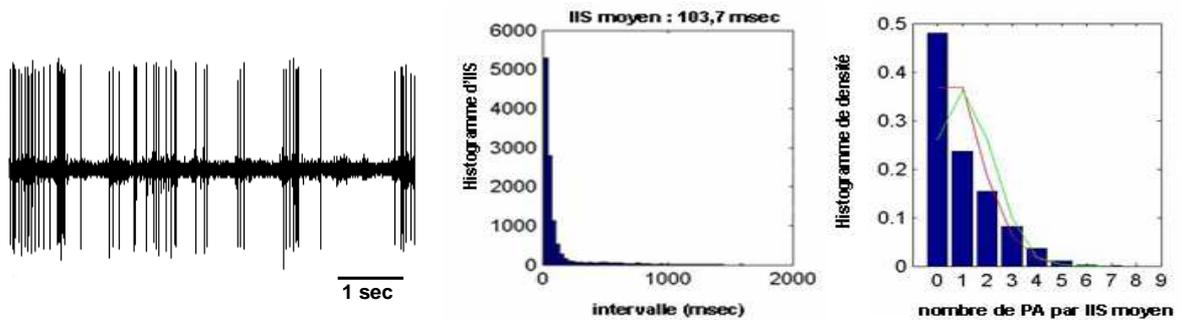


Figure 19 : Les trois types de mode de décharge des neurones du noyau sous-thalamique.

A. régulier, **B.** irrégulier, **C.** en bouffées.

A gauche, un exemple d'enregistrement brut.

Au milieu, l'histogramme d'intervalles inter-spikes (IIS).

A droite, l'histogramme de densité .

A la fin de chaque séance d'enregistrement électrophysiologique, et afin de localiser le site d'enregistrement, une injection iontophorétique (DAM 80i, WPI, UK) de bleu de pontamine est réalisée *via* la pipette d'enregistrement. L'animal est sacrifié, puis le cerveau est prélevé, congelé dans de l'isopentane à - 45°C et stocké à -80°C.

Afin de localiser le site d'enregistrement électrophysiologique ou le site d'injection *in situ*, une coloration histochimique à l'acétylcholine estérase est pratiquée sur les coupes histologiques contenant la structure cible (**Figure 20**). En effet, cette coloration nous a permis de bien distinguer les différentes structures sur les coupes, et le contraste qu'elle produit facilite le repérage du point de bleu de pontamine, matérialisant le site d'enregistrement électrophysiologique. Seuls les rats présentant un point bleu dans les structures d'intérêts ont été sélectionnés pour les analyses statistiques des données électrophysiologiques.

Les coupes sont rincées avec un tampon acétate 0,2 M (27,2 g d'acétate de sodium dans un litre d'eau distillée ; pH 5,9) avant d'être incubées 4h sous agitation dans la solution d'incubation (180 ml de tampon acétate 0,2M, 0,75 g de glycine, 0,5 g de sulfate de cuivre, 0,2 g d'iodure d'acétylcholine). Après un rinçage avec un tampon acétate 0,2M, les lames sont révélées au sulfure d'ammonium (dilué au 1/100^e en tampon acétate 0,2M), puis rincées trois fois avant d'être montées entre lame et lamelle.

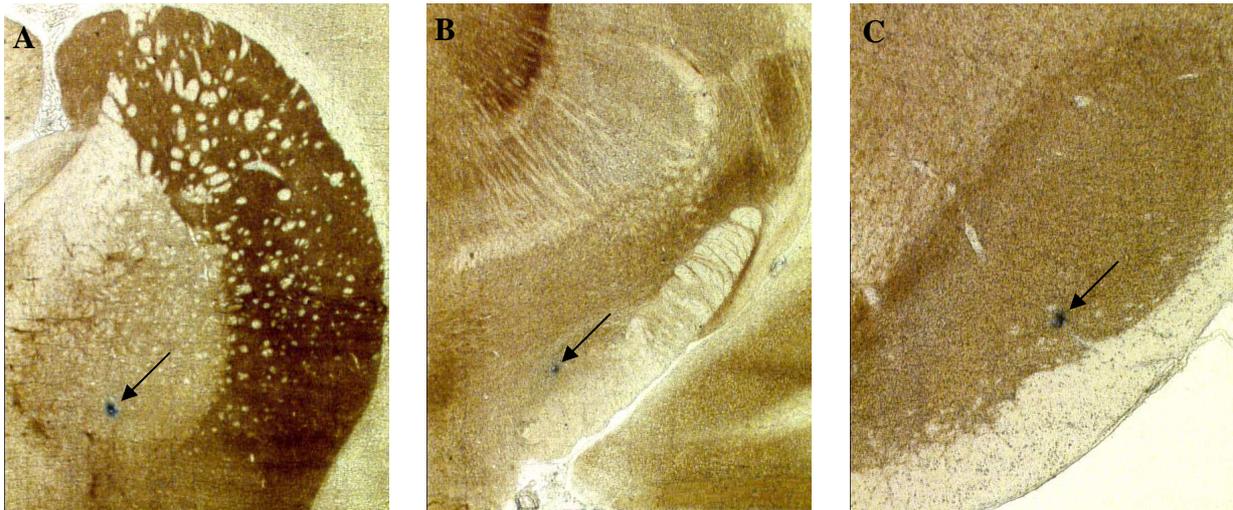


Figure 20 : Localisation du site d'enregistrement électrophysiologique dans le (A) GP, (B) NST, (C) SNr. Le contraste que produit la coloration de l'acétylcholine esterase sur les coupes facilite le repérage du point de bleu de pontamine (flèches).

1.6. Analyses statistiques :

Pour les paramètres électrophysiologiques de fréquence de décharge et de coefficient de variation de l'intervalle inter-spike, les analyses statistiques ont été effectuées suivant une analyse de variances à une voie (one-way ANOVA) à mesure répétée, suivit d'un test post-hoc de Dunnet's.

Pour l'analyse de la répartition des populations neuronales selon leur mode de décharge régulier, irrégulier ou en bouffées, un test χ^2 a été réalisé.

2. Patch-clamp in vitro :

Les expériences d'électrophysiologie *in vitro* ont été réalisées par le Dr. Anne Taupignon du laboratoire Mouvement Adaptation Cognition (CNRS UMR5227), grâce à la technique du patch-clamp « en aveugle » sur tranche de cerveau de rat.

Cette technique consiste à enfoncer une électrode dans une tranche jusqu'à ce qu'elle touche un neurone, en veillant à la maintenir dans les limites du noyau dont on a au préalable repéré les contours sous une loupe binoculaire. Il est nécessaire d'appliquer une pression positive à la pipette afin d'éviter qu'elle ne soit bouchée par des débris cellulaires lors de la descente. L'électrode est descendue dans l'épaisseur de la tranche à l'aide d'un micromanipulateur manuel. Un créneau de potentiel de -10 mV toutes les 10 ms permet de suivre la résistance de la pipette pendant l'approche des neurones. Ce sont les variations de la résistance de la pipette qui indiquent la présence d'un neurone à proximité de la pointe de l'électrode. La pression appliquée est alors immédiatement relâchée. Cette dépression permet de sceller de façon étanche la pointe de la pipette à la membrane du neurone. Cette configuration appelée « cellule attachée » permet d'enregistrer l'activité électrique des neurones sans perturber le milieu intracellulaire. Soumis à de légères dépressions, le patch de membrane sous la pipette casse, donnant accès au milieu intracellulaire du neurone : c'est la configuration « cellule entière ». Dans cette configuration, nous pouvons soit manipuler le potentiel du neurone (mode « courant imposé ») soit enregistrer les courants ioniques traversant la membranes (mode « potentiel imposé »).

2.1. Préparation des tranches :

Des tranches frontales sont préparés à partir de cerveaux de rats Wistar, élevés au laboratoire et âgés de 18 à 22 jours. Après décapitation, le cerveau est rapidement extrait et placé dans un milieu enrichi en sucrose (solution de prélèvement, **table 3**), oxygéné par un mélange de 95%

d'O₂ et 5% de CO₂, et préalablement refroidi entre 0 et 5°C. A cette température, la solution de prélèvement ralentit le métabolisme cellulaire des neurones et la faible concentration en ions sodium et calcium permet de réduire l'excitabilité cellulaire et l'activité synaptique. Le cerveau est ensuite coupé au vibratome (VT 1000S, Leica), et quatre tranches de 350-400 µm d'épaisseur, dont 2 ou 3 contiennent le NST, sont conservées. Chaque tranche est placée contre une membrane poreuse d'où diffuse le mélange O₂-CO₂, dans une cuve contenant le milieu extracellulaire (solution de périfusion, **table 3**). Les tranches peuvent être ainsi conservées vivantes pendant une douzaine d'heures. Après deux heures, une tranche est transférée dans une cuve d'enregistrement de type « immergé ». Une pompe péristaltique est utilisée pour permettre la périfusion de la solution d'enregistrement à un débit constant de 3 ml/min. Un système d'application plus rapide permet l'application de substances-test. Deux capillaires placés en amont de la pipette de patch près de la surface de la tranche appliquent alternativement soit la solution d'enregistrement, soit la solution-test. La solution intra-pipette contient : 120mM Kgluconate, 10mM NaCl, 10mM KCl, 11mM EGTA, 10mM HEPES, 1mM CaCl₂, 2mM ATP-Mg, 0.4mM GTP-2Na (pH= 7.25-7.35, osmolarité 390 mOsm). Pour étudier les propriétés des potentiels plateaux, qui sont les marqueurs de la capacité à produire des bouffées de potentiels d'action *in vitro* (Beurrier et al. 1999), ceux-ci ont été induit par un pulse de courant dépolarisant à partir d'un potentiel de membrane hyperpolarisé à environ -60 mV. Les enregistrements sont effectués en présence d'inhibiteurs de la transmission synaptique rapide (40 µM AVP, 5 µM CNQX, 5 µM GABAzine) et d'un antagoniste D2 afin de d'inhiber les RD2-like (5 µM raclopride).

composition	NaCl	KCl	MgCl ₂	HEPES	CaCl ₂	NaHCO ₃	Glucose	NaH ₂ PO ₄	Sucrose
prélèvement	-	2	7	-	0.5	26	11	1.15	250
périfusion	124	3.6	1.3	1.25	2.4	26	10	-	-

Table 3 : Composition des solutions de prélèvement et de périfusion (en mM).
Osmolarité ~ 310mOsm , pH ~7.35

2.2. Caractéristiques des pipettes :

Les pipettes sont étirées à partir de capillaires de verre borosilicatés (GC150F-10, Clark Electromedical Instrument) à l'aide d'une étireuse verticale (L/M-3P-A, List Medical). Remplies de milieu « potassium gluconate », elles ont une résistance de 11 MΩ.

2.3. Acquisition des signaux :

La mesure du potentiel et du courant membranaire est effectuée grâce à un amplificateur de patch-clamp (Axopatch 1D, Axon Instruments). Les protocoles expérimentaux, l'acquisition et le traitement des données sont réalisés avec le logiciel pClamp (version 9.2, Axon Instruments) et Origin (V..6.1, MicroCAL).

2.4. Analyses statistiques :

Les comparaisons statistiques ont été réalisées en utilisant les tests non paramétriques de Wilcoxon pour les données appariées, et de Mann-Whitney pour celles non appariées. La représentation graphique en « boîtes à moustaches » est utilisée en raison des faibles effectifs. La boîte représente la distribution des données, avec pour ligne centrale la médiane. Les

contours de la boîte représentent les quartiles alors que les moustaches représentent les 5 et 95 percentiles. Le carré correspond à la moyenne.

IV. Tests comportementaux :

1. Evaluation de l'activité motrice globale : actimétrie :

Les conséquences comportementales de la lésion à la 6-OHDA, ainsi que celles de l'injection de l' α -flupentixol sont étudiées en mesurant l'activité locomotrice des animaux. Cette activité est mesurée à l'aide d'un actimètre (Biosep, USA) équipé de deux barres contenant des faisceaux infrarouges. Ce système permet de mesurer 3 types de mouvements : horizontaux, verticaux et stéréotypés. En parallèle à la mesure d'actimétrie, les animaux sont filmés par une caméra et analysés visuellement pour déterminer d'éventuels comportements anormaux, non détectés par le système. Après la chirurgie, les animaux sont habitués à être manipulés par l'expérimentateur. Quatre injections de sérum physiologique (NaCl 0,9%) ont été pratiquées pendant quatre sessions consécutives d'habituatation. A partir du 4^{ème} jour, les injections de NaCl sont alternées avec l'injection d'agoniste inverse D5 et/ou d'antagoniste D2.

2. Evaluation de l'asymétrie : Stepping test :

La lésion unilatérale du système dopaminergique de la voie nigro-striée a pour conséquence d'induire une asymétrie chez l'animal. Ainsi, les troubles moteurs apparaîtront du côté opposé à la lésion (décussation des fibres au niveau du Pont). Le « stepping test » permet d'évaluer cette asymétrie. De ce fait, on compte le nombre d'ajustements que fait l'animal du côté controlatéral (coté opposé à la lésion) en immobilisant ses trois autres pattes,

sur une distance de 90 cm pendant 5 s, en comparaison avec le côté ipsilatéral (côté de la lésion).

Les analyses statistiques ont été réalisées sur 10 animaux selon le test de student, apparié, non paramétrique (Wilcoxon) pour les comparaisons ipsi/contro et selon le test de student non apparié, non paramétrique (Mann-Whitney) pour les comparaisons entre les groupes traités et non traités à l' α -flupentixol.

3. Evaluation de la catalepsie : Bar test :

Le test standard de la barre a été utilisé afin de déterminer le score de catalepsie obtenu par les animaux ayant subi un traitement aux antipsychotiques typiques (α -flupentixol ou halopéridol). Toutes les vingt minutes après l'injection de drogues, et ce pendant trois heures, les deux pattes avant des animaux sont placés sur une barre suspendue à 9 cm de la surface. Nous avons mesurés le temps entre le placement de l'animal sur la barre et le moment où il ôte complètement une patte de la barre. Afin d'éviter tout désagrément à l'animal, nous n'avons pas fait durer l'expérience plus de deux minutes.

V. GTP γ S :

1. Principe :

Le GTP γ S permet de détecter l'activation d'un récepteur grâce à l'utilisation d'un analogue du GTP non hydrolysable radiomarqué. En effet, l'activation, d'un RCPG nécessite le recrutement de GTP, entraînant ainsi un changement de conformation du récepteur et l'activation de la protéine G associée (voir introduction partie III.1.2., et **Figure 21**). Ici, l'utilisation de GTP γ S radiomarqué va donc permettre de quantifier le niveau d'activation des

RCPG du NST dans différentes conditions, puisque le niveau de fixation de ce ligand sera proportionnel au taux d'activation des RCPG présent sur la coupe.

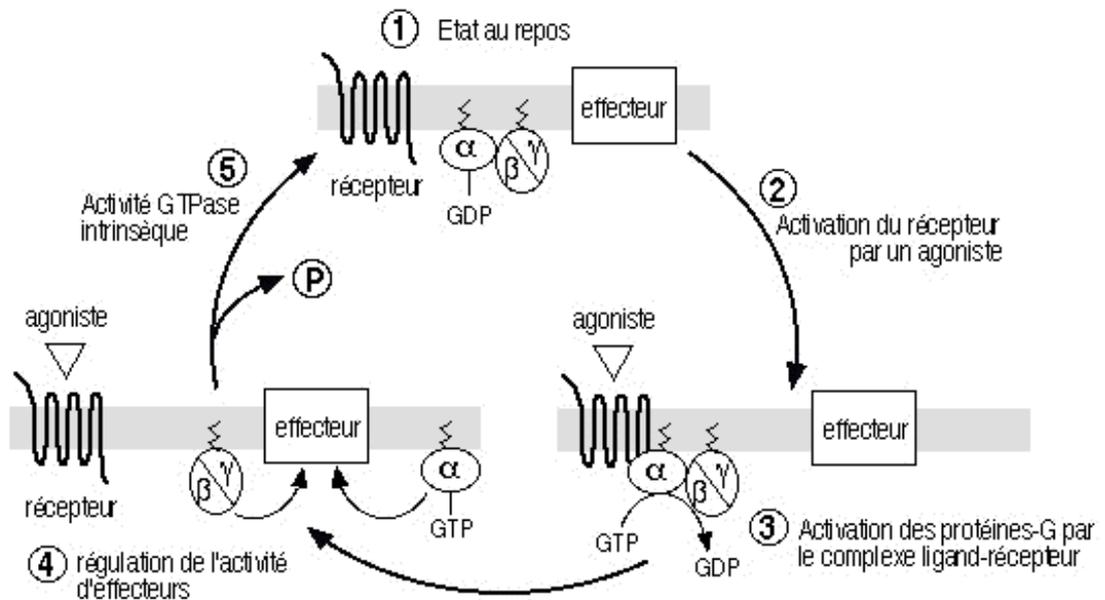


Figure 21 : Cycle d'activation d'un récepteur couplé à la protéine G

Le ligand en se fixant à son récepteur, va activer la protéine G associée à celui-ci, par le recrutement de GTP. Puis le récepteur reviendra à son état initial, c'est-à-dire découplé de la protéine G par l'hydrolyse du GTP en GDP. Dans le protocole expérimental utilisé, la quantité de GTP γ S fixée sera fonction du niveau d'activation des RCPG.

Dans le but de vérifier que les RD5 présente une activité constitutive *in vivo*, nous avons comparé le signal obtenu en conditions basales (n=12 chez 4 animaux) à celui obtenu lorsque les RD5 sont stimulés par un agoniste le SKF 38393 (n=12 chez 4 animaux), par un antagoniste le SCH 23390 (n=12 chez 4 animaux) ou par l' α -flupentixol (n=12 chez 4 animaux). L'analyse statistique a été réalisée selon un test de student, non apparié, non paramétrique (Mann-Whitney).

2. Protocole :

Des coupes de cerveau de 20µm contenant le NST sont incubées vingt minutes à température ambiante dans un tampon de saturation (tampon 1) (composition pour 20 mL de tampon, soit 10 lames : 605 mg de Tris, 61 mg de MgCl₂, 7,608 mg d'EGTA, 584 mg de NaCl et 4 µL d'adénosine déaminase), puis vingt minutes à température ambiante dans un tampon de radioprotection (tampon 2) (composé de 15 mL de tampon 1, 13,3 mg de GDP et 30 µL de DTT), et enfin trente minutes à 30°C dans le tampon d'incubation (tampon 3) (contenant 6 mL de tampon 2 et 60 µL de GTPγ35S). Le tampon est alors divisé en trois fractions, une composée uniquement de tampon 3 (activité basale), une deuxième contenant du tampon 3 et du GTPγS à 2,5 µL/mL (activité non spécifique) et la troisième fraction composée de tampon 3 et de la substance pharmacologique testée (SKF 38393, SCH 23390 ou α-flupentixol). Les coupes sont lavées deux fois avec un tampon Tris-HCl 50 mM pendant quinze minutes à 4°C et séchées, puis elles sont mise en cassette sous film autoradiographique, et conservées en chambre noire pendant 2 à 5 j à 4°C selon l'intensité de marquage désirée. Les films sont révélés en chambre noire par incubation dans différents bains : révélateur, rinçage dans l'eau, fixateur, rinçage dans l'eau et séchés, pour ensuite les quantifier par densitométrie à l'aide d'un logiciel spécialisé (Mercator).

VI. Cytochrome Oxydase :

1. Principe :

Parmi les nombreuses activités métaboliques requises pour maintenir la fonction neuronale, la plus importante correspond au fonctionnement de la pompe Na/K-ATPase, qui consomme environ 60% de la quantité totale d'ATP présente dans le cerveau. Cet ATP provient essentiellement du métabolisme oxydatif du glucose, dont l'étape ultime est

catalysée par le complexe cytochrome oxydase I (CO-I). Ainsi, l'accumulation de CO-I dans une structure donnée, est le reflet direct de son état d'activation.

Grâce à cette technique, nous avons pu comparer les différences d'activité métabolique qui existent en conditions normales, pathologiques, et après application d' α -flupentixol. Pour chaque condition 4 animaux ont été utilisés avec 4 coupes par structure et par animal. L'analyse statistique a été réalisée selon un test non apparié, non paramétrique, le Mann-Whitney.

2. Protocole :

Les expériences ont été réalisées sur des animaux contrôles et lésés à la 6-OHDA ayant reçu une injection locale de NaCl 0,9%, ou sur des animaux lésés 6-OHDA ayant reçu une injection locale d' α -flupentixol puis sacrifiés quatre-vingt-dix minutes après injection. Les cerveaux sont alors prélevés, congelés dans de l'isopentane à $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ puis conservés au congélateur à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Les coupes de Striatum, GP, NST, SNr (d'animaux normaux, lésés et traités) sont placées trente-cinq minutes à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans un tampon d'incubation contenant 100 mL d'HEPES 0,1M pH 7,4 et 4,5 g de sucrose, 22,4 mg de cytochrome C, 115,23 mg de DAB et 125 mg d'ammonium nickel sulfate 1%. Puis la réaction est stoppée avec un tampon de fixation (PAF 4% dans un tampon sodium phosphate) pendant dix minutes. Les lames sont rincées à l'eau distillée avant d'être déshydratées et montées entre lames et lamelles. Elles seront ensuite quantifiées par densitométrie à l'aide d'un logiciel spécialisé (Mercator).

Résultats

I. Implication des récepteurs dopaminergique D5 dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson.

1. Résumé

La maladie de Parkinson est une pathologie neurodégénérative caractérisée par des symptômes moteurs cardinaux : akinésie ou bradykinésie, rigidité, tremblements de repos et troubles de la posture. Ces symptômes sont la conséquence d'une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques de SNc, ce qui provoque une déplétion en dopamine dans le striatum et d'autres structures extrastriatales comme le NST ou le GP. L'organisation fonctionnelle des ganglions de la base est ainsi altérée.

Le NST est considéré comme la « driving force » de cet ensemble de structures puisqu'il exerce une influence excitatrice sur les structures de sortie du système. Il joue un rôle crucial dans l'exécution d'un mouvement volontaire normal. En effet, sa lésion entraîne l'apparition de mouvements anormaux involontaires comme l'hémiballisme. On sait également que les neurones du NST montrent une activité électrique pathologique en bouffées dans les modèles animaux de la maladie de Parkinson ainsi que chez les patients parkinsoniens. De plus, la lésion ou la SHF du NST réduit considérablement tous les symptômes moteurs.

Des études d'hybridation *in situ* ont révélé une forte expression des ARNm codant pour les RD5 au niveau du NST, alors que le taux d'expression des autres récepteurs est faible. De plus, les neurones capables de décharger en bouffées expriment les RD5 et non les RD1 et les bouffées de potentiels d'action sont potentialisées par l'activation des RD5 (augmentation de la durée des bouffées et du nombre de potentiels d'action par bouffée). A l'inverse, l'activation des récepteurs D2 place les neurones hors de la gamme de potentiel où

les bouffées peuvent être déclenchées et remplace la décharge en bouffées par une activité tonique. Les RD5 montrent une caractéristique fonctionnelle qui les différencie des autres types de récepteurs à la dopamine : ils présentent une activité constitutive importante en absence de ligand. Il a été montré que la simple expression des RD5 dans un système hétérologue accumule autant d'AMPC que la stimulation de ces récepteurs par une dose maximale de dopamine. L'activité intrinsèque des RD5 prend donc une importance particulière dans le contexte de la maladie de Parkinson. En effet, quand les symptômes de la maladie apparaissent, la dégénérescence nigrique est déjà avancée et le taux de dopamine circulant est très bas. On peut donc penser que les RD2 ne sont plus activés, alors même que l'activité des RD5 persiste. Dans ce contexte, la capacité à décharger en bouffées ne sera plus réprimée mais au contraire favorisée. On peut alors imaginer que, comme dans d'autres structures, l'activité en bouffées du NST perturbe le traitement de l'information au sein du circuit moteur, contribuant ainsi à l'apparition des symptômes moteurs parkinsoniens.

Notre hypothèse étant que l'activité intrinsèque des RD5 contribue à l'émergence de la décharge en bouffées des neurones du NST quand le niveau de dopamine est bas. Nous avons étudié l'effet de son inhibition, d'une part sur la décharge en bouffées des neurones du NST dans un modèle animal de la maladie de Parkinson, et d'autre part sur les troubles moteurs induits par la déplétion dopaminergique chez le même modèle. L'activité intrinsèque des RD5 a été inhibée par un agoniste inverse : l' α -flupentixol (Martin et coll., 2001).

Dans un premier temps, des études de patch-clamp *in vitro* nous ont permis de caractériser et de choisir l' α -flupentixol comme agoniste inverse des RD5. En effet, il est capable d'induire les effets opposés de ceux observés lors de la stimulation de ces récepteurs par un agoniste : diminution de la durée du potentiel plateau et diminution du nombre de

potentiel d'action dans le potentiel plateau, sans affecter la fréquence de décharge spontanée des neurones du NST.

D'autres part, nous avons également mis en évidence grâce à des expériences de GTP γ S menées *ex vivo*, que les RD5 du NST présentent une activité constitutive *in vivo*, et que celle-ci a été bloquée par l'injection locale d' α -flupentixol. Le blocage de cette activité intrinsèque d'une part, améliore le comportement locomoteur d'animaux rendu hémiparkinsonien par l'injection stéréotaxique de 6-OHDA, et d'autre part réduit la tendance des neurones du NST à décharger en bouffées, signature physiopathologique de la maladie de Parkinson.

De plus, l'injection locale d' α -flupentixol normalise l'hyperactivité métabolique obtenue chez le rat 6-OHDA au niveau du NST et de la SNr.

Les résultats de cette étude démontrent pour la première fois l'implication des RD5 dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson et ainsi ouvrent la voie à de nouvelles approches thérapeutiques de la maladie, basées sur l'utilisation d'agents pharmacologiques spécifiques.

2. Article 1 :

Involvement of Dopamine D5 Receptors in the Pathophysiology of Parkinson's Disease.

Jonathan Chetrit, Anne Taupinon, Stéphanie Morin, Rabia Bouali-Benazzouz, Maurice Garret, Bernard Bioulac, Abdelhamid Benazzouz.

(Soumis)

Involvement of subthalamic dopamine D5 receptors in Parkinson's Disease

Jonathan Chetrit^{1,2*}, Anne Taupignon^{1,2*}, Stephanie Morin^{1,2}, Rabia Bouali-Benazzouz^{1,3}, Maurice Garret^{1,2}, Bernard Bioulac^{1,2}, Christian Gross and Abdelhamid Benazzouz^{1,2,4}

1. Université de Bordeaux, Bordeaux, F-33076, France

2. Centre Nationale de le Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5227 (CNRS UMR 5227), Bordeaux, F-33076, France

3. Institut Nationale de la Santé Et de la Recherche Médicale, Unité 862, Université Victor Segalen, 33076 Bordeaux Cedex, France

4. Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux

* These authors contributed equally to this work

Correspondence should be addressed to Dr. Abdelhamid Benazzouz, CNRS UMR 5227, Université Victor Segalen, 146 rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France

E-mail: abdelhamid.benazzouz@u-bordeaux2.fr

Number of figures: 5

Number of pages: 19

ABSTRACT

Dopamine D5 receptors are characterized by a high constitutive activity. This may contribute to the emergence of burst firing in subthalamic neurons, a pathological activity associated with the motor symptoms in Parkinson's disease. Here we show that local injection of an inverse agonist of D5 receptors into the subthalamic nucleus strongly reduced the burst discharge capacity of neurons *in vitro* and converted pathological burst firing into tonic, single spike-firing in the rat model of the disease. Moreover, the same treatment dramatically alleviated motor impairment in this model and normalized metabolic hyperactivity in the subthalamic nucleus and the *substantia nigra pars reticulata*, the output structure of basal ganglia. Our findings are the first to demonstrate the involvement of D5R in the pathophysiology of Parkinson's disease. This not only represents a major paradigm shift in our understanding of the disease but also opens up new avenues for therapeutic approaches based on specific pharmacological agents.

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is a neurological disorder characterized by a gradual degeneration of dopaminergic neurons in the *substantia nigra pars compacta* (SNc), leading to marked dopamine depletion in the striatum, the primary projection region ¹, as well as extrastriatal nuclei of the basal ganglia, including the subthalamic nucleus (STN) ². As a result, STN neurons, which normally exhibit a tonic discharge pattern, become hyperactive and discharge in bursts ³⁻⁵. It is not known whether this phenomenon plays a key role in parkinsonian motor symptoms (akinesia, rigidity, and rest tremor). However, these symptoms are alleviated by either STN ablation ^{6,7}, high frequency electrical stimulation ^{8,9}, and local pharmacological inhibition ^{10,11}. *In vitro* electrophysiological studies have suggested that dopamine D5 receptors (D5R), a subgroup of the D1 receptor family expressed in the STN ¹² which have the unique property of high agonist-independent constitutive activity ¹³⁻¹⁵, contribute to the emergence of burst firing in STN neurons ^{16,17}. Abnormal burst firing may interfere with normal information processing within the basal ganglia, as it does in other systems ^{18,19}, thus exacerbating PD motor symptoms. We tested the hypothesis that inhibiting the constitutive activity of D5R using an inverse agonist depressed the burst firing of STN neurons, resulting in an alleviation of motor impairment in the 6-hydroxydopamine rat model of PD.

RESULTS

D5R inverse agonists weaken STN burst firing *in vitro*

A number of psychoactive drugs have been shown to act as inverse agonists of recombinant D5R^{13,14,20-22}. Fluphenazine, butaclamol, and flupenthixol exhibit the greatest affinity and specificity for D5R²³. Burst firing in the STN *in vitro* is significantly potentiated by D1 family receptor agonists. Potentiation involves D5R, but not D1R, and results in both an increased number of spikes in each burst and a longer burst duration, with no change in intraburst firing frequency¹⁶. Application of butaclamol and flupenthixol, but not fluphenazine, to STN neurons in rat brain slices, at concentrations used on recombinant D5R (1-2 μM), significantly modified the specific features of evoked bursts (Fig.1a,b), with partial reversibility. Only flupenthixol acted as an inverse agonist of D5R: it was the only drug to significantly reduce mean burst duration as well as the average number of spikes in each burst, without any significant change in the intraburst firing frequency. Burst duration was reduced by 28 % (1.11 ± 0.27 s to 0.79 ± 0.22 s, $n=11$, Wilcoxon matched pairs signed rank test, $p<0.0186$) and the average number of spikes in evoked burst by 33%, (1.11 ± 0.27 to 0.79 ± 0.22 , $n=11$, $p<0.001$), without any significant change in intraburst firing frequency (40 ± 5 Hz and 38 ± 7 Hz; $n=11$, $p>0.8311$). Furthermore, as shown in figure 1c, depicting a neuron that fired spontaneously in bursts in the control condition, flupenthixol application resulted in an irregular discharge of action potentials and burst firing resumed on wash. This made flupenthixol the ideal drug for the following experiments.

D5R in the STN display constitutive activity

In vitro experiments have shown that recombinant D5R exhibit constitutive activity^{13,14}. However, no data are available concerning the activated state of STN D5R. We used a guanosine 5'(γ -[³⁵S] thio)triphosphate (GTP γ -³⁵S) binding assay (Sim et al., 1995, 1996) to examine D5R-activated G proteins in brain slices. SKF 38393, a D1/D5 agonist, stimulated dose-dependent GTP γ -³⁵S binding within the STN (maximum increase over basal level: 61% , one-way ANOVA, $F=12.26$, $p<0.0001$), indicating an increase in the activated state of local D5R (Fig. 2a). Another D1/D5 antagonist, SCH 23390, had no effect (Fig. 2b, one-way ANOVA, $F=1.85$, $p=0.1016$). Flupenthixol had an inverse agonist effect on local D5R, decreasing GTP γ -³⁵S binding by 52% (Fig. 2c, one-way ANOVA, $F=21.90$, $p<0.0001$). Furthermore, as a specificity control, prior incubation with the D1/D5 antagonist blocked the effect of both the D1/D5 agonist and D5R inverse agonist (Fig. 2d). Taken together, these data provide the first evidence of D5R constitutive activity within the STN and confirm the inverse agonist property of flupenthixol.

A D5R inverse agonist reverses STN burst firing

Extracellular recordings in urethane-anesthetized rats ($n=12$) were used to test the hypothesis that flupenthixol reduced the burst discharge capacity of STN neurons *in vivo*. Single unit recordings in the STN of dopamine-depleted rats exhibited a higher percentage of burst-firing neurons than sham-lesioned rats [53.3% (34/63 neurons) vs 13.5% (8/59)]. Interestingly, local application of flupenthixol in the STN turned the pathological burst-firing activity into tonic, single-spike firing ($n=6/6$, $\chi^2=8.00$, $p=0.0047$), without any effect on

regularly-discharging neurons (Fig. 3) ($n=6/6$, $\chi^2=0.00$, $p=1$). No significant modification in the firing rate was observed ($F=0.59$, $p=0.71$). As flupenthixol also exerts a D2R antagonist activity, we examined the effect of local injection of raclopride on neuronal activity in the STN ($n=12$) of 12 urethane-anesthetized rats. Raclopride did not modify the firing rate ($F=0.77$, $p=0.83$) or the firing pattern of any of the STN neurons tested ($\chi^2=0.00$, $p=1$) (Fig. 3). Saline injection under the same conditions did not induce any change in the firing rate ($F=0.71$, $p=0.54$) or pattern of STN neurons ($\chi^2=0.00$, $p=1$).

Together, these results demonstrate that the impact of flupenthixol on firing patterns was mediated by D5R in the STN.

A D5 inverse agonist alleviates motor impairment

To test the hypothesis that flupenthixol reversed motor impairment induced by dopamine depletion, we assessed the behavior of adult male rats following intrasubthalamic injection with flupenthixol or saline. The outcome of dopamine depletion by 6-OHDA and flupenthixol treatment was assessed by analyzing spontaneous locomotor activity, using an open field actimeter, and asymmetry in forelimb motor activity, using the stepping test. These motor behaviors were assessed 3 to 4 weeks after dopamine depletion. As previously shown^{24,25}, dopamine depletion impaired locomotor activity, reducing mean scores by 44% in dopamine-depleted rats compared to sham-lesioned animals (Mann-Whitney test, $p=0.0313$). Local flupenthixol injection (4 μ g in 200nl) significantly improved locomotor activity, which increased by 39%, in comparison with the measurements following a saline injection on the previous day (Fig. 4a, $n=19$, Wilcoxon test, $p=0.0144$). In a post-challenge test to verify that this increase was due to flupenthixol injection, all the rats received a saline injection on the next day and were re-exposed to the actimeter. Every time the saline vehicle was injected, there was no significant difference between pre- and post-injection measurements (data not

shown). Once again, in view of flupenthixol's D2R antagonist activity, the effects of raclopride, a selective D2R antagonist, on locomotor activity were investigated. Injecting raclopride into the STN (4 μ g in 200nl) had no effect (Fig. 4a, $n=15$, $p=0.7250$), confirming that the beneficial impact of flupenthixol was due to its action on D5R in the STN. In agreement with previous studies²⁶, unilateral dopamine depletion led to a 66% deficit in contralateral paw use (8.86 \pm 0.49 ipsilateral vs 2.98 \pm 0.53 contralateral, Wilcoxon test, $p<0.0001$, Figure 4b). Local injection of flupenthixol into the STN on the dopamine-depleted side alleviated this asymmetry by 65.62 \pm 0.53% (2.98 \pm 0.53 vs 5.76 \pm 1.03 Mann-Whitney test, $p=0.0137$). Local flupenthixol application in the STN thus alleviated the motor symptoms of dopamine-depleted rats.

A D5 inverse agonist normalizes metabolic activity

The metabolic correlates of motor improvement were investigated by measuring the expression of cytochrome oxidase (COx), an endogenous marker for neuronal activity^{27,28}, in the STN and its efferent structure, the *pars reticulata of substantia nigra*, the principal output structure of the basal ganglia in the rat. As previously reported²⁹⁻³¹, following dopamine depletion by 6-OHDA in rats ($n=4$), the COx expression level in the STN (74.5%, $p<0.0001$) and SNr (146.5%, $p<0.0001$) was significantly higher than in sham-lesioned animals ($n=4$) (Fig. 5). Furthermore, an increase in activity was also observed in the Zona Incerta. This abnormal hyperactive metabolism was normalized by injecting flupenthixol into the STN, using the same protocol applied to test motor behavior. Flupenthixol induced a significant decrease in COx levels in the STN (78.6%, $n=4$ rats $p=0.0002$) and SNr (151.2%, $n=4$ rats, $p=0.0028$). Similar results were obtained in sham-lesioned animals ($n=4$ rats, STN, $p=0.3828$; SNr, $p=0.7193$). These data show that the blockade of STN D5R constitutive activity reversed metabolic hyperactivity generated by dopamine depletion in both the STN and SNr.

DISCUSSION

Our results revealed the agonist-independent constitutive activity of D5R in the STN and demonstrated that it was blocked by flupenthixol, an inverse agonist. Constitutive activity, the functional signature of D5R, has been suggested to contribute to burst firing in STN neurons *in vitro*^{16,17}. It was blocked by flupenthixol, resulting in a reduction in the burst-discharge capacity of STN neurons in rat brain slices. Interestingly, in dopamine-depleted rats, when flupenthixol was injected directly into the STN, the pathological burst firing of STN neurons became a tonic single-spike firing and, subsequently, alleviated the subjects' motor impairment, previously induced by dopamine depletion. As flupenthixol is not only an inverse agonist of D5R, but also an antagonist of D2R, the fact that intrasubthalamic injection of raclopride, a selective D2R antagonist, had no electrophysiological or behavioral effects, ruled out the involvement of D2R. However, as D5R is a subtype of the D1R family, the effects observed may be due to the action of flupenthixol on D1R. This is not the case, as D5R, but not D1R, potentiate burst firing in STN neurons by modulating an L-type calcium conductance¹⁶. This is in agreement with the findings of the only study using *in situ* hybridization for dopamine D1, D2, D3, and D5 receptor mRNAs¹², which revealed that only D5R mRNA was highly expressed in STN neurons. Similarly, other studies have failed to detect D1R mRNA in rat and human STN³²⁻³⁴.

Burst firing is a hallmark of PD. These experiments revealed that flupenthixol did not modify the mean firing rate of STN neurons or the firing pattern of the tonically-discharging neurons, but turned pathological burst-firing activity into tonic single-spike firing. These results strongly support the involvement of D5R in the burst firing of STN neurons. In several brain systems burst firing patterns have been shown to contribute to enhanced synaptic

neurotransmitter release, compared to tonic single-spike firing³⁵⁻³⁷. If this is the case in the STN, the enhanced proportion of burst firing recorded after dopamine depletion may translate into functional hyperactivity, expressed, for example, by an increase in COx expression levels in the STN and its major efferent target, the SNr^{31,38}. Accordingly, in 6-OHDA-lesioned rats COx expression levels in the STN and SNr increased dramatically compared with those of sham-lesioned animals and flupenthixol normalized this pathological metabolic hyperactivity in these two major basal ganglia structures. This parallels the switch from pathological burst firing to normal tonic firing, assumed to be responsible for the attenuation of parkinsonian motor impairment.

Our findings are the first to demonstrate the involvement of D5R in the pathophysiology of PD due to their constitutive activity. Furthermore, application of a D5R inverse agonist attenuated motor impairment. This not only represents a major paradigm shift in our understanding of the pathophysiology of PD but also opens up new avenues for therapeutic approaches based on specific pharmacological agents.

Acknowledgements

We thank L. Cardoit for technical assistance. This work was supported by grants from the Fondation de France, the University Victor Segalen, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), and the Institut Fédératif de Recherche (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale No. 8; CNRS No 13). J.C. was supported by a fellowship from the Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie (France).

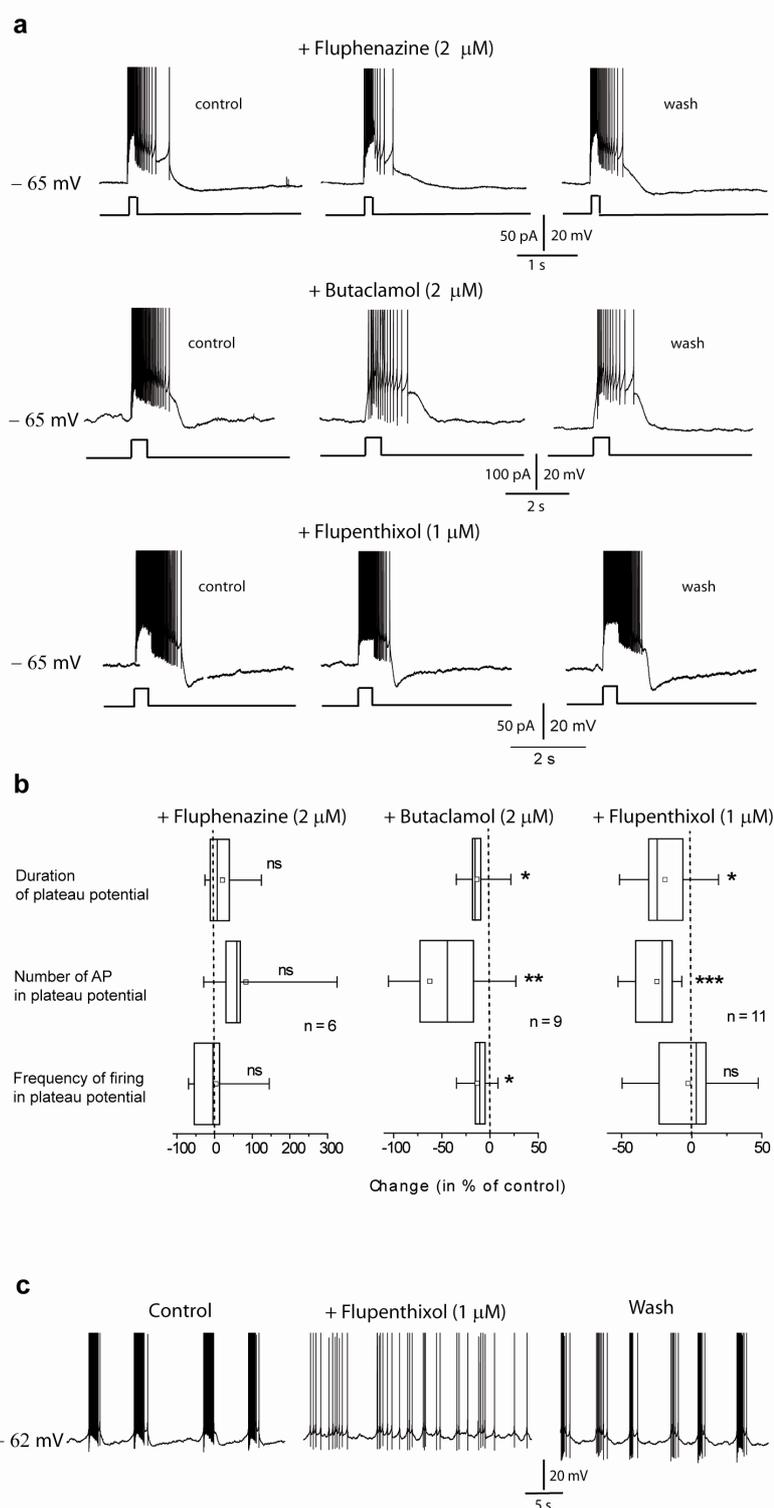
Author contributions

Experiments conceived and designed by: J. Chetrit, A.Taupignon, M. Garret, B. Bioulac and A. Benazzouz. Experiments performed by: J. Chetrit, A. Taupignon, S. Morin, R. Bouali-Benazzouz. Data analyzed by: J. Chetrit, A. Taupignon. Paper written by: J. Chetrit, A. Taupignon and A. Benazzouz.

FIGURES AND LEGENDS

Figure 1: Flupenthixol weakens evoked bursts in burst-competent neurons and minimise spontaneous burst firing.

Of the three antipsychotics, fluphenazine, butaclamol and flupenthixol, described as inverse agonists of recombinant D5 receptors in heterolog systems, butaclamol and flupenthixol significantly weaken evoked bursts. Flupenthixol only affected burst duration and number of action potentials fired per burst whilst leaving firing frequency unchanged in the same way as agonists of D5 receptors do. Flupenthixol reduced, whereas agonists increased, both parameters, thus behaving as an inverse agonist of D5 receptors. (a) Representative examples of the action of the 3 drugs on bursts (top traces) evoked by depolarizing stimuli (bottom traces) in subthalamic neurons patched in coronal mid-brain slices. (b) Box plot summary of typical features of evoked bursts with the 3 drugs. (c) Flupenthixol turns burst firing into irregular firing in a neuron that was found spontaneously bursting. Note that the bath contained inhibitors of fast synaptic transmission and raclopride, an inhibitor of D2R.



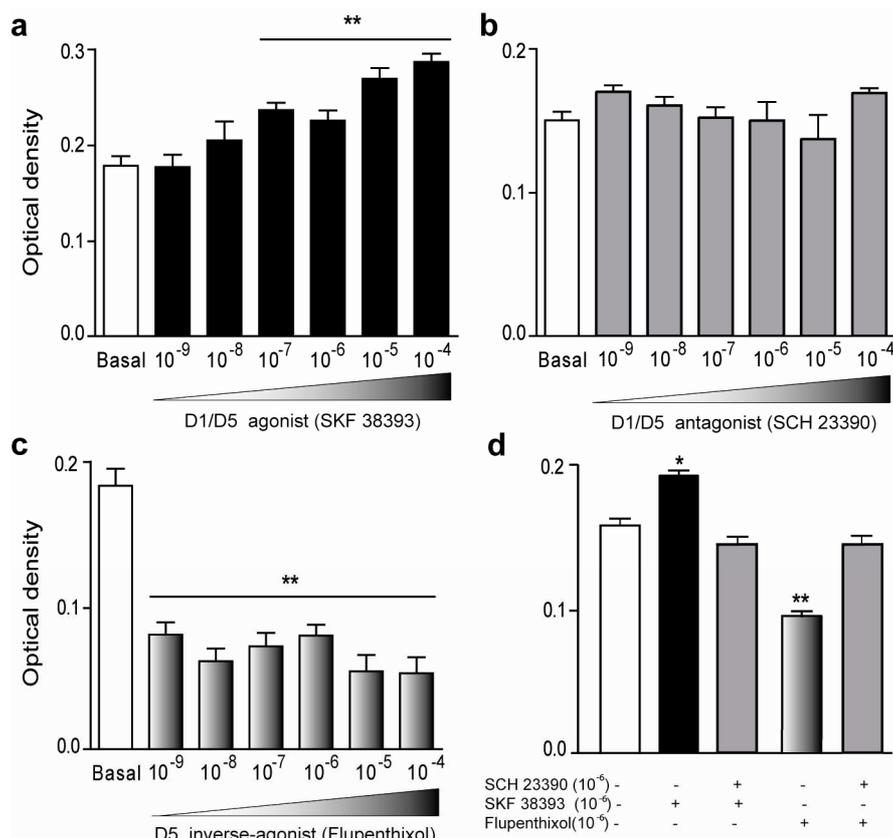


Figure 2: D5R located in the rat STN exhibit constitutive activity, which can be blocked by flupenthixol.

(a-c) Histograms showing the dose response effects of D1/D5 receptor agonist, SKF 38393 (a) and antagonist, SCH 23390 (b) and D5R inverse agonist, flupenthixol (c) on GTP γ S binding in the STN as assessed by optical density. (d) SCH 23390 blocked the effects of both SKF 38393 and flupenthixol. Data represent mean \pm s.e.m. of optical density values. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, compared with basal optical density.

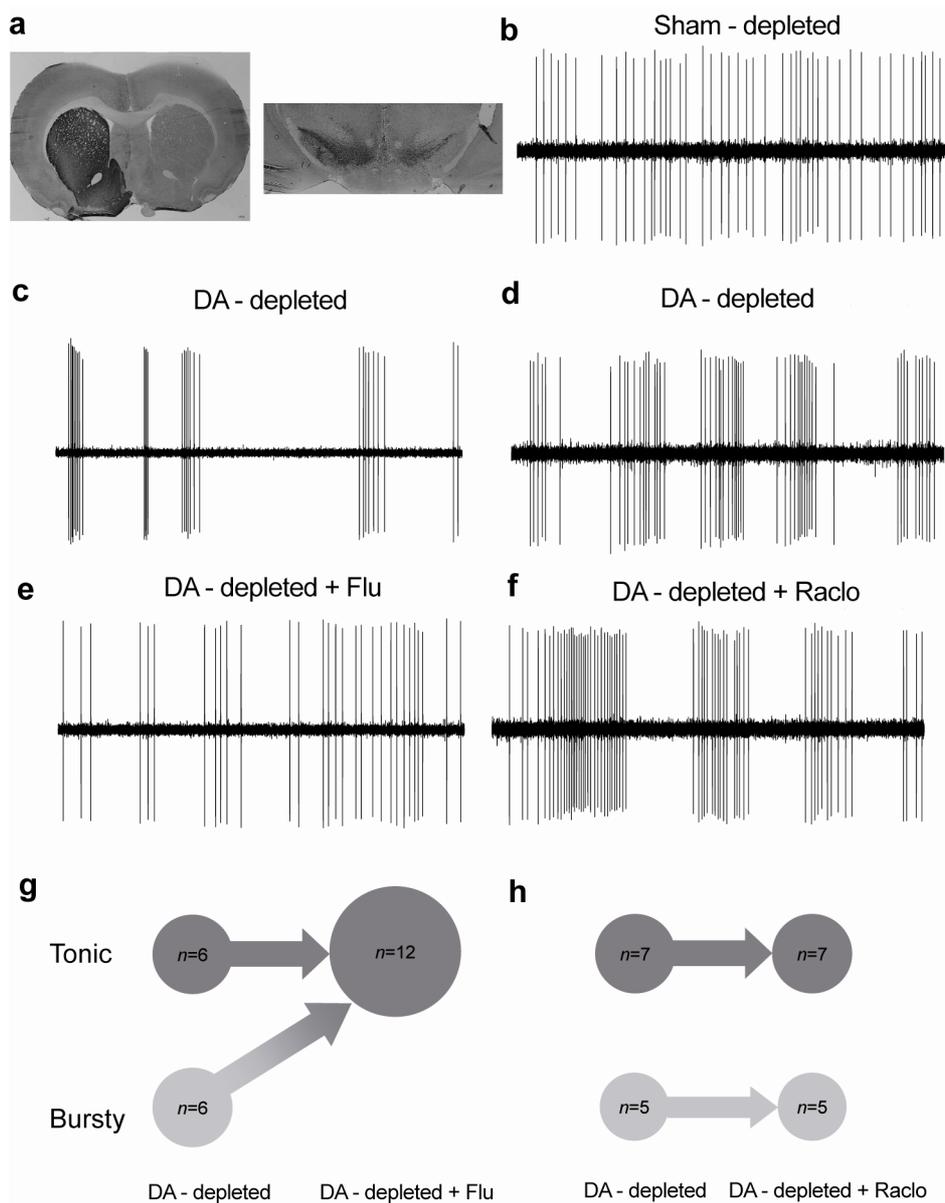


Figure 3: Flupenthixol reverses the pathological burst firing activity of STN neurons

(a) Representative photomicrographs of the striatum (left) and the *pars compacta* of *substantia nigra* (SNc, right) obtained by immunohistochemistry of tyrosine hydroxylase of brain slices from a dopamine-depleted rat. Note the dramatic lesion of cell bodies in the SNc and fibers in the striatum ipsilateral to the side, which received stereotactic injection of 6-hydroxydopamine into the medial forebrain bundle. (b-h) Representative examples of spike trains recorded from STN neurons in sham-lesioned (b) and 6-OHDA-lesioned rats before (c,d) and after local injection of flupenthixol (Flup, e) or raclopride (Raclo, f). (g,h) Schematic representation of the effects of flupenthixol (g) or raclopride (h) on STN neurons discharging in tonic single spike or burst firing. Note that only flupenthixol was able to turn the pathological burst firing activity into a tonic single spike firing activity.

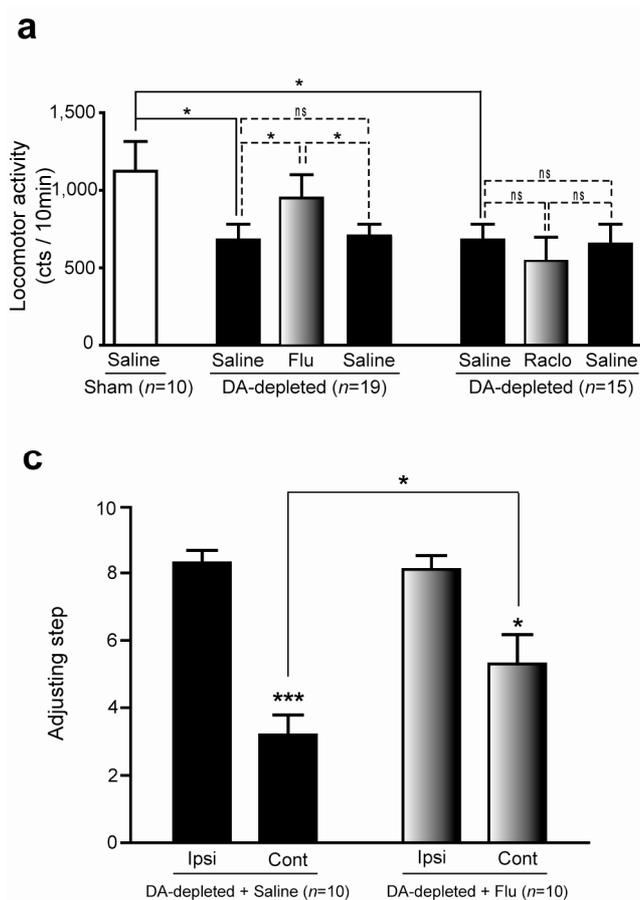


Figure 4: Flupenthixol reduces motor disabilities in dopamine-depleted rats.

(a) Locomotor activity counts in sham-lesioned rats ($n=10$, white bars), and 6-OHDA unilaterally-lesioned rats before (black bars) and after (grey bars) local injection of flupenthixol (Flup, $n=19$) and raclopride (Raclo, $n=15$) into the STN ($4\mu\text{g}/200\text{nl}$). Only flupenthixol improved locomotor activity of 6-OHDA-lesioned rats. (b) The asymmetry in paw use was partially but significantly reversed by local injection of flupenthixol into the STN ($n=10$). Values are presented as the mean \pm s.e.m. *: $p<0.05$, ***: $p<0.0001$, ns: non significant. Full and dashed lines: Mann-Whitney and the Wilcoxon matched-pairs signed ranks test, respectively.

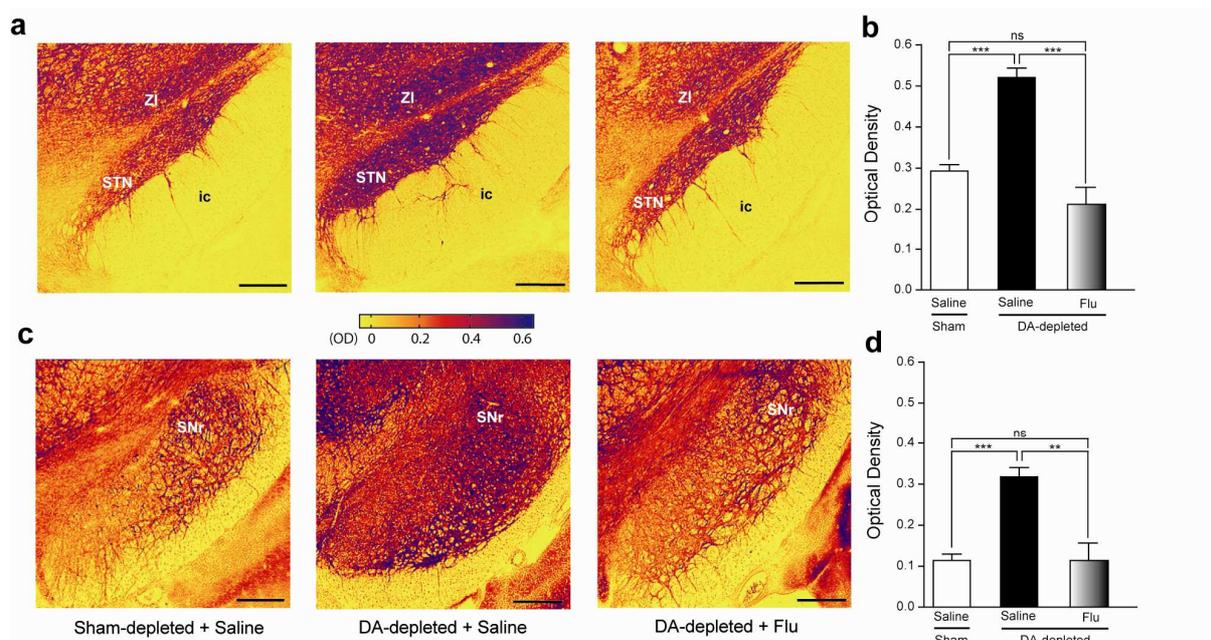


Figure 5: Flupenthixol normalizes the metabolic overactivity in the STN and SNr

(a,c) Representative photomicrographs of the metabolic activity revealed by cytochrome oxidase staining in the STN (a) and SNr (c). (b,d) STN and SNr overactivity in dopamine depleted rats (black bars), in comparison with sham-lesioned animals (white bars), was normalized by a flupenthixol (Flu) injection into the STN (grey bar). Data represent mean \pm s.e.m. of optical density values. ***: $p < 0.0001$, **: $p < 0.001$ ns: non significant. Scale bar: 250 μ m. Note that, in addition to the increased level of COx in the STN and SNr, the figure 5 shows an increased level of COx in the *zona incerta* (ZI) in agreement with a previous study showing hyperactivity of ZI neurons in hemiparkinsonian rats⁴¹.

METHODS

Animals

Experiments were carried out on *Wistar* rats (Charles River, L'Arberesle, France) according to published procedures and methods^{40,41}. The study received approval from the local "Aquitaine et Poitou-Charente" Ethics Committee (Bordeaux, France).

In vitro experiments

In vitro patch clamp electrophysiology was performed as previously described¹⁶. As fluphenazine (dihydrochloride salt), flupenthixol (cis-(z)flupenthixol dihydrochloride) and butaclamol, ((+)-butaclamol hydrochloride, all supplied by Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) exert a D2 antagonist activity, the bath solution was supplemented with raclopride (5 μ M), a pure D2 antagonist. Bursts were evoked every 20-30 sec and their typical features were measured off line throughout the recordings (usually lasting 15-20 min), using pClamp software (Molecular Devices, Foster City, CA). The control values were then calculated from the average of the 6 evoked bursts preceding drug application, while the test values were the mean of the 3 bursts before and after the burst showing the maximum change.

Ex vivo experiments

GTP γ -³⁵S binding autoradiography. Agonist or antagonist receptor-stimulated GTP γ -³⁵S binding in the STN was measured by autoradiography, as previously described^{42,43}. *Ex vivo* STN-containing brain coronal slices were incubated in GTP γ -³⁵S (0.04 nM) at 25°C for 30 minutes, in the absence (basal conditions) or presence (stimulated conditions) of the drugs (SKF 38393, SCH 23390 or flupenthixol) at 6 different concentrations. After exposure to β -radiation-sensitive film, relative GTP γ -³⁵S autoradiographic binding was materialized by

optical density (OD) values in the STN, measured using the Mercator image analysis system (ExploraNova, La Rochelle, France). ^{14}C standards were used to ascertain that all values were in a linear domain range.

***In vivo* experiments**

Rats weighing 280-300 g received stereotaxic unilateral injections of 6-OHDA (Sigma, France) or its saline vehicle into the medial forebrain bundle 3-4 weeks before behavioral testing and electrophysiological recordings, as previously described ⁴⁰. The effectiveness of the 6-OHDA lesion was assessed using tyrosine hydroxylase immunoreactivity, as previously reported ⁴⁴. To assess the behavioral effects of drug injection into the STN, rats were chronically implanted with guide cannulae (Phymep, Paris, France) using stereotaxy under chloral-hydrate anesthesia (400 mg/kg, i.p., Sigma). The tip of the guide cannula was lowered to 1 mm above the STN, according to the Paxinos and Watson brain atlas ⁴⁵.

Cytochrome oxidase (COx) histochemistry. The COx histochemical reaction was quantified using the metal-enhanced technique, as previously described ^{30,46}. COx activity was analyzed by densitometry, using the Mercator system, as previously described ^{30,47}. Digital images of each stained section were obtained and optical density was measured on four consecutive sections throughout the STN and SNr.

In vivo extracellular electrophysiology. Single-unit recordings were made in rats anesthetized with urethane (1.2 g/kg, i.p.), as previously reported ^{40,41}. A double-barreled pipette assembly, similar to that described previously ⁴⁸, was used for STN neuronal activity recordings and simultaneous local microinjection of the drugs. Basal firing of the neurons was recorded for 20 minutes before drug injection to ascertain the stability of discharge activity, then

flupenthixol, raclopride, or the saline vehicle were injected directly into the STN, using brief pulses of pneumatic pressure (Picospritzer III, Royston Herts, U.K.). In all experiments, a total volume of 20 nl was infused over 200 msec. Firing patterns were analyzed using the method developed by Kaneoke and Vitek⁴⁹, as previously described^{38,50}.

Behavioral assessment. Spontaneous locomotor activity was measured using a photoelectric actimeter (Actitrack, Bioseb, France), as previously described^{40,41}. Flupenthixol or raclopride (4µg/200nl saline, Sigma) was then injected directly into the STN and locomotor activity was measured again. A post challenge test of spontaneous locomotor activity took place one day after drug injection. The stepping test²⁶ was used to assess the asymmetry induced by a unilateral lesion of the nigrostriatal pathway. Values represent the number of adjusting steps.

Statistical analyses

Statistical analyses were carried out using Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA). The Mann-Whitney and Wilcoxon matched-pairs signed ranks test were used to compare behavioral and patch clamp data from different groups and the same animals before and after treatment, respectively. The unpaired t-test was used for COx histochemistry and GTPγ-³⁵S data. For electrophysiological analysis, firing rates before and after drug injection were compared using a one-way ANOVA with repeated measures, followed by the Dunnett's test (post-hoc), and the distribution of the firing pattern was assessed using a χ^2 test.

REFERENCES

1. Ehringer, H. & Hornykiewicz, O. [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system.]. *Klin Wochenschr* **38**, 1236-1239 (1960).
2. Smith, Y. & Villalba, R. Striatal and extrastriatal dopamine in the basal ganglia: an overview of its anatomical organization in normal and Parkinsonian brains. *Mov Disord* **23 Suppl 3**, S534-547 (2008).
3. Benazzouz, A., *et al.* Intraoperative microrecordings of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease. *Mov Disord* **17 Suppl 3**, S145-149 (2002).
4. Bergman, H., Wichmann, T., Karmon, B. & DeLong, M.R. The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism. *J Neurophysiol* **72**, 507-520 (1994).
5. Hutchison, W.D., *et al.* Neurophysiological identification of the subthalamic nucleus in surgery for Parkinson's disease. *Ann Neurol* **44**, 622-628 (1998).
6. Gill, S.S. & Heywood, P. Bilateral dorsolateral subthalamotomy for advanced Parkinson's disease. *Lancet* **350**, 1224 (1997).
7. Bergman, H., Wichmann, T. & DeLong, M.R. Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science* **249**, 1436-1438 (1990).
8. Benazzouz, A., Gross, C., Feger, J., Boraud, T. & Bioulac, B. Reversal of rigidity and improvement in motor performance by subthalamic high-frequency stimulation in MPTP-treated monkeys. *Eur J Neurosci* **5**, 382-389 (1993).
9. Limousin, P., *et al.* Bilateral subthalamic nucleus stimulation for severe Parkinson's disease. *Mov Disord* **10**, 672-674 (1995).
10. Baron, M.S., Wichmann, T., Ma, D. & DeLong, M.R. Effects of transient focal inactivation of the basal ganglia in parkinsonian primates. *J Neurosci* **22**, 592-599 (2002).
11. Levy, R., *et al.* Lidocaine and muscimol microinjections in subthalamic nucleus reverse Parkinsonian symptoms. *Brain* **124**, 2105-2118 (2001).
12. Svenningsson, P. & Le Moine, C. Dopamine D1/5 receptor stimulation induces c-fos expression in the subthalamic nucleus: possible involvement of local D5 receptors. *Eur J Neurosci* **15**, 133-142 (2002).
13. Tiberi, M. & Caron, M.G. High agonist-independent activity is a distinguishing feature of the dopamine D1B receptor subtype. *J Biol Chem* **269**, 27925-27931 (1994).
14. D'Aoust, J.P. & Tiberi, M. Role of the extracellular amino terminus and first membrane-spanning helix of dopamine D1 and D5 receptors in shaping ligand selectivity and efficacy. *Cell Signal* (2009).
15. Demchyshyn, L.L., McConkey, F. & Niznik, H.B. Dopamine D5 receptor agonist high affinity and constitutive activity profile conferred by carboxyl-terminal tail sequence. *J Biol Chem* **275**, 23446-23455 (2000).
16. Baufreton, J., *et al.* D5 (not D1) dopamine receptors potentiate burst-firing in neurons of the subthalamic nucleus by modulating an L-type calcium conductance. *J Neurosci* **23**, 816-825 (2003).
17. Baufreton, J., *et al.* Dopamine receptors set the pattern of activity generated in subthalamic neurons. *FASEB J* **19**, 1771-1777 (2005).
18. McCormick, D.A. & Contreras, D. On the cellular and network bases of epileptic seizures. *Annu Rev Physiol* **63**, 815-846 (2001).

19. Moore, S.J., Cooper, D.C. & Spruston, N. Plasticity of burst firing induced by synergistic activation of metabotropic glutamate and acetylcholine receptors. *Neuron* **61**, 287-300 (2009).
20. Charpentier, S., Jarvie, K.R., Severynse, D.M., Caron, M.G. & Tiberi, M. Silencing of the constitutive activity of the dopamine D1B receptor. Reciprocal mutations between D1 receptor subtypes delineate residues underlying activation properties. *J Biol Chem* **271**, 28071-28076 (1996).
21. Tumova, K., Iwaszow, R.M. & Tiberi, M. Insight into the mechanism of dopamine D1-like receptor activation. Evidence for a molecular interplay between the third extracellular loop and the cytoplasmic tail. *J Biol Chem* **278**, 8146-8153 (2003).
22. Tumova, K., Zhang, D. & Tiberi, M. Role of the fourth intracellular loop of D1-like dopaminergic receptors in conferring subtype-specific signaling properties. *FEBS Lett* **576**, 461-467 (2004).
23. Martin, M.W., Scott, A.W., Johnston, D.E., Jr., Griffin, S. & Luedtke, R.R. Typical antipsychotics exhibit inverse agonist activity at rat dopamine D1-like receptors expressed in Sf9 cells. *Eur J Pharmacol* **420**, 73-82 (2001).
24. Sim, L.J., Hampson, R.E., Deadwyler, S.A. & Childers, S.R. Effects of chronic treatment with delta9-tetrahydrocannabinol on cannabinoid-stimulated [35S]GTPgammaS autoradiography in rat brain. *J Neurosci* **16**, 8057-8066 (1996).
25. Sim, L.J., Selley, D.E. & Childers, S.R. In vitro autoradiography of receptor-activated G proteins in rat brain by agonist-stimulated guanylyl 5'-[gamma-[35S]thio]-triphosphate binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7242-7246 (1995).
26. Fornaguera, J., Carey, R.J., Huston, J.P. & Schwarting, R.K. Behavioral asymmetries and recovery in rats with different degrees of unilateral striatal dopamine depletion. *Brain Res* **664**, 178-188 (1994).
27. Miklyaeva, E.I., Martens, D.J. & Whishaw, I.Q. Impairments and compensatory adjustments in spontaneous movement after unilateral dopamine depletion in rats. *Brain Res* **681**, 23-40 (1995).
28. Olsson, M., Nikkhah, G., Bentlage, C. & Bjorklund, A. Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *J Neurosci* **15**, 3863-3875 (1995).
29. Hirsch, E.C., *et al.* Metabolic effects of nigrostriatal denervation in basal ganglia. *Trends Neurosci* **23**, S78-85 (2000).
30. Wong-Riley, M.T. Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci* **12**, 94-101 (1989).
31. Benazzouz, A., *et al.* High-frequency stimulation of both zona incerta and subthalamic nucleus induces a similar normalization of basal ganglia metabolic activity in experimental parkinsonism. *FASEB J* **18**, 528-530 (2004).
32. Vila, M., *et al.* Evolution of changes in neuronal activity in the subthalamic nucleus of rats with unilateral lesion of the substantia nigra assessed by metabolic and electrophysiological measurements. *Eur J Neurosci* **12**, 337-344 (2000).
33. Blandini, F., Levandis, G., Bazzini, E., Nappi, G. & Armentero, M.T. Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in the rat: new clues from an old model. *Eur J Neurosci* **25**, 397-405 (2007).
34. Boyson, S.J., McGonigle, P. & Molinoff, P.B. Quantitative autoradiographic localization of the D1 and D2 subtypes of dopamine receptors in rat brain. *J Neurosci* **6**, 3177-3188 (1986).

35. Fremeau, R.T., Jr., *et al.* Localization of D1 dopamine receptor mRNA in brain supports a role in cognitive, affective, and neuroendocrine aspects of dopaminergic neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 3772-3776 (1991).
36. Augood, S.J., Hollingsworth, Z.R., Standaert, D.G., Emson, P.C. & Penney, J.B., Jr. Localization of dopaminergic markers in the human subthalamic nucleus. *J Comp Neurol* **421**, 247-255 (2000).
37. Dutton, A. & Dyball, R.E. Phasic firing enhances vasopressin release from the rat neurohypophysis. *J Physiol* **290**, 433-440 (1979).
38. Lundberg, J.M., Rudehill, A., Sollevi, A., Theodorsson-Norheim, E. & Hamberger, B. Frequency- and reserpine-dependent chemical coding of sympathetic transmission: differential release of noradrenaline and neuropeptide Y from pig spleen. *Neurosci Lett* **63**, 96-100 (1986).
39. Gonon, F.G. Nonlinear relationship between impulse flow and dopamine released by rat midbrain dopaminergic neurons as studied by in vivo electrochemistry. *Neuroscience* **24**, 19-28 (1988).
40. Tai, C.H., *et al.* Electrophysiological and metabolic evidence that high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus bridles neuronal activity in the subthalamic nucleus and the substantia nigra reticulata. *Faseb J* **17**, 1820-1830 (2003).
41. Perier, C., Vila, M., Feger, J., Agid, Y. & Hirsch, E.C. Functional activity of zona incerta neurons is altered after nigrostriatal denervation in hemiparkinsonian rats. *Exp Neurol* **162**, 215-224 (2000).
42. Belujon, P., Bezard, E., Taupignon, A., Bioulac, B. & Benazzouz, A. Noradrenergic modulation of subthalamic nucleus activity: behavioral and electrophysiological evidence in intact and 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J Neurosci* **27**, 9595-9606 (2007).
43. Chetrit, J., *et al.* Involvement of Basal Ganglia network in motor disabilities induced by typical antipsychotics. *PLoS One* **4**, e6208 (2009).
44. Mallet, N., Ballion, B., Le Moine, C. & Gonon, F. Cortical inputs and GABA interneurons imbalance projection neurons in the striatum of Parkinsonian rats. *J Neurosci*. **26**, 3875-3884 (2006).
45. Paxinos, G. & Watson, C. *The Rat Brain in Stereotatic Coordinates*. Academic Press, San Diego (1996).
46. Divac, I., Mojsilovic-Petrovic, J., Lopez-Figueroa, M.O., Petrovic-Minic, B. & Moller, M. Improved contrast in histochemical detection of cytochrome oxidase: metallic ions protocol. *J Neurosci Methods* **56**, 105-113 (1995).
47. Vila, M., *et al.* Metabolic activity of the basal ganglia in parkinsonian syndromes in human and non-human primates: a cytochrome oxidase histochemistry study. *Neuroscience* **71**, 903-912 (1996).
48. Akaoka, H. & Aston-Jones, G. Opiate withdrawal-induced hyperactivity of locus coeruleus neurons is substantially mediated by augmented excitatory amino acid input. *J Neurosci* **11**, 3830-3839 (1991).
49. Kaneoke, Y. & Vitek, J.L. Burst and oscillation as disparate neuronal properties. *J Neurosci Methods* **68**, 211-223 (1996).
50. Boraud, T., Bezard, E., Guehl, D., Bioulac, B. & Gross, C. Effects of L-DOPA on neuronal activity of the globus pallidus externalis (GPe) and globus pallidus internalis (GPi) in the MPTP-treated monkey. *Brain Res* **787**, 157-160 (1998).

Dans le but de faciliter l'utilisation thérapeutique de l' α -flupentixol, nous avons testé ses effets lorsqu'il est administré de façon systémique. Cependant, les propriétés d'antagoniste des RD2 de l' α -flupentixol, qui font de ce composé un antipsychotique typique, utilisé classiquement en psychiatrie, nous ont conduits à observer des effets comportementaux opposés à ceux attendus, c'est-à-dire un renforcement des désordres moteurs chez le rat 6-OHDA, mais également l'apparition de ces mêmes troubles chez le rat contrôle. Nous nous sommes alors intéressés aux mécanismes électrophysiologiques qui sous-tendent les troubles moteurs induits par l'utilisation d'antipsychotiques, puisque très peu référencés dans la littérature.

II. Implication des ganglions de la base dans la manifestation des troubles moteurs induit par les antipsychotiques typiques

1. Résumé

Les traitements de certains troubles psychiatriques par des antipsychotiques (APD) typiques sont accompagnés de troubles moteurs importants appelés syndromes extrapyramidaux (EPS). Ils se manifestent à court terme par des états cataleptique et hypokinétique, et induisent à long terme l'apparition de dyskinésies tardives, essentiellement orofaciales. Communément, ces troubles moteurs induits par l'utilisation d'APD typiques sont qualifiés de « parkinson-like ». Cependant, les mécanismes électrophysiologiques qui sous-tendent l'émergence d'EPS ne sont pas connus. Les ganglions de la base étant impliqués dans le contrôle de l'acte moteur volontaire, et surtout étant le siège de modifications électrophysiologiques importantes associées aux troubles moteurs de la maladie de Parkinson, nous nous sommes intéressés à l'implication de cet ensemble de structures sous-corticales

dans la manifestation de effets secondaires consécutifs à un traitement aigu ou chronique par des APD typique.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'activité électrophysiologique de l'ensemble de structures des ganglions de la base (Striatum, GP, NST, et SNr) suite à une injection systémique d' α -flupentixol. Cette substance est capable d'induire une catalepsie et une hypokinésie chez le rat, matérialisant les EPS induits par les APD typiques. Nous avons montré que l'administration par voie intra-péritonéale, de flupentixol (0.3 mg/kg) induit des changements drastiques de l'activité électrique au sein du réseau des ganglions de la base. En effet, nous avons observé une diminution de la fréquence de décharge des neurones du NST et de la SNr, accompagnée d'une désorganisation de l'activité électrique au niveau de ces deux noyaux. Par contre, une augmentation de la fréquence de décharge des neurones du GP sans modification du mode de décharge a été observée. Au niveau du striatum, l' α -flupentixol n'induit aucune modification de l'activité spontanée des neurones striato-pallidaux et striato-nigraux. Cette étude offre une vue d'ensemble sur les mécanismes électrophysiologiques à l'origine des effets secondaires extrapyramidaux induits par les antipsychotiques, et souligne le caractère fondamental de la désorganisation de l'activité électrique des ganglions de la base dans les troubles moteurs. De plus, nous avons montré que la lésion du GP abolit à la fois la catalepsie et les modifications électrophysiologiques observées au niveau du NST induit par l' α -flupentixol. De ce fait, nous en avons conclu que ce noyau occupe une place centrale dans la mise en place de phénomènes physiopathologiques à l'origine des syndromes extrapyramidaux.

Ces effets secondaires moteurs associés aux traitements par des APD typiques sont supposés être dû à leur propriété d'antagoniste des RD2. Afin de cibler de façon plus

spécifique les RD2, nous avons utilisé l'halopéridol (1mg/kg) dans deux conditions expérimentales chez le rat : i) un traitement aigu, suite à une seule injection, connu pour induire une catalepsie et une hypokinésie et ii) un traitement chronique par des injections répétées sur 21 jours, connu pour induire les même désordres moteurs associés à la manifestation de dyskinésies orofaciales. Nous avons étudié les effets de ces deux traitements sur l'activité électrique des neurones du NST. Nous avons montré que les deux types de traitement n'induisent aucune modification de la fréquence de décharge des neurones du NST, par contre changent de façon identique le mode de décharge de ces neurones. Un pourcentage important de neurones décharge en bouffées oscillatoires en comparaison avec le groupe contrôle. Cette étude montre que le NST est impliqué dans la manifestation de troubles moteurs de types catalepsie et hypokinésie, mais pas dans la mise en place des dyskinésies tardives induites par un traitement chronique à l'halopéridol.

2. Article 2 :

**Involvement of Basal Ganglia Network in Motor Disabilities Induced by
Typical Antipsychotics.**

Jonathan Chetrit, Bérangère Ballion, Steeve Laquitaine, Pauline Belujon, Stéphanie Morin,
Anne Taupignon, Bernard Bioulac, Christian E. Gross, Abdelhamid Benazzouz.

PLoS ONE 4(7): e6208. doi:10.1371/journal.pone.0006208

Involvement of Basal Ganglia Network in Motor Disabilities Induced by Typical Antipsychotics

Jonathan Chetrit^{1,2}, Bérandère Ballion^{1,2}, Steeve Laquitaine^{1,2}, Pauline Belujon^{1,2}, Stéphanie Morin^{1,2}, Anne Taupignon^{1,2}, Bernard Bioulac^{1,2,3}, Christian E. Gross^{1,2,3}, Abdelhamid Benazzouz^{1,2,3*}

1 Université de Bordeaux, Bordeaux, France, **2** Centre Nationale de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5227 (CNRS UMR 5227), Bordeaux, France, **3** Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Bordeaux, France

Abstract

Background: Clinical treatments with typical antipsychotic drugs (APDs) are accompanied by extrapyramidal motor side-effects (EPS) such as hypokinesia and catalepsy. As little is known about electrophysiological substrates of such motor disturbances, we investigated the effects of a typical APD, α -flupentixol, on the motor behavior and the neuronal activity of the whole basal ganglia nuclei in the rat.

Methods and Findings: The motor behavior was examined by the open field actimeter and the neuronal activity of basal ganglia nuclei was investigated using extracellular single unit recordings on urethane anesthetized rats. We show that α -flupentixol induced EPS paralleled by a decrease in the firing rate and a disorganization of the firing pattern in both substantia nigra *pars reticulata* (SNr) and subthalamic nucleus (STN). Furthermore, α -flupentixol induced an increase in the firing rate of globus pallidus (GP) neurons. In the striatum, we recorded two populations of medium spiny neurons (MSNs) after their antidromic identification. At basal level, both striato-pallidal and striato-nigral MSNs were found to be unaffected by α -flupentixol. However, during electrical cortico-striatal activation only striato-pallidal, but not striato-nigral, MSNs were found to be inhibited by α -flupentixol. Together, our results suggest that the changes in STN and SNr neuronal activity are a consequence of increased neuronal activity of globus pallidus (GP). Indeed, after selective GP lesion, α -flupentixol failed to induce EPS and to alter STN neuronal activity.

Conclusion: Our study reports strong evidence to show that hypokinesia and catalepsy induced by α -flupentixol are triggered by dramatic changes occurring in basal ganglia network. We provide new insight into the key role of GP in the pathophysiology of APD-induced EPS suggesting that the GP can be considered as a potential target for the treatment of EPS.

Citation: Chetrit J, Ballion B, Laquitaine S, Belujon P, Morin S, et al. (2009) Involvement of Basal Ganglia Network in Motor Disabilities Induced by Typical Antipsychotics. PLoS ONE 4(7): e6208. doi:10.1371/journal.pone.0006208

Editor: Howard E. Gendelman, University of Nebraska, United States of America

Received: April 30, 2009; **Accepted:** June 10, 2009; **Published:** July 9, 2009

Copyright: © 2009 Chetrit et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Grants from the University Victor Segalen, the Centre National de la Recherche Scientifique and the Institut Federatif de Recherche (INSERM IFR8; CNRS IFR13). Jonathan Chetrit was supported by a fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie (MENRT). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: Abdelhamid.Benazzouz@u-bordeaux2.fr

Introduction

Clinical treatments with typical antipsychotic drugs (APDs) are accompanied by extrapyramidal motor side-effects (EPS). These side-effects are supposed to be due to the dopaminergic antagonist properties of APDs [1,2]. Accordingly, acute blockade of dopamine transmission in rodent induce motor disturbances such as hypokinesia and catalepsy. Most studies addressing possible sites mediating EPS have been focused on the expression of immediate early genes within the basal ganglia network [3,4], however, little is known about the relationship between EPS and the changes in basal ganglia neuronal activity.

The basal ganglia comprise a group of highly interconnected subcortical nuclei that are intimately involved in the control of movement. The striatum represents the principal input structure of the basal ganglia and the substantia nigra *pars reticulata* (SNr) and the entopeduncular nucleus (the equivalent of the internal globus pallidus in primate) constitute the major output structures of the

basal ganglia projecting to the thalamus and the brainstem. According to the current model of basal ganglia functional organisation [5,6], input and output structures are linked via a monosynaptic direct pathway and a polysynaptic indirect pathway that involves the globus pallidus (GP) and the subthalamic nucleus (STN). These two pathways arise from two different populations of medium spiny neurons (MSNs) in the striatum (for review, [7]) [8]. The direct pathway is formed by GABAergic striato-nigral MSNs expressing the peptides substance P, dynorphin, neurokinin A and neurotensin and the indirect pathway is formed by GABAergic striato-pallidal MSNs expressing enkephalin and neurokinin B. These two direct and indirect pathways are differentially regulated by dopamine through their respective expression of the excitatory D1 and inhibitory D2 receptors.

Since typical APDs induce EPS and that the relationship between these motor disabilities and changes in basal ganglia neuronal activity has not been clearly established, the present study aimed to investigate the effects of a typical APD, α -

flupentixol, upon (i) behavioral motor activity and catalepsy measured by an open field and the bar test respectively, and (ii) extracellular single unit recordings of basal ganglia nuclei including the GP, the STN, the SNr and antidromically identified MSNs of the striatum.

Materials and Methods

Animals

Adult male Wistar rats, weighing 280–380 g were used for behavioral and *in vivo* electrophysiological experiments. Animals were provided by the “Centre d’Elevage Dépré” (Saint-Doulchard, France) and arrived at least one week before use. They were housed five per cage under artificial conditions of light (light/dark cycle, light on at 7:00 a.m.), temperature (24°C), and humidity (45%) with food and water available *ad libitum*. All animal experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

Lesion of the globus pallidus

As previously described [9,10], rats were placed in a stereotaxic frame (Kopf, Unimecanique, France) under chloral hydrate anaesthesia (400 mg/kg, i.p., Sigma). Each animal received a unilateral injection of 0.4 µl ibotenic acid (Sigma, 8 mg/ml in sterile PBS) into the globus pallidus at coordinates 1 mm posterior to bregma, 3 mm lateral to the midline, and 6.5 mm below the skull according to the brain atlas of Paxinos and Watson [11]. The ibotenic acid injection was made over a 1 minute period of time using a digital 10 µl Hamilton microsyringe. At the end of the injection, the syringe needle was left in place for an additional 10 minutes and then withdrawn slowly to prevent reflux of the solution.

Histological validation of the GP lesion. After completion of experiments, fresh-frozen brains were cryostat-cut into coronal 20 µm sections for further validation of the extent of lesion using Cresyl violet staining, as previously described [9,10]. Only those brains in which a total or subtotal lesion of GP was observed were used for data analysis, whereas animals with lesion outside of the GP were excluded from the study.

Drug

α-flupentixol (2-[4-[3-[2-(trifluoromethyl)thioxanthen-9-ylidene]propyl]piperazin-1-yl]ethanol) was purchased from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France) and dissolved in NaCl 0.9%. The dose of 0.3 mg/kg for intraperitoneal (i.p.) injection of α-flupentixol was selected on the basis of a detailed literature search, showing a significant effect on spontaneous motor activity in the rat [12,13].

Evaluation of motor activity (Open-field)

Spontaneous horizontal motor activity, vertical activity (or rearing) and stereotyped movements (grooming, washing, and other movements with low amplitudes and independent of locomotor activity) were measured using a photoelectric actimeter (Actitrack, Panlab, S.L., Barcelona, Spain), as previously described [14,15]. Briefly, the apparatus consisted of a transparent cage that was connected to a photoelectric cell. Light beams detected movement and the total motor activity of each rat was recorded. All testings in the actimeter were done in an isolated room between 8:00 a.m. and 1:00 p.m. The protocol consisted of three phases:

(A) Habituation: spontaneous motor activity was recorded during four consecutive days in two consecutive sessions of 10 minutes, 50 minutes after i.p. injection of NaCl 0.9%. The first 10

minutes session was used to establish the daily habituation. Only the motor activity recorded during the second session of 10 minutes was used for data analysis. Between-session habituation was analysed by comparing behavior in the actimeter on day 3 vs that on day 4.

(B) Challenge: α-flupentixol (0.3 mg/kg, i.p.) was injected on day 5, 50 minutes prior the measurement of motor activity.

(C) Post-challenge: one day after α-flupentixol injection, the rats were re-exposed to the actimeter 50 minutes after i.p. injection of NaCl 0.9%.

Statistical analyses were done using Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Values (counts per 10 minutes) were compared using the Wilcoxon matched-pairs signed ranks test.

Evaluation of catalepsy scores (bar test)

The standard bar test was used to determine the intensity of catalepsy every 20 minutes after drug injection for 180 minutes as previously reported [16,17]. Both of the rat’s forepaws were placed on a horizontal bar (diameter, 0.7 cm), which was 9 cm above the surface. We recorded the time from placing the forepaws to the first complete removal of one of them from the support bar with a cutoff time of 120 seconds, which is termed here as descent latency. For rats with ibotenic acid lesion of the GP, the catalepsy tests were made 1 week after surgery.

Extracellular single unit recordings

Extracellular single-unit recordings were made in rats anesthetized with urethane (1.2 g/kg, i.p.) as previously reported [15,18]. For rats with ibotenic acid lesion of the GP, recordings were made two weeks after surgery. For all basal ganglia nuclei recordings were made with single glass micropipette electrodes (impedance: 8–12 MΩ; aperture ~0.5 µm), which were filled with 4% Pontamine sky blue in 3 M NaCl, then placed into the right target structure according to the coordinates given in the brain atlas [11] (for GP, AP: –1 mm posterior to bregma, L: –3 mm from the midline, D: 5.7–7.3 mm from the dura; for STN, AP: –3.8 mm, L: –2.5 mm, D: 6.8–8.2 mm; for SNr, AP: –5.3 mm, L: –2.5 mm, D: 7.5–8.6 mm; for striatum, AP: +1.2 mm, L: –3 mm, D: 3.5–5.5 mm). Extracellular neuronal activity was amplified, bandpass-filtered (300–3000 Hz) using a preamplifier (Neurolog, Digitimer, UK), displayed on an oscilloscope, transferred *via* a Powerlab interface (AD Instruments, Charlotte, NC, USA) to a computer equipped with Chart 5 software (AD Instruments, Charlotte, NC, USA). Only neuronal activity with a signal-to-noise ratio >3:1 was recorded and used for further investigation. Basal firing of neurons was recorded for 20 minutes before drug injection to ascertain the stability of the discharge activity. α-flupentixol or NaCl 0.9% (used as control) was then injected intraperitoneally. At the end of each session, the recording site was marked by electrophoretic injection (Iso DAM 80, WPI, Hertfordshire, UK) of Pontamine sky blue through the micropipette at a negative current of 20 µA for 7 minutes.

For recordings in the striatum, four types of neurons can be identified. Tonically active neurons are characterized by their unique, regularly spaced, spontaneous activity between 2 and 6 Hz. These neurons are presumed to be cholinergic interneurons. Fast spiking GABA interneurons (FSI) are characterized by their spike duration, which is briefer than that of all other striatal neurons, and by the fact that they respond with brief burst of 2 to 5 action potentials to supra threshold cortical stimulation [19,20]. These two populations of striatal interneurons were not further studied here. Our interest was focused on the two other populations named medium spiny neurons (MSNs), which send efferents to the GP and the SNr. Single MSNs were extracellularly

recorded from the rostromedial striatum in parallel with cortical EEG recordings as previously described [20]. In urethane-anesthetized rats the dominant cortical state exhibits a rhythmic activity characterized by slow waves of large amplitude at a frequency close to 1 Hz. Antidromic stimulation of the SNr was used to identify MSNs [20]. Concentric bipolar electrodes (SNEX-100, Rhodes Medical Instruments, Summerland, CA 93067, USA) were implanted in the rostral pole of SNr (2.4 mm to medial line, 4.9 mm caudal to bregma and 8.0 below the cortical surface). Striato-nigral neurons exhibited antidromic responses to SNr stimulation according to the following criteria: (1) constant latency of spike response, (2) all-or-none property of the spike response when the strength of the stimulation was adjusted just above, or just below, threshold, and (3) collision of the antidromic spikes with orthodromic spikes. Because most striatal neurons are silent or discharge at very low firing rate, the orthodromic spike required for the collision test was evoked by cortical stimulation and the SNr stimulation was triggered by the spike evoked by cortical stimulation with a delay of 30 or 3 ms, alternately. MSNs, which did not exhibit the features of striatal interneurons and which did not exhibit antidromic responses to SNr stimulation were qualified as striato-pallidal neurons [19]. By using double labeling, these authors have already shown that these MSNs express the mRNA coding for ENK, a recognized feature of striato-pallidal neurons [19]. In order to test the dynamic response of MSNs to cortical input we used paired cortical stimulations at 100 ms intervals as previously described [19].

In all experiments described here cortical EEG was continuously monitored to assert that the recorded animal was actually in the slow wave state. If disruption of the slow waves spontaneously occurred, the slow wave state was restored with additional i.p. injection of urethane (15% of the initial dose). α -flupentixol (0.3 mg/kg) or saline were administered i.p. only once per rat.

Validation of the recording sites. After completion of experiments, animals were sacrificed by an overdose of urethane, the brains removed, frozen in isopentane at -45°C and stored at -80°C . Fresh-frozen brains were cryostat-cut into 20 μm coronal sections for further validation of the location of recording track into the GP, STN and SNr as previously described [15,18]. To this aim, acetylcholine esterase staining was used to contrast structures and make more easy to determine the location of the Pontamine sky blue dots marking the recording sites in each structure. Only those brains in which the location of the Pontamine sky blue dot was clearly visible in the target structure were used for data analysis.

Data analysis. The activity of each neuron was analyzed with a spike discriminator using a spike histogram program (AD Instruments, Charlotte, NC, USA) and firing parameters (firing rates and interspike intervals with a bin of 5 msec) were calculated using Neuroexplorer program (AlphaOmega, Nazareth, Israel). Firing patterns were analyzed using the method based on the determination of density histogram developed by Kaneoke and Vitek [21] as previously described [18,22]. The coefficient of variation of the interspike interval, which determines the regularity of neuronal firing, is defined as the ratio of the standard deviation to the mean interspike interval. For each parameter, the values obtained before and after α -flupentixol injection were compared using a one-way ANOVA with repeated measures followed by the Dunnett's test (post-hoc).

Results

Effects of α -flupentixol on motor activity and catalepsy

As previously reported [15], using an open field photoelectric actimeter, the behavior of the animals was stable after three days,

indicating that the rats were habituated to their test environment. Values are presented as mean of counts per 10 minutes \pm S.E.M. Results reported as "control" on figure 1 correspond to the measure on day 4 after i.p. saline injection. α -flupentixol (0.3 mg/kg) injection significantly decreased horizontal activity by 69% (463.8 ± 92.4 vs 1474.5 ± 225.5 in control), rearing by 75% (13.4 ± 2.8 vs 53.0 ± 7.1 in control) and stereotypy by 49% (702.6 ± 62.4 vs 1388.0 ± 172.8 in control) in comparison with control saline injection performed on day 4 (Wilcoxon test, $p < 0.01$, $n = 10$). A post-challenge test was performed on day 6 after i.p. saline injection to confirm the specific effect of α -flupentixol. No significant difference was observed in comparison with the motor activity measured on day 4 after saline injection (Fig. 1A C) confirming that the motor activity returned to the basal level.

The cataleptic effect of α -flupentixol injection was measured using the bar test. Catalepsy started 60 minutes after i.p. injection of α -flupentixol (3.6 ± 3.1 sec descent latency) and was maximal 180 minutes after (48.8 ± 10.1 sec descent latency) (Fig. 1D).

Effects of α -flupentixol on SNr neuronal activity

As the SNr represents the major output structure of the basal ganglia in the rat, playing a key role in the motor control, we determined whether systemic administration of α -flupentixol induced changes in its neuronal activity ($n = 14$ neurons in 14 rats). The spontaneous firing rate of SNr neurons ranged from 7.3 to 31.3 spikes/sec with a mean of 23.8 ± 2.0 spikes/sec. α -flupentixol induced a significant decrease in the firing rate [$F = 4.73$, $p < 0.0001$] ($-55.7 \pm 12.5\%$, at 85 minutes, $p < 0.05$) of the majority of SNr neurons ($n = 10/14$) (Fig. 2 and 3). This effect occurred 60 minutes after the injection and no recovery to the basal level was observed (Fig. 2A and 2B). The four other neurons did not show any modification of their firing activity after α -flupentixol injection. As shown in figure 2C, coefficient of variance of the interspike intervals (ISI) significantly increased after i.p. injection of α -flupentixol [$F = 2.79$, $p = 0.004$] ($308.8 \pm 54.0\%$ at 75 minutes, $p < 0.05$) traducing a disorganization of the firing pattern of SNr neurons (Fig. 3A and 3B), which was maintained for more than 2 hours. This abnormal pattern of SNr neurons was confirmed by the Kaneoke and Vitek method based on the analysis of the ISI (Fig. 3C and 3D) and the density (Fig. 3E and 3F) histograms, which showed clear differences before and after α -flupentixol injection in all the 10 neurons.

Effects of α -flupentixol on STN neuronal activity

The STN, which is the only glutamatergic nucleus of the basal ganglia network, is considered as a driving force exerting an excitatory tonic influence on the SNr. The spontaneous firing rate of STN neurons ranged from 11.7 to 16.9 spikes/sec with a mean of 14.6 ± 1.9 spikes/sec. Responses of STN neurons to α -flupentixol are shown in figures 4 and 5. As for the SNr, similar changes were recorded in the STN. α -flupentixol injection (0.3 mg/kg, i.p.) provoked a clear inhibitory effect in STN neurons [$F = 4.68$, $p < 0.0001$]. All neurons ($n = 9/9$, $n = 9$ rats) showed a significant decrease in their firing rate ($-47.0 \pm 5.8\%$, at 75 minutes, $p < 0.05$) with a maximal effect at 115 minutes ($-75.5 \pm 8.9\%$, $p < 0.01$). This effect occurred 60 minutes after the injection and no complete recovery to the basal level was observed (Fig. 4A and 4B). All neurons showed a significant increase of the coefficient of variance of the ISI [$F = 2.88$, $p = 0.002$] ($192.9 \pm 28.1\%$ at 100 minutes, $p < 0.05$, $n = 9$) suggesting that α -flupentixol induced a disorganization of the firing pattern of STN neurons (Fig. 4C and Fig. 5A and 5B). This was confirmed by the

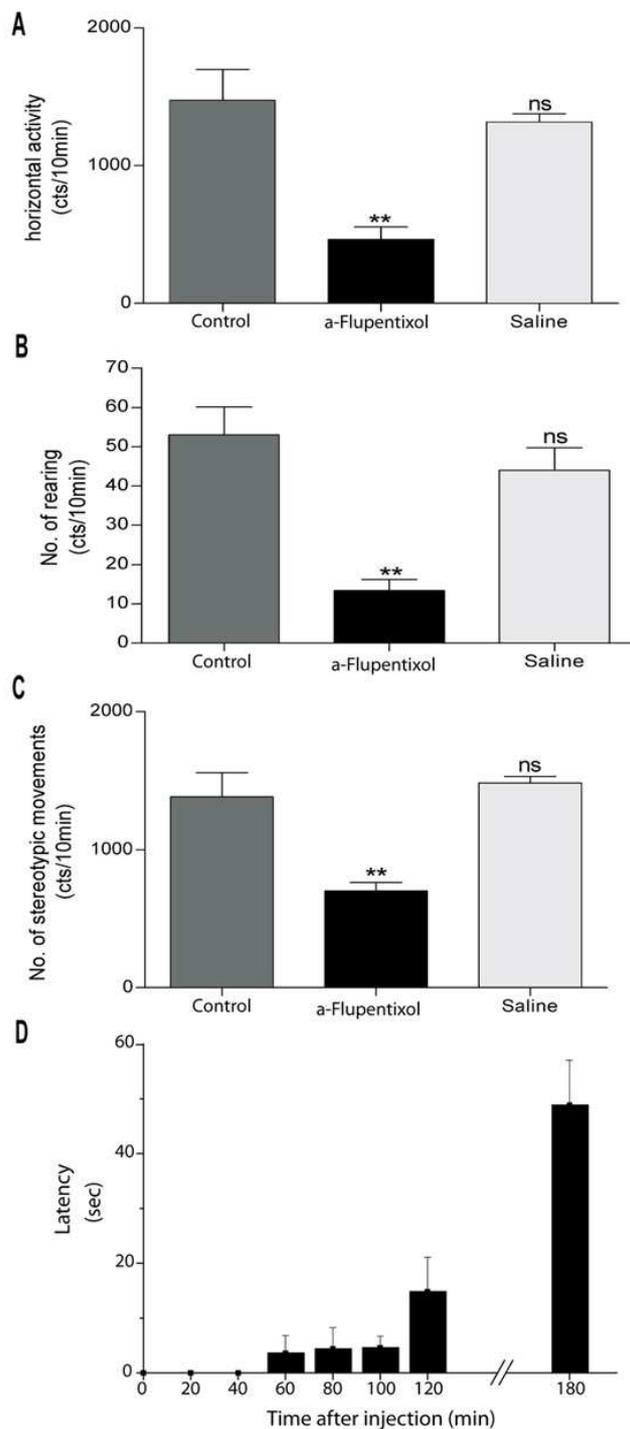


Figure 1. α -flupentixol induces hypomotor activity and catalepsy. (A–C) Histograms illustrating the scored motor activity recorded during the second 10 minutes session fifty minutes after the injection of saline (control) or α -flupentixol (0.3 mg/kg) or saline on day 4, 5 and 6 respectively. Note that α -flupentixol induced a significant decrease of the scored horizontal activity (A), vertical activity (B) and stereotypic movements (C) in comparison with controls (n = 10 rats) (Wilcoxon test, ** $p < 0.01$). No significant difference was observed after saline injection on day 6 in comparison with controls (Wilcoxon test, ns: no-significant, $p > 0.05$). (D) Histogram displaying the evolution of catalepsy induced by the injection of α -flupentixol. Measurement of the latency from paw placement until the first complete removal of one paw from the bar during the catalepsy test. Values are presented as the mean \pm S.E.M. cts/10 min = counts/10 minutes. doi:10.1371/journal.pone.0006208.g001

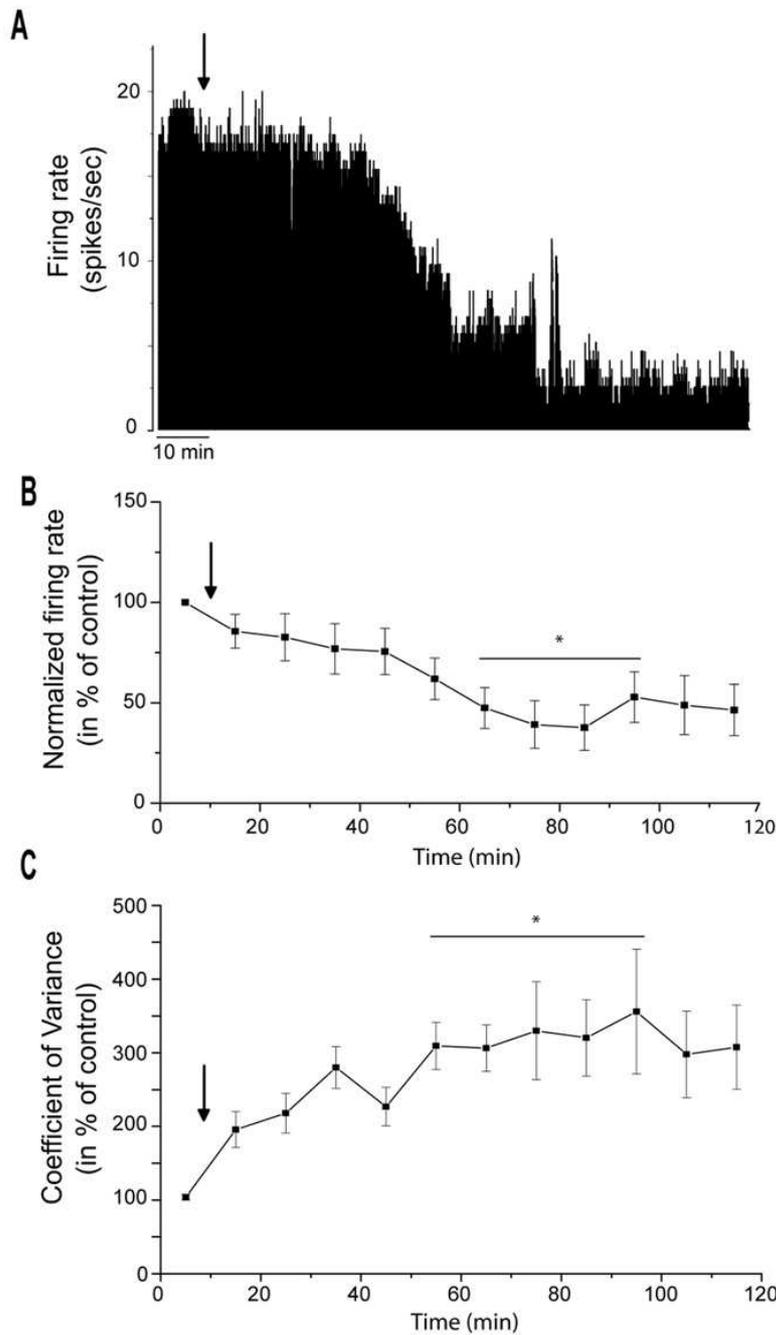


Figure 2. α -flupentixol induces changes of the electrical activity of substantia nigra pars reticulata neurons. (A) A representative example of a firing rate histogram showing the inhibitory effect of α -flupentixol on SNr neuronal activity. (B) α -flupentixol decreases the firing rate of the majority of SNr neurons tested ($n = 10/14$), and (C) increases the coefficient of variance of the interspike interval (ISI) (One-way ANOVA with repeated measures followed by the Dunnett's test, $*p < 0.05$). Arrows indicate the time at which α -flupentixol was administered.
doi:10.1371/journal.pone.0006208.g002

Kaneoke and Vitek method based on the analysis of the ISI (Fig. 5G and 5D) and the density (Fig. 5E and 5F) histograms, which showed clear differences before and after α -flupentixol injection.

We suspected that the changes in SNr and STN neuronal activities originated at an upstream location. As a part of the indirect pathway, GP exerts a tonic inhibitory influence on both STN and SNr.

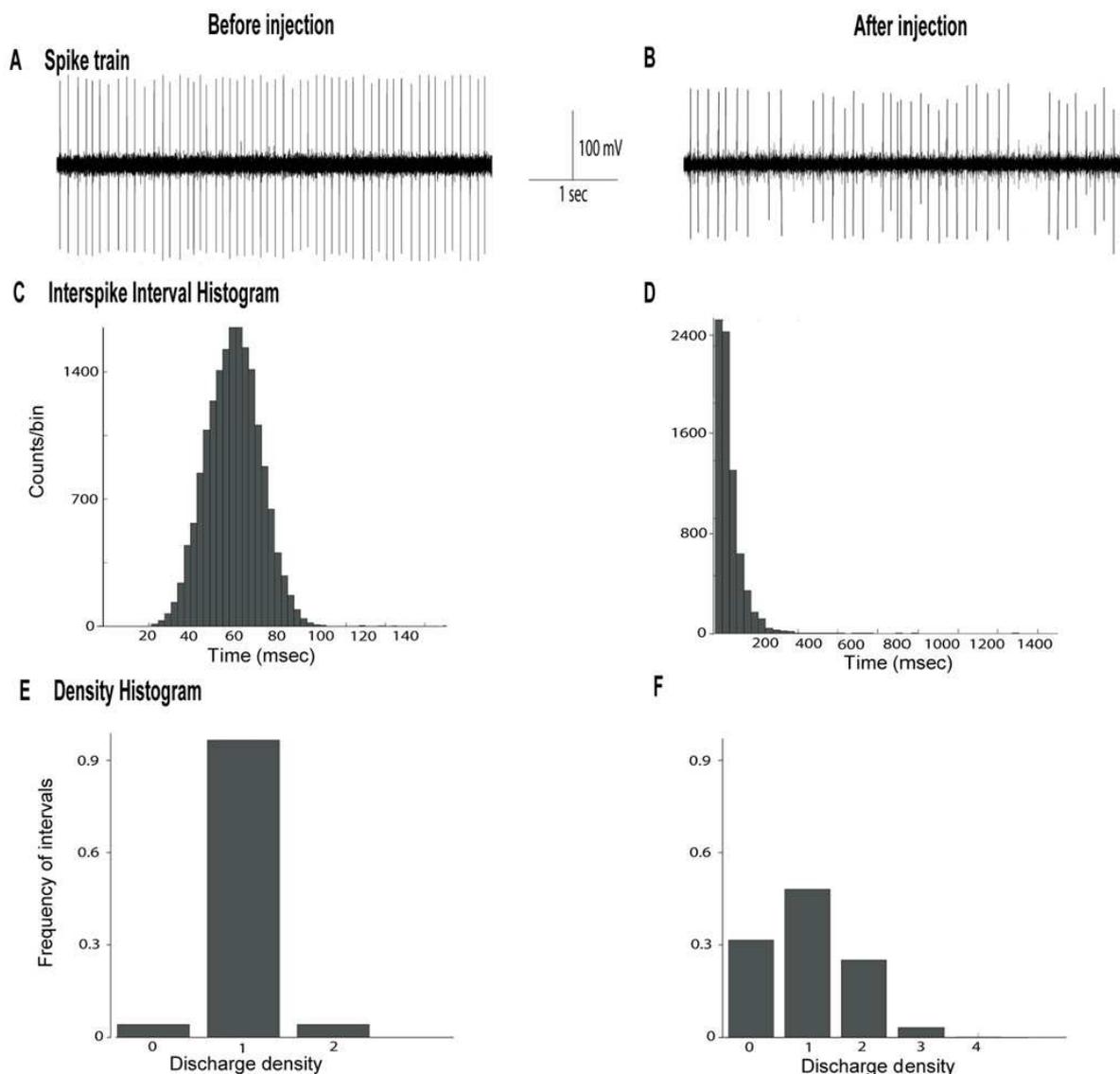


Figure 3. α -flupentixol alters the firing patterns of substantia nigra pars reticulata neurons. (A and B) Sections of extracellular recordings of action potentials, before and after injection respectively, showing that α -flupentixol reduced the firing rate and made the pattern irregular. (C and D) Interspike interval histograms, (E and F) density histograms, respectively before and after α -flupentixol injection confirming the disorganization of the firing pattern induced by α -flupentixol in the same neuron. doi:10.1371/journal.pone.0006208.g003

Effects of α -flupentixol on GP neuronal activity

The spontaneous firing rate of GP neurons ranged from 9.7 to 24.1 spikes/sec. with a mean of 13.4 ± 2.1 spikes/sec. Responses of GP neurons to α -flupentixol are shown in figure 6 and 7. α -flupentixol injection (0.3 mg/kg) induced a clear excitatory effect on GP neurons [$F = 4.08$, $p = 0.0003$] (Fig. 6 and 7). All of the tested neurons ($n = 9/9$, $n = 9$ rats) showed a significant increase in their firing rate ($+50.4 \pm 10.5\%$ at 65 minutes, $p < 0.05$) in comparison with the basal level. The effect was maintained for more than two hours (Fig. 6A–B). No change in the coefficient of variance of the ISI was observed [$F = 0.20$, $p = 0.99$] (Fig. 6C) showing that the regularity of the

pattern was not altered (Fig. 7A and 7B). This result was confirmed by the Kaneoke and Vitek method based on the analysis of the ISI (Fig. 7C and 7D) and the density (Fig. 7E and 7F) histograms, which showed no differences before and after α -flupentixol injection.

Effects of α -flupentixol on MSNs of the striatum

Since the GP receives GABAergic afferents from striato-pallidal MSNs of the striatum and that another neuronal subset, the striato-nigral MSNs, projects to the SNr, we recorded these two populations after their antidromic identification as previously reported [19]. Six neurons ($n = 6$ rats) were identified as striato-

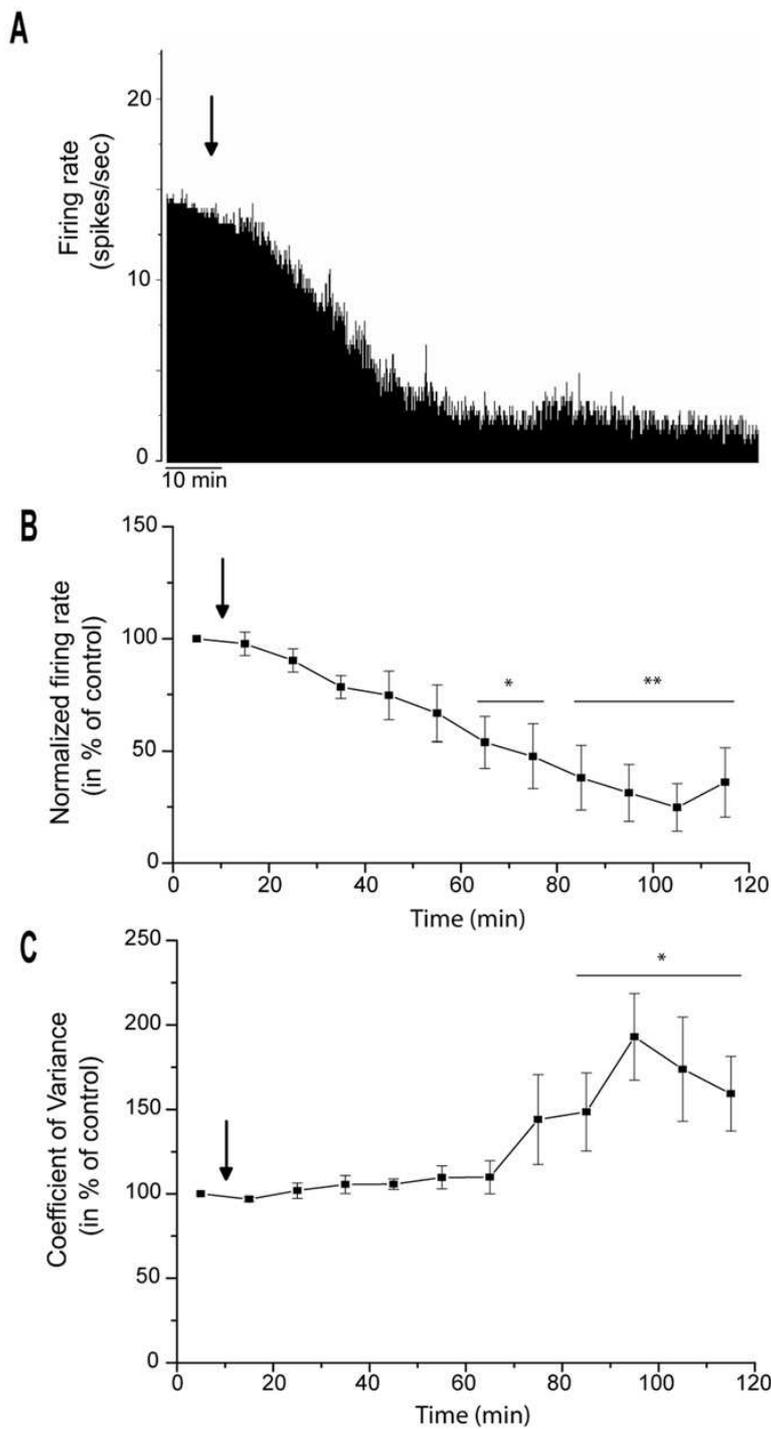


Figure 4. α -flupentixol induces changes of electrical activity of subthalamic nucleus neurons. (A) A representative example of a firing rate histogram showing the inhibitory effect of α -flupentixol on STN neuronal activity. (B) α -flupentixol decreases the firing rate of all STN neurons tested ($n = 9/9$), and (C) increases the coefficient of variance of the interspike interval (ISI) (One-way ANOVA with repeated measures followed by the Dunnett's test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Arrows indicate the time at which α -flupentixol was administered. doi:10.1371/journal.pone.0006208.g004

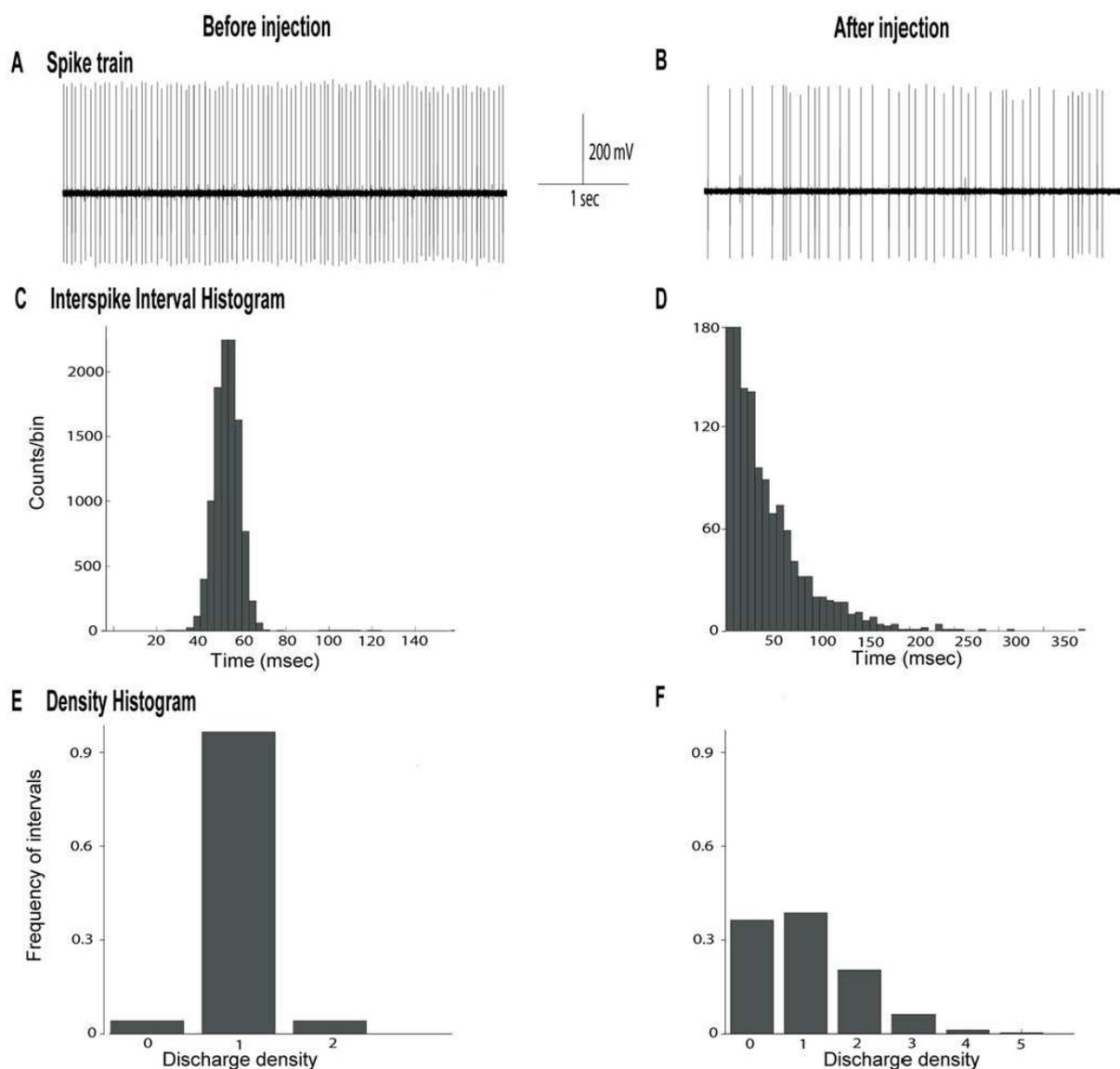


Figure 5. α -flupentixol alters the firing patterns of subthalamic nucleus neurons. (A and B) Sections of extracellular recordings of action potentials, before and after injection respectively, showing that α -flupentixol reduced the firing rate and made the pattern irregular. (C and D) Interspike interval histograms, (E and F) density histograms, respectively before and after α -flupentixol injection confirming the disorganization of the firing pattern induced by α -flupentixol in the same neuron. doi:10.1371/journal.pone.0006208.g005

nigral MSNs by antidromic activation of the SNr (Fig. 8A). Seven other MSNs ($n=7$ rats) that did not exhibit an antidromic response to SNr stimulation were not classified as interneurons and were identified as striato-pallidal MSNs. Responses to α -flupentixol were recorded between 40 and 120 minutes after i.p. injection. α -flupentixol did not induce any significant change in the spontaneous firing rate of striato-pallidal MSNs ($F=0.28$, $p=0.76$, $n=6$, Fig. 8B left) nor of striato-nigral MSNs ($F=0.66$, $p=0.53$, $n=7$, Fig. 8C left). As most of MSNs are silent or discharge at very low firing rate, (this can explain the high level of error bars of the firing rate histograms) the effect of α -flupentixol was studied on the responses evoked by cortical stimulations. α -

flupentixol (0.3 mg/kg) decreased the spike responses evoked in striato-pallidal MSNs by the second pulse of paired cortical stimulations ($p=0.031$, Fig. 8B middle). Indeed, the stimulating current required to evoke a spike response with a 50% probability was significantly increased after α -flupentixol injection ($p=0.031$, Fig. 8B right). Regarding the striato-nigral MSNs, neither the spike response evoked by cortical stimulations, nor the stimulating current to evoke a spike response with a 50% probability was modified ($p=0.437$ and $p=0.843$ respectively, Fig. 8C middle and right respectively).

Together, our electrophysiological data show that the indirect pathway, but not the direct pathway, is suspected to play an

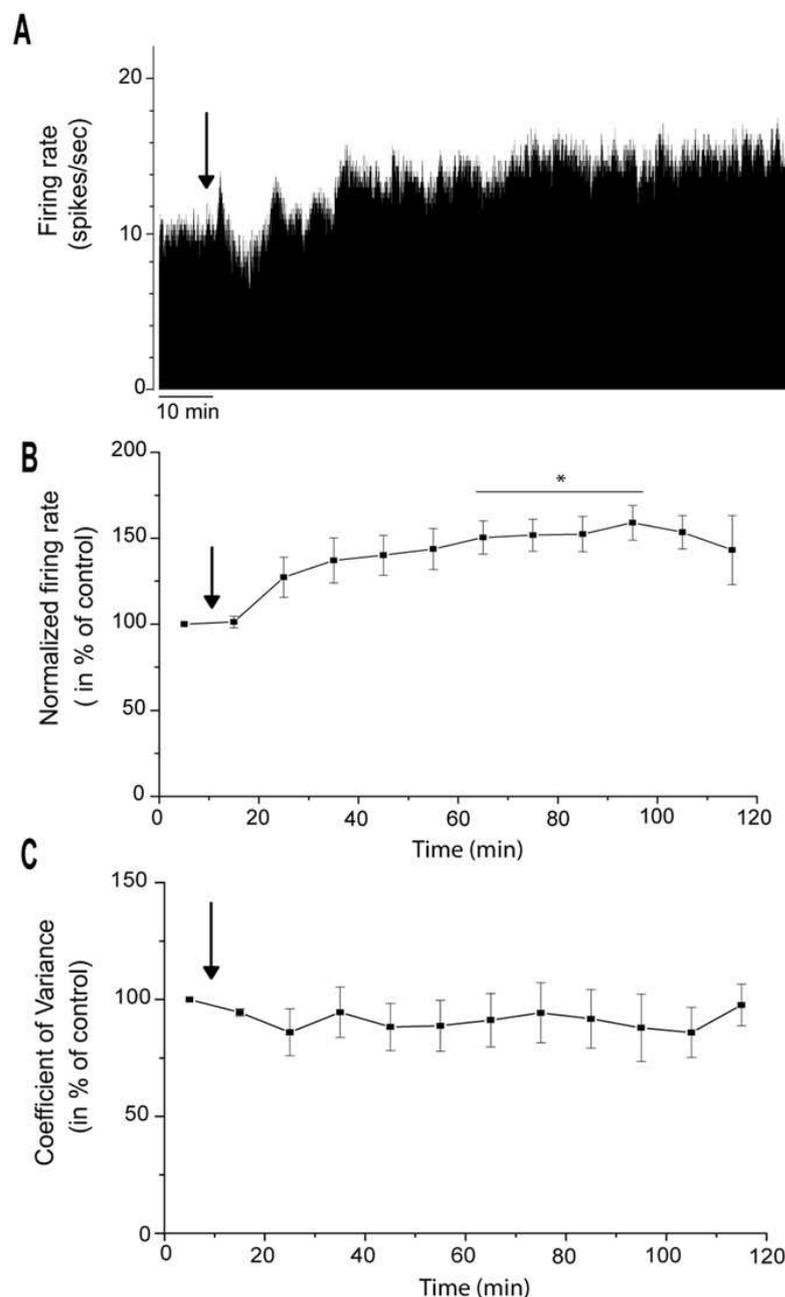


Figure 6. α -flupentixol induces changes of electrical activity of globus pallidus neurons. (A) A representative example of a firing rate histogram showing the excitatory effect of α -flupentixol on GP neuronal activity. (B) α -flupentixol increases the firing rate of all GP neurons tested ($n = 9/9$), without any modification of the coefficient of variance of the interspike interval (ISI) (C) (One-way ANOVA with repeated measures followed by the Dunnett's test, $*p < 0.05$). Arrows indicate the time at which α -flupentixol was administered. doi:10.1371/journal.pone.0006208.g006

important role in the manifestation of EPS induced by α -flupentixol. To test this hypothesis, we investigated the effect of selective ibotenic acid lesion of the GP, which is a relay structure in the indirect pathway on α -flupentixol-induced catalepsy and changes in STN neuronal activity.

Effects of GP lesion on α -flupentixol-induced catalepsy and changes in STN neuronal activity

Cresyl violet staining of coronal sections allowed us to determine the extent of ibotenic acid lesion of GP and only rats with a total or subtotal lesion of the nucleus (Fig. 9A and 9B) were selected for the

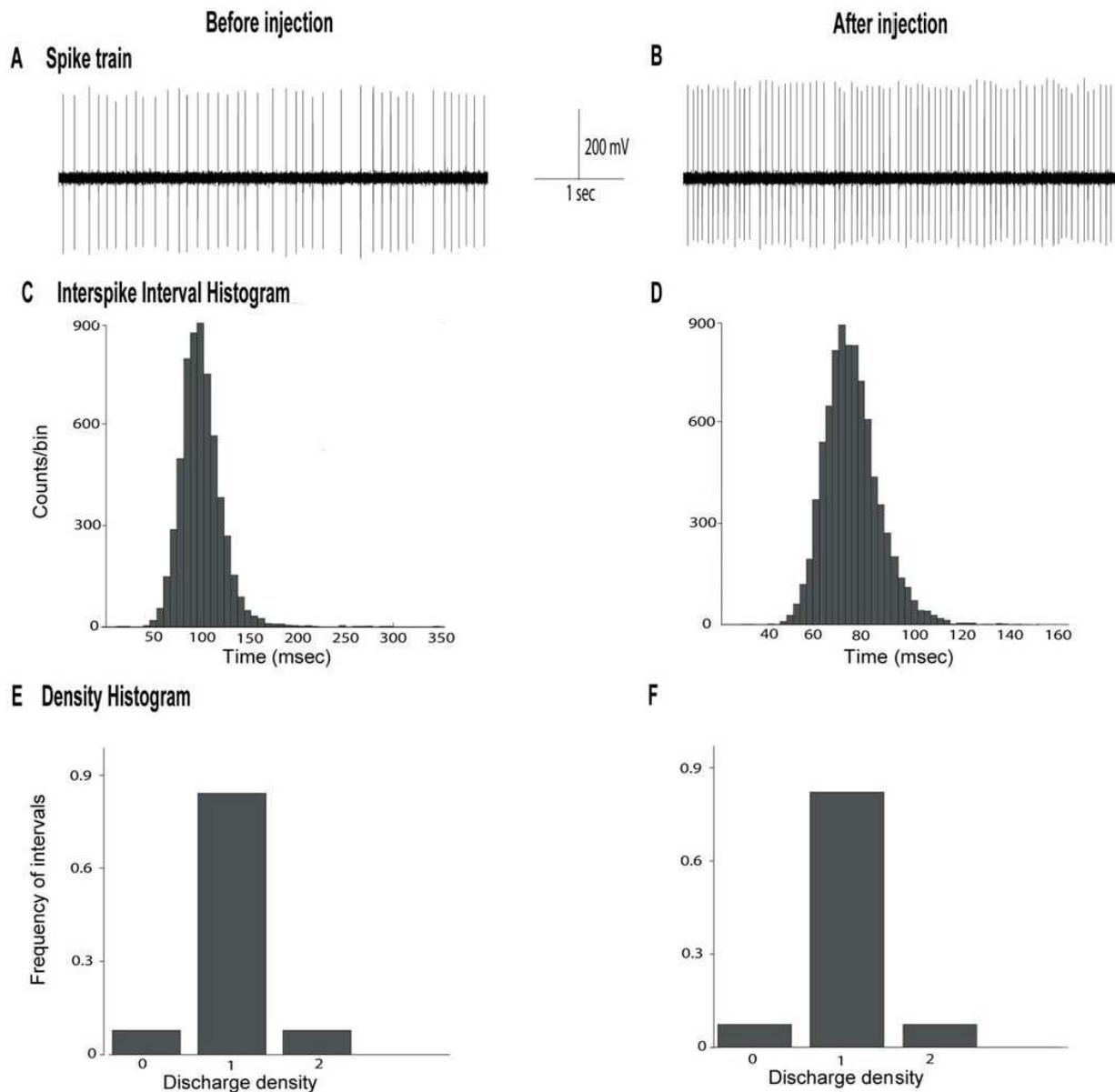


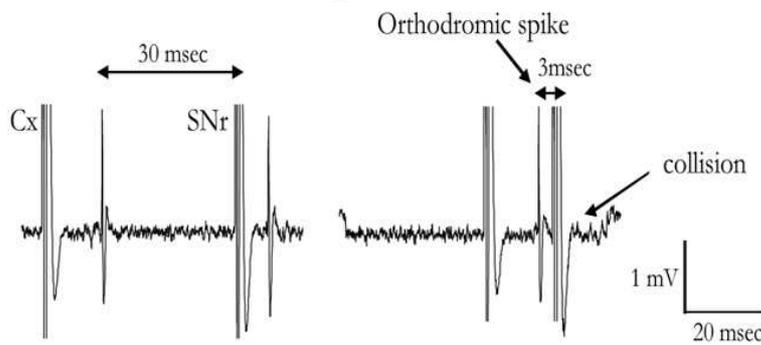
Figure 7. α -flupentixol does not alter the firing patterns of globus pallidus neurons *in vivo*. (A and B) Sections of extracellular recordings before and after injection respectively, showing that α -flupentixol increased the firing rate without modifying the firing pattern. (C and D) Interspike interval histograms, (E and F) density histograms, respectively before and after α -flupentixol injection confirming the absence of changes of the firing pattern in the same neuron. doi:10.1371/journal.pone.0006208.g007

analysis of behavioral and electrophysiological data. The Bar test measurements showed that after selective ibotenic acid lesions of the GP, α -flupentixol (0.3 mg/kg) failed to induce catalepsy (n=9 rats) (Fig. 9C). In these animals, the spontaneous firing rate of STN neurons ranged from 10.3 to 38.9 spikes/sec with a mean of 19.8±4.1 spikes/sec (n=6, in six rats). α -flupentixol (0.3 mg/kg) did not induce any change in the firing rate [F= 0.68, p= 0.77] (Fig. 9D) nor in the firing patterns of STN neurons as shown by the coefficient of variance of the ISI [F= 2.50, p= 0.41] (Fig. 9E).

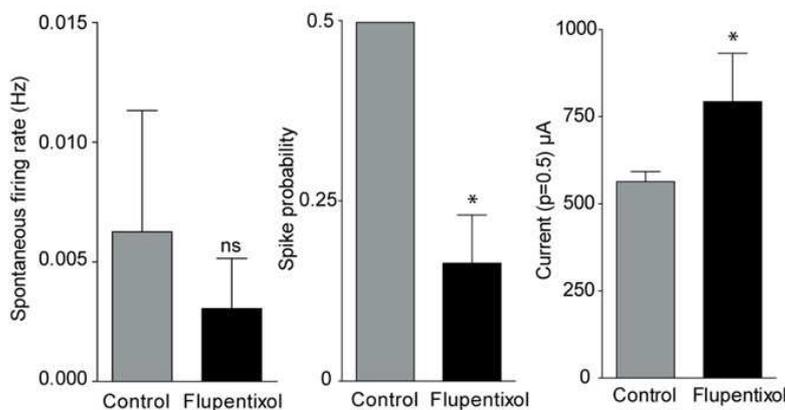
Discussion

The present study reports for the first time important experimental evidence for a key role of the basal ganglia network in the manifestation of EPS induced by typical APDs. Indeed, the hypoactivity accompanied by irregular discharge patterns recorded in the STN and the SNr appears to be a specific consequence of increased neuronal activity within the globus pallidus, suggesting that the indirect pathway, but not the direct pathway, plays an important role in the motor effects of α -flupentixol.

A Electrical identification of Striato-nigral MSNs



B Striato-pallidal neurons



C Striato-nigral neurons

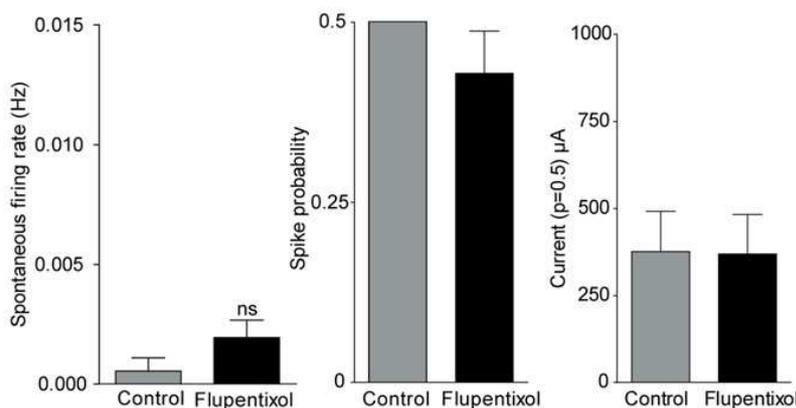


Figure 8. Responses of identified striatal MSNs to α -flupentixol. (A) Electrophysiological identification of striato-nigral neurons. Example of a collision test used to identify a striato-nigral neuron by antidromic activation of the SNr. The SNr stimulation (SNr) was triggered by an orthodromic spike evoked by cortical stimulation (Cx) either with a delay of 30 ms (no collision) or with a delay of 3 ms leading to collision of both spikes. (B) and (C) Responses of striato-pallidal ($n = 7$) and striato-nigral cells ($n = 6$) respectively. The left panel histograms show the spontaneous activity of MSNs, whereas middle and right panel represent respectively the spike probability response at a fixed cortical stimulating current and the stimulating current required to evoke a spike response with a 50% probability, both, before and after α -flupentixol injection. Note that α -flupentixol did not induce any significant change in the spontaneous firing rate of striato-pallidal MSNs (One way ANOVA, $F = 0.28$, $p = 0.76$) nor of striato-nigral MSNs (One way ANOVA, $F = 0.66$, $p = 0.53$). However, striato-pallidal MSNs were less responsive to cortical stimulations ($p = 0.031$) and the stimulating current required to evoke a spike response with a 50% probability was significantly increased after α -flupentixol injection ($p = 0.031$). Bar histograms indicate mean \pm S.E.M., * $p < 0.05$, ns: non-significant. doi:10.1371/journal.pone.0006208.g008

A Controlateral side of Globus Pallidus



B Ipsilateral side of Globus Pallidus (lesion)

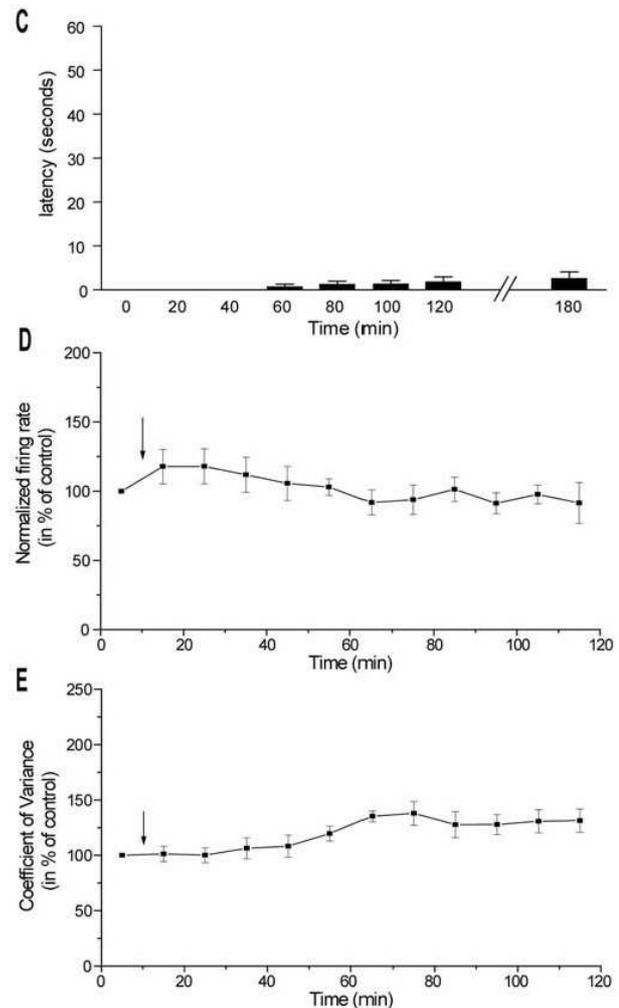


Figure 9. Globus pallidus lesion prevents α -flupentixol-induced catalepsy and changes in the neuronal activity of STN neurons. (A and B) Photomicrographs of the globus pallidus showing the control side (A) and the side which received ibotenic acid injection-induced cell death (B, lesioned side). Scale bar: 50 μ m. (C) Histogram illustrating the mean \pm S.E.M. of the latency measured from paw placement until the first complete removal of one paw from the bar during the catalepsy testing (n = 9). Note that ibotenic acid lesion of the globus pallidus prevents α -flupentixol-induced catalepsy. (D and E) Curves illustrating the evolution of the firing rate (D) and the coefficient of variance (E) after the injection of α -flupentixol (arrow) in rats (n = 6) with ibotenic acid lesion of the globus pallidus. Note that this lesion prevented the alteration of the two electrophysiological parameters (One-way ANOVA with repeated measures, $p > 0.05$). Values are presented as the mean \pm S.E.M. doi:10.1371/journal.pone.0006208.g009

α -flupentixol induced catalepsy measured by the bar test with a decrease in the motor activity parameters measured by the open field actimeter. These results confirm the ability of this APD to induce EPS in the rat in agreement with previous reports using α -flupentixol [13] or other typical APDs such as haloperidol [23], raclopride [24,25] and sulphiride [26]. Several studies suggested that typical APDs have a high EPS liability because they generally induce a more pronounced dopamine D2 receptor occupancy than atypical APDs [27–31]. Indeed, haloperidol does not induce catalepsy in D2 knockout mice [32], demonstrating that EPS are specifically due to the blockade of D2 receptors. In line with this, α -flupentixol has been shown to have a higher affinity for D2 than D1 receptors *in vivo* [33].

According to the proposed anatomo-functional model of the motor circuit [5], the blockade of dopamine receptors, which mimics the nigro-striatal denervation in animal models of

Parkinson's disease, should result in similar changes in basal ganglia network function, i.e. hyperactivity associated with bursty activity in the major output structure of basal ganglia, the SNr [34–36]. This hyperactivity has been interpreted as a result of reduced inhibitory input from the striatum via the direct pathway implicating D1 receptors and a release of the inhibitory input from the striatum to the GP via D2 receptors of the indirect pathway [5,8,19,37]. The decrease in neuronal activity of GP neurons, in turn, induces a disinhibition of STN neurons becoming overactive, and consequently spreads this hyperactivity to SNr neurons. Surprisingly, our electrophysiological findings show that the cascade of changes recorded in different nuclei of the basal ganglia network after the administration of α -flupentixol is dissimilar to those previously found in animal models of parkinsonism.

We show that α -flupentixol did not induce an increase but a dramatic decrease in the firing rate of SNr neurons, which was

accompanied by a switch from regular to irregular firing patterns as determined by the coefficient of variance of the ISI and also by the Kaneoke and Vitek method [21]. As the striatum constitutes the major input structure of the basal ganglia network, we recorded the spontaneous activity of identified MSNs at the origin of the direct pathway connecting the striatum to the SNr. Our results show that α -flupentixol was unable to induce any significant change in the spontaneous activity of these identified striato-nigral MSNs and even with cortical stimulations no change in the evoked response was observed. Indeed, it is unlikely that the direct pathway is the origin of changes observed in the SNr. However, in the STN, which is a part of the indirect pathway and at the same time a major excitatory afferent component of the SNr, α -flupentixol induced a dramatic decrease in the firing rate with a disorganization of the firing pattern similar to those recorded in the SNr. From these results, and in accordance with the glutamatergic nature of STN-SNr transmission responsible for the tonic discharge of SNr neurons (for review, [38]), we can postulate that the decrease in the firing rate of STN neurons could result in a deactivation of SNr neurons with a propagation of irregular discharge patterns. This fit with the results of a previous study, which showed that pharmacological blockade of STN neuronal activity resulted in a marked reduction in SNr firing [39]. Moreover, we add evidence that the changes in STN neuronal activity could originate in the GP as we show that α -flupentixol induced an increase in the firing rate of GP neurons. It is well known that STN neurons receive inhibitory GABAergic afferents from the GP [40,41] and that the increase in the activity of GP neurons could result in an increase of GABA release in this nucleus. These results represent additional evidence for neuroleptic-induced increase of the GP neuronal activity in agreement with other studies using quantitative *in situ* hybridization of GAD₆₇ mRNA expression, which is an index of GABAergic activity [42]. The firing rate increase of GP neurons can be also implicated in the decreased neuronal activity recorded in the SNr, since neurons of this nucleus receive dense GABAergic inputs from GP [43], which converge with subthalamo-nigral terminals on the same SNr neurons [44].

While considering how α -flupentixol influences GP activity, it is impossible to ignore the contribution of striatal MSNs. GP neurons receive inhibitory input from striatal MSNs expressing D2 receptors [5,8,37]. However, our electrophysiological results show that α -flupentixol did not induce any significant change in the spontaneous activity of striato-pallidal MSNs. Nevertheless, during cortical activation the decrease of the evoked response of striato-pallidal MSNs after the injection of α -flupentixol can reinforce the disinhibition of GP neuronal activity. Thus, at basal conditions,

the possible mechanism could be mediated by the direct alteration of dopamine transmission in GP as its neurons express mostly D2 receptors [45]. In agreement with this hypothesis, previous studies have shown that systemic administration of D2 antagonists induced Fos expression, the protein product of the immediate early gene *c-fos*, in the GP by its direct action within GP and not within the striatum [3,4,46]. Moreover, dopamine transmission within the GP has been shown to be necessary to achieve motor control. Bilateral blockade of dopamine transmission into the GP induced akinesia and catalepsy [26,47]. However, the infusion of dopamine in the same nucleus caused improvement of motor deficits in hemiparkinsonian rats [48].

Together, our results suggest that EPSs are correlated with changes in two major structures of the basal ganglia network, the STN and SNr and that these changes may be a consequence of the increased firing rate of GP neurons. This hypothesis was confirmed by our data showing that after selective ibotenic acid lesions of the GP, α -flupentixol failed to induce catalepsy and concomitantly any changes in subthalamic neuronal activity demonstrating the key role of the indirect pathway in the manifestation of EPS. These results are in line with previous studies showing that inactivation of the GP can elicit motor activation or reverse motor hypoactivity. Indeed, GP lesions have been shown to abolish neuroleptic-induced catalepsy [49–51].

In conclusion our results emphasize the key role of changes occurring in basal ganglia network implicated in the manifestation of EPS induced by a typical APD, demonstrating that hypokinesia and catalepsy-induced by α -flupentixol are clearly associated with hypoactivity and abnormal irregular patterns of STN and SNr neurons. The changes observed in these two nuclei are not mediated by MSNs of the striatum. Moreover, our study provides new insight into the role of GP, which is a key structure of the indirect pathway, in the pathophysiology of APD-induced EPS and that GP can be considered as a potential target for the treatment of EPS.

Acknowledgments

We thank Dr. Philippe De Deurwaerdere and Dr. François Gonon for critical reading of the manuscript and Laura Cardoit for her technical support.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JC AT BHB CEG AB. Performed the experiments: JC BB SL PB SM. Analyzed the data: JC BB. Contributed reagents/materials/analysis tools: JC AB. Wrote the paper: JC AB.

References

- Ban TA, Lehmann HE (1974) Thiothixene and the thioxanthenes. *Adv Biochem Psychopharmacol* 9: 481–486.
- Richelson E (1984) Neuroleptic affinities for human brain receptors and their use in predicting adverse effects. *J Clin Psychiatry* 45: 331–336.
- Ruskin DN, Marshall JF (1997) Differing influences of dopamine agonists and antagonists on Fos expression in identified populations of globus pallidus neurons. *Neuroscience* 81: 79–92.
- Marshall JF, Henry BL, Billings LM, Hoover BR (2001) The role of the globus pallidus D2 subfamily of dopamine receptors in pallidal immediate early gene expression. *Neuroscience* 105: 365–378.
- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12: 366–375.
- Alexander GE, DeLong MR, Strick PL (1986) Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci* 9: 357–381.
- Graybiel AM (1990) Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 13: 244–254.
- Gerfen CR (2000) Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways. *Trends Neurosci* 23: S64–70.
- Ni Z, Bouali-Benazzouz R, Gao D, Benabid AL, Benazzouz A (2000) Changes in the firing pattern of globus pallidus neurons after the degeneration of nigrostriatal pathway are mediated by the subthalamic nucleus in the rat. *Eur J Neurosci* 12: 4338–4344.
- Hassani OK, Mouroux M, Feger J (1996) Increased subthalamic neuronal activity after nigral dopaminergic lesion independent of disinhibition via the globus pallidus. *Neuroscience* 72: 105–115.
- Paxinos G, Watson C (1996) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press.
- Hess EJ, Norman AB, Creese I (1988) Chronic treatment with dopamine receptor antagonists: behavioral and pharmacologic effects on D1 and D2 dopamine receptors. *J Neurosci* 8: 2361–2370.
- Pitts SM, Horvitz JC (2000) Similar effects of D(1)/D(2) receptor blockade on feeding and locomotor behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 65: 433–438.
- Dulawa SC, Grandy DK, Low MJ, Paulus MP, Geyer MA (1999) Dopamine D4 receptor-knock-out mice exhibit reduced exploration of novel stimuli. *J Neurosci* 19: 9550–9556.
- Belujon P, Bezard E, Taupignon A, Bioulac B, Benazzouz A (2007) Noradrenergic modulation of subthalamic nucleus activity: behavioral and

- electrophysiological evidence in intact and 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J Neurosci* 27: 9595–9606.
16. Sanberg PR, Pevsner J, Coyle JT (1984) Parametric influences on catalepsy. *Psychopharmacology (Berl)* 82: 406–408.
 17. Wu YN, Hyland BI, Chen JJ (2007) Biomechanical and electromyogram characterization of neuroleptic-induced rigidity in the rat. *Neuroscience* 147: 183–196.
 18. Tai CH, Boraud T, Bezard E, Bioulac B, Gross C, et al. (2003) Electrophysiological and metabolic evidence that high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus bridges neuronal activity in the subthalamic nucleus and the substantia nigra reticulata. *FASEB J* 17: 1820–1830.
 19. Mallet N, Ballion B, Le Moine C, Gonon F (2006) Cortical inputs and GABA interneurons imbalance projection neurons in the striatum of parkinsonian rats. *J Neurosci* 26: 3875–3884.
 20. Mallet N, Le Moine C, Charpier S, Gonon F (2005) Feedforward inhibition of projection neurons by fast-spiking GABA interneurons in the rat striatum in vivo. *J Neurosci* 25: 3857–3869.
 21. Kaneoke Y, Vitek JL (1996) Burst and oscillation as disparate neuronal properties. *J Neurosci Methods* 68: 211–223.
 22. Boraud T, Bezard E, Guehl D, Bioulac B, Gross C (1998) Effects of L-DOPA on neuronal activity of the globus pallidus externalis (GPe) and globus pallidus internalis (GPi) in the MPTP-treated monkey. *Brain Res* 787: 157–160.
 23. Fowler SC, Liao RM, Skjoldager P (1990) A new rodent model for neuroleptic-induced pseudo-parkinsonism: low doses of haloperidol increase forelimb tremor in the rat. *Behav Neurosci* 104: 449–456.
 24. Eltayb A, Wadenberg ML, Svensson TH (2005) Enhanced cortical dopamine output and antipsychotic-like effect of raclopride with adjunctive low-dose L-dopa. *Biol Psychiatry* 58: 337–343.
 25. Hauber W, Neuscheler P, Nagel J, Müller CE (2001) Catalepsy induced by a blockade of dopamine D1 or D2 receptors was reversed by a concomitant blockade of adenosine A(2A) receptors in the caudate-putamen of rats. *Eur J Neurosci* 14: 1287–1293.
 26. Hauber W, Lutz S (1999) Dopamine D1 or D2 receptor blockade in the globus pallidus produces akinesia in the rat. *Behav Brain Res* 106: 143–150.
 27. Farde L, Nordstrom AL (1992) PET analysis indicates atypical central dopamine receptor occupancy in clozapine-treated patients. *Br J Psychiatry Suppl.* pp 30–33.
 28. Farde L, Nordstrom AL, Wiesel FA, Pauli S, Halldin C, et al. (1992) Positron emission tomographic analysis of central D1 and D2 dopamine receptor occupancy in patients treated with classical neuroleptics and clozapine. Relation to extrapyramidal side effects. *Arch Gen Psychiatry* 49: 538–544.
 29. Farde L, Wiesel FA, Halldin C, Sedvall G (1988) Central D2-dopamine receptor occupancy in schizophrenic patients treated with antipsychotic drugs. *Arch Gen Psychiatry* 45: 71–76.
 30. Kapur S, Zipursky R, Jones C, Remington G, Houle S (2000) Relationship between dopamine D(2) occupancy, clinical response, and side effects: a double-blind PET study of first-episode schizophrenia. *Am J Psychiatry* 157: 514–520.
 31. Mukherjee J, Christian BT, Narayanan TK, Shi B, Mantil J (2001) Evaluation of dopamine D-2 receptor occupancy by clozapine, risperidone, and haloperidol in vivo in the rodent and nonhuman primate brain using 18F-fallypride. *Neuropsychopharmacology* 25: 476–488.
 32. Boulay D, Depoortere R, Oblin A, Sanger DJ, Schoemaker H, et al. (2000) Haloperidol-induced catalepsy is absent in dopamine D(2), but maintained in dopamine D(3) receptor knock-out mice. *Eur J Pharmacol* 391: 63–73.
 33. Reimold M, Solbach C, Noda S, Schaefer JE, Bartels M, et al. (2007) Occupancy of dopamine D(1), D (2) and serotonin (2A) receptors in schizophrenic patients treated with flupentixol in comparison with risperidone and haloperidol. *Psychopharmacology (Berl)* 190: 241–249.
 34. Burbaud P, Gross C, Benazzouz A, Coussemacq M, Bioulac B (1995) Reduction of apomorphine-induced rotational behaviour by subthalamic lesion in 6-OHDA lesioned rats is associated with a normalization of firing rate and discharge pattern of pars reticulata neurons. *Exp Brain Res* 105: 48–58.
 35. Murer MG, Riquelme LA, Tseng KY, Pazo JH (1997) Substantia nigra pars reticulata single unit activity in normal and 6OHDA-lesioned rats: effects of intrastriatal apomorphine and subthalamic lesions. *Synapse* 27: 278–293.
 36. Tseng KY, Kargieman L, Gacio S, Riquelme LA, Murer MG (2005) Consequences of partial and severe dopaminergic lesion on basal ganglia oscillatory activity and akinesia. *Eur J Neurosci* 22: 2579–2586.
 37. DeLong MR (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci* 13: 281–285.
 38. Deniau JM, Maily P, Maurice N, Charpier S (2007) The pars reticulata of the substantia nigra: a window to basal ganglia output. *Prog Brain Res* 160: 151–172.
 39. Feger J, Robledo P (1991) The Effects of Activation or Inhibition of the Subthalamic Nucleus on the Metabolic and Electrophysiological Activities Within the Pallidal Complex and Substantia Nigra in the Rat. *Eur J Neurosci* 3: 947–952.
 40. Parent A, Hazrati LN (1995) Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Brain Res Rev* 20: 128–154.
 41. Smith Y, Bolam JP (1990) The output neurones and the dopaminergic neurones of the substantia nigra receive a GABA-containing input from the globus pallidus in the rat. *J Comp Neurol* 296: 47–64.
 42. Delfs JM, Aneqawa NJ, Chesselet MF (1995) Glutamate decarboxylase messenger RNA in rat pallidum: comparison of the effects of haloperidol, clozapine and combined haloperidol-scopolamine treatments. *Neuroscience* 66: 67–80.
 43. Smith Y, Bolam JP (1989) Neurons of the substantia nigra reticulata receive a dense GABA-containing input from the globus pallidus in the rat. *Brain Res* 493: 160–167.
 44. Fujimoto K, Kita H (1992) Responses of rat substantia nigra pars reticulata units to cortical stimulation. *Neurosci Lett* 142: 105–109.
 45. Tepper JM, Koos T, Wilson CJ (2004) GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trends Neurosci* 27: 662–669.
 46. Billings LM, Marshall JF (2003) D2 antagonist-induced c-fos in an identified subpopulation of globus pallidus neurons by a direct intrapallidal action. *Brain Res* 964: 237–243.
 47. Costall B, Naylor RJ, Olley JE (1972) Catalepsy and circling behaviour after intracerebral injections of neuroleptic, cholinergic and anticholinergic agents into the caudate-putamen, globus pallidus and substantia nigra of rat brain. *Neuropharmacology* 11: 645–663.
 48. Galvan A, Floran B, Eriij D, Aceves J (2001) Intrapallidal dopamine restores motor deficits induced by 6-hydroxydopamine in the rat. *J Neural Transm* 108: 153–166.
 49. Costall B, Olley JE (1971) Cholinergic and neuroleptic induced catalepsy: modification by lesions in the globus pallidus and substantia nigra. *Neuropharmacology* 10: 581–594.
 50. Hauber W, Lutz S, Munkle M (1998) The effects of globus pallidus lesions on dopamine-dependent motor behaviour in rats. *Neuroscience* 86: 147–157.
 51. Ossowska K, Smialowska M, Wolfarth S (1983) A biphasic influence of globus pallidus lesions: spontaneous catalepsy followed by anticataleptic effect. *Pharmacol Biochem Behav* 19: 169–176.

3. Article 3 :

Acute versus chronic treatment with Haloperidol: neuronal correlates in the subthalamic nucleus

Jonathan Chetrit, Claire Delaville, Stéphanie Morin, Asier Aristieta and Abdelhamid Benazzouz.

(en préparation)

Acute versus chronic treatment with Haloperidol: neuronal correlates in the subthalamic nucleus

Jonathan Chetrit^{1,2}, Claire Delaville^{1,2}, Asier Aristieta^{2,3}, Stephanie Morin^{1,2} and Abdelhamid Benazzouz^{1,2}.

1. Université de Bordeaux, Bordeaux, F-33076, France

2. Centre Nationale de le Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5227 (CNRS UMR 5227), Bordeaux, F-33076, France

3. Department of Pharmacology, University of the Basque Country, Leix Vizcaya, E-48940, Spain

Abbreviated title: subthalamic nucleus and tardive dyskinesia

Correspondence should be addressed to Dr. Abdelhamid Benazzouz, CNRS UMR 5227, Université Victor Segalen, 146 rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France

E-mail: abdelhamid.benazzouz@u-bordeaux2.fr

Number of figures: 2

Number of pages: 17

Keywords: dopamine, typical antipsychotics, subthalamic nucleus, tardive dyskinesia, electrophysiology

ABSTRACT

Typical antipsychotic drugs (APDs), are used extensively to treat psychotic disorders but, long-term treatment is counterbalanced by the property of the APDs to induce extrapyramidal side-effects (EPS) such as catalepsy/hypokinesia and tardive dyskinesia (TD). The subthalamic nucleus (STN) has been shown to play a key role in the motor control but little is known about its implication in the pathophysiology of EPS. The present study aimed to investigate whether the STN is involved in the manifestation of motor disabilities induced by acute and chronic treatments with a typical APD, haloperidol. Effects of these two treatments was studied upon (i) behavioral motor activity and catalepsy measured by an open field and the bar test respectively and (ii) STN neuronal activity using extracellular recordings *in vivo*. We show that acute as well as chronic treatment with haloperidol (1 m/kg) induced catalepsy and hypokinesia and that only repeated injections of haloperidol during 21 days induced tardive orofacial dyskinesia. Electrophysiological data show that both acute and chronic haloperidol treatments induced a significant increase in the number of STN neurons discharging with bursts and prominent oscillatory firing in the 0.5-2 Hz range. Importantly, this oscillatory pattern was not accompanied by changes in the firing rate in comparison with controls. Our study reports evidence to show that catalepsy and hypokinesia induced by acute as well as chronic treatment with haloperidol are triggered by oscillatory burst firing of STN neurons and that this pattern of discharge is not related to the manifestation of oral dyskinesia.

INTRODUCTION

Typical antipsychotic drugs (APDs), are used extensively to treat psychotic disorders but, long-term treatment is counterbalanced by the property of the APDs to induce extrapyramidal side-effects (EPS) such as catalepsy/hypokinesia and tardive dyskinesia (TD) (Browne et al., 1996). TD is an iatrogenic syndrome of persistent abnormal involuntary movements, characterized by repetitive, stereotyped, choreoathetoid movements of the oro-buccal-lingual-facial musculature, though other parts of the body may also be affected (e.g. limbs, trunk) (for review see (Kane, 1995). Although their pathophysiology is not well understood, catalepsy and TD may have some mechanisms in common with parkinsonism and levodopa-induced dyskinesia related to dysfunctions in basal ganglia circuitry. Furthermore, acute injection of D1 or D2 antagonists as well as D1/D2 antagonists in the rat are well known to induce catalepsy and hypokinesia without dyskinesia (Degos et al., 2005; Chetrit et al., 2009). However, in addition to catalepsy and hypokinesia, long term treatment leads to the development of TD in the rat (Bishnoi et al., 2008) and monkey (Crossman et al., 1984; Stoessl and Rajakumar, 1996). As very little information is available on the neuronal correlates of motor side effects induced by APDs (Degos et al., 2005; Chetrit et al., 2009), it is necessary to investigate the changes in basal ganglia nuclei associated with these motor disabilities.

Among the basal ganglia, the subthalamic nucleus (STN), which represents the only glutamatergic structure of the basal ganglia, has been shown to play a key role in the control of movement. It has been linked with hemiballismus, since STN-lesion is associated with the appearance of abnormal involuntary movements (AIMs) (Whittier, 1947; Hammond et al., 1979). These AIMs can be also reproduced by pharmacological manipulations of GABA transmission after “in situ” injection of

GABA agonists or antagonists in non-human primate (Crossman et al., 1984; Baron et al., 2002). Moreover, several studies have demonstrated that abnormal STN neuronal activity is associated with the manifestation of parkinsonian motor symptoms (Bergman et al., 1994) and that lesions-induced dyskinesia (Bergman et al., 1990; Aziz et al., 1991) or high frequency stimulation (Benazzouz et al., 1993; Limousin et al., 1998; Krack et al., 2003) improved parkinsonian motor symptoms. Other evidence has shown that local unilateral infusion of the 5-HT_{2C} agonist into the subthalamic nucleus induced orofacial dyskinetic movements, which were blocked by systemic administration of the 5-HT_{2C} antagonists. Altogether, these studies show that the STN is implicated in the manifestation of hypokinesia and orofacial dyskinetic movements, however, the neuronal correlates of these motor disorders in the STN is still unknown.

The present study aimed to investigate whether STN neuronal activity is involved in the manifestation of motor disabilities induced by acute and chronic treatments with a typical APD, haloperidol. Effects of these two treatments was studied upon (i) behavioral motor activity and catalepsy measured by an open field and the bar test respectively and (ii) STN neuronal activity using extracellular recordings *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Adult male Sprague-Dawley rats, weighing 280-380 g were used for behavioral, *in vivo* electrophysiological and histochemical experiments. Animals were provided by the “Centre d'Élevage Dépré” (Saint Doulchard, France) and arrived at least one week before use. They were housed five per cage under artificial conditions of light (light/dark cycle, light on at 7:00 a.m.), temperature (24°C), and humidity (45%) with food and water available *ad libitum*. All animal experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

Chronic treatment with antipsychotic.

During 21 days, which is the necessary time reported to induce orofacial dyskinesia in rats, animals received chronically haloperidol (1 mg/kg, Haldol®, Janssen-Cilag, Neuss, Germany). Haloperidol was diluted in isotonic saline and injections were given i.p. in a volume of 0.25 ml/100 g body weight. All solutions were freshly prepared before injection. Orofacial dyskinesia were monitored each days by placing rats in individual cages just after daily injections and observing its abnormal orofacial movements as previously described (ref).

Evaluation of motor activity (Open-field actimeter)

Spontaneous horizontal locomotion, vertical activity (or rearing) and stereotyped movements were measured using a photoelectric actimeter (Actitrack, Panlab, S.L., Barcelona, Spain), as previously described (Dulawa et al., 1999; Belujon et al., 2007; Chetrit et al., 2009). Briefly, the apparatus consisted of a transparent cage that was connected to a photoelectric cell. Light beams detected movement and the total locomotor activity of each rat

were recorded over two sessions of 10 minutes each day. All testing in the actimeter were done in an isolated room between 8:00 a.m. and 1:00 p.m. Spontaneous locomotor activity was recorded during four consecutive days (days 1-4; 2 times 10 minutes each) in which rats were habituated to manipulation by the experimenter. The first session of 10 minutes was considered as the daily habituation. Only the locomotor activity recorded during the second session of 10 minutes on day 4 was used for data analysis. Rats received injection 20 minutes prior the placement in the actimeter.

Statistical analyses were done using Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Values were compared using the Wilcoxon matched-pairs signed ranks test.

Evaluation of catalepsy scores (bar test)

The standard bar test was used to determine the intensity of catalepsy 40 minutes after drug injection as previously reported (Sanberg et al., 1984; Chetrit et al., 2009). Both of the rat's forepaws were placed on a horizontal bar (diameter, 0.7 cm), which was 9 cm above the surface. We recorded the time from placing the forepaws to the first complete removal of one of them from the support bar with a cutoff time of 120 seconds, which is termed here as descent latency.

Extracellular recordings

Extracellular single-unit recordings were made in rats anesthetized with urethane (1.2 g/kg, i.p.) as previously reported (Tai et al., 2003; Belujon et al., 2007; Chetrit et al., 2009), one day after the arrest of haloperidol treatment. Extracellular neuronal activity was amplified, bandpass-filtered (300-3000 Hz) using a preamplifier (Neurolog, Digitimer, UK), displayed on an oscilloscope, transferred *via* a Powerlab interface (AD Instruments, Charlotte,

NC, USA) to a computer equipped with Chart 5 software (AD Instruments, Charlotte, NC, USA). Only neuronal activity with a signal-to-noise ratio $> 3:1$ was recorded and used for further investigation. Basal firing of neurons was recorded for 20 minutes before drug injection to ascertain the stability of the discharge activity. The last recording site was marked by electrophoretic injection (Iso DAM 80, WPI, Hertfordshire, UK) of Pontamine sky blue through the micropipette at a negative current of $20 \mu\text{A}$ for 7 minutes. After completion of experiments, animals were sacrificed by an overdose of urethane, the brains removed, frozen in isopentane at $-45 \text{ }^\circ\text{C}$ and stored at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Fresh-frozen brains were cryostat-cut into coronal $20 \mu\text{m}$ sections for further validation of the location of recording track into the STN as previously described (Tai et al., 2003; Belujon et al., 2007; Chetrit et al., 2009). To this aim, acetylcholine esterase staining was used to contrast structures and make easier the location of the Pontamine sky blue dots marking the recording sites. Only those brains in which the location of the Pontamine sky blue dot was clearly visible in the target structure were used for data analysis.

Data analysis

The activity of each neuron was analyzed with a spike discriminator using a spike histogram program (AD Instruments, Charlotte, NC, USA) and firing parameters (firing rates, interspike intervals and power spectra oscillation frequency) were calculated using Neuroexplorer program (AlphaOmega, Nazareth, Israel). Interspike interval, autocorrelogram and power spectra histograms were constructed using the same program. Firing patterns were analyzed using the method developed by (Kaneoke and Vitek, 1996) as previously described (Boraud et al., 1998; Tai et al., 2003).

RESULTS

Effects of acute haloperidol injection on locomotor activity

As previously reported (Belujon et al., 2007; Chetrit et al., 2009), using an open field photoelectric actimeter, the behavior of the animals was stable after three days habituation, indicating that the rats were accommodated to their test environment. Values are presented as mean of counts per 10 minutes \pm S.E.M. Results reported as “control” on figure 1 correspond to the measure on day 4 after intraperitoneal saline injection. Multicomparisons between the three groups ($n=8$) show a significant difference for the three parameters (one way ANOVA, $F=21.01$, $p<0.0001$ for horizontal movements; $F=20.03$, $p<0.0001$ for rearing; $F=20.60$, $p<0.0001$ for stereotypy). Acute injection of haloperidol (1 mg/kg) significantly decreased horizontal activity by 96.3% (42.7 ± 18.4 vs 1174.0 ± 189.3 in control, Dunnett’s test, $p<0.01$), rearing by 98.8% (0.3 ± 0.2 vs 33.5 ± 5.9 in control, $p<0.01$) and stereotypy by 77.3% (261.0 ± 59.1 vs 1551.0 ± 135.0 in control, $p<0.01$). A post-challenge test on day 6, in which haloperidol was replaced by saline vehicle, show that the same parameters are still affected without any return to the basal level. Relative to control values, horizontal activity (532.8 ± 116.3) decreased by 54.6% ($p<0.01$), rearing (11.5 ± 4.2) by 45.4% ($p<0.01$) and stereotypy (846.8 ± 185.3) by 77.3% ($p<0.01$).

The same rats ($n=8$) were used for the bar test to measure the cataleptic effect of haloperidol. When placed on the bar, control rats moved from their awkward position. In contrast, 40 minutes after systemic acute injection of haloperidol a dramatic cataleptic state was observed. The rats maintained their position on the bar with a mean of 22.1 ± 4.5 s (descent latency) and this cataleptic state persisted the day after (10.8 ± 3.5 s descent latency) even without any additional injection of haloperidol (Fig. 1B). Statistical test showed a

significant difference in comparison with control values (one way ANOVA, $F=18.31$, $p<0.0001$).

Effects of chronic haloperidol injections on locomotor activity

All animals ($n=9$) developed orofacial dyskinesia 18 to 20 days after the beginning of systemic injections of haloperidol (1 mg/kg/day during 21 days). Systemic injections of haloperidol significantly decreased all the movement parameters at all the tested time points (one way ANOVA, $F=14.69$, $p<0.0001$ for horizontal movements; $F=8.13$, $p<0.0001$ for rearing; $F=14.60$, $p<0.0001$ for stereotypy). On day 21, horizontal activity decreased by 93.6% (92.0 ± 43.6 vs 1433.0 ± 284.0 in control, Dunnett's test, $p<0.01$), rearing by 86.7% (2.9 ± 1.72 vs 21.8 ± 5.2 in control, $p<0.01$) and stereotypy by 81.9% (307.9 ± 26.1 vs 1707.0 ± 203.0 in control, $p<0.01$). Any potentiation of motor disturbances induced by the chronic treatment was observed since no significant differences were observed between days 0, 7, 14 and 21 (one way ANOVA, $F=1.74$, $p=0.16$ for horizontal movements; $F=1.03$, $p=0.41$ for rearing; $F=2.36$, $p=0.07$ for stereotypy).

The same rats ($n=9$) were used for the bar test to measure the cataleptic effect of haloperidol. Repeated systemic injections of haloperidol induced dramatic catalepsy states at all the time points of the tests (Fig. 2D). One way ANOVA test shows a significant difference between all the groups ($F=17.24$, $p<0.0001$). At day 21, the rats maintained their position on the bar with a mean descent latency of 30.22 ± 3.90 s. Any potentiation of catalepsy induced by repeated injections of haloperidol was observed since no significant differences were observed between days 0, 7, 14 and 21 (One way ANOVA, $F=2.55$, $p=0.08$)

Effects of haloperidol injections on STN neuronal activity

In control rats, the mean firing rate of STN neurons ($n=59$ in 6 rats) was 11.4 ± 1.0 spikes/s. No significant differences were observed neither after acute (8.8 ± 1.4 spikes/s, $n= 67$ in 6 rats) nor after chronic treatment (8.4 ± 0.8 spikes/s, $n= 69$ in 6 rats) with haloperidol (one way ANOVA, $F=1.934$, $p=0.147$) (Fig. 3A). However, both acute and chronic haloperidol treatments induced significant changes in the distribution of firing patterns of STN neurons in comparison with control rats ($\chi^2=12.785$, $p=0.001$ and $\chi^2=10.720$, $p=0.004$, respectively) (Fig. 3B). Indeed, 35.4% of STN neurons are bursty (vs 14.5% in control rats), 23.1% are irregular (vs 14.5% in control rats) and 41.5% are regular (vs 71.0 % in control rats). Chronic treatment did not potentiate electrophysiological modifications as 29.4% of recorded STN neurons are bursty, 26.5% are irregular and 44.1% are regular ($\chi^2=0.573$, $p= 0.751$). Moreover haloperidol induced an increase in the number of oscillatory neurons after acute (25/67, 37.3%, $\chi^2=10.72$, $p=0.001$) and chronic (22/69, 31.9%, $\chi^2=7.27$, $p=0.007$) treatments in comparison with controls (7/59, 11.9%). However, no difference was observed between acute and chronic populations ($\chi^2=0.44$, $p=0.50$). Figure 4 shows a representative example of oscillatory neurons. Examination of power spectra showed preferential low frequency oscillations with the same rhythmic character in the three groups. The mean \pm S.E.M. of oscillation frequencies was 0.95 ± 0.18 Hz (range: 0.27–1.0 Hz) in control rats, 1.05 ± 0.09 Hz (range: 0.6-2.07 Hz) in acute haloperidol-treated rats and 0.94 ± 0.17 (range: 0.5-2.04 Hz) in chronic treated rats. No significant difference was observed between the three group (Kruskal Wallis test, $F=1.92$, $p=0.38$).

DISCUSSION

Our study shows that both acute and chronic administration of haloperidol (1 mg/kg) induced catalepsy and hypokinesia and that a minimum of 18 days of treatment was necessary for the development of orofacial dyskinesia. Catalepsy and hypokinesia were associated with oscillatory burst firing of STN neurons at low range frequencies and that this pattern of discharge is not related to the manifestation of oral dyskinesia.

Behavioral results show that acute injection of haloperidol (1mg/kg) induced hypokinesia and catalepsy that persisted at least one day after treatment. These motor disturbances, qualified as extrapyramidal side-effects, were similar to those already reported in other studies including in our group (Degos et al., 2005; Chetrit et al., 2009). They were not accompanied by dyskinesia, as these abnormal involuntary movements necessitated a long term treatment (see below). Electrophysiological recordings of STN neuronal activity in urethane-anesthetized rats have shown dramatic changes in the distribution of the firing pattern, without any change in the firing rate. In fact, the percentage of irregular and burst-firing neurons increased in comparison with controls. Bursty neurons were characterized by a rhythmic oscillant firing of spike train in the 0.5-2 Hz frequency range. These results are in agreement with other studies, which showed similar changes in other basal ganglia nuclei after haloperidol or D1/D2 antagonist treatments. Burkhardt et al. (Burkhardt et al., 2007) have shown that acute dopamine blockade with high-dose haloperidol induced prominent oscillatory firing in the 6-8 Hz frequency range of either the striatum and globus pallidus and that this oscillatory pattern was not accompanied by consistent changes in the firing rate. Moreover, another group have shown that after dopamine blockade, most of the *substantia nigra pars reticulata* (SNr) neurons became irregular and bursty with a marked rhythmic

character at low frequency range (0.2-1 Hz) (Degos et al., 2005) similar to that was found in our study. Degos et al. (2005) have also shown that the mean firing rate of SNr neurons was not modified after the injection of neuroleptics. The difference observed in the frequency range of oscillations recorded in the STN/SNr and that of the striatum and GP and that of Degos et al. (2005) could be explained by the fact that in Degos and our study recordings were made under general anesthesia, which is known to induce slow cortical waves, whereas recordings in the striatum and GP (Burkhardt et al., 2007) were done in awake freely moving rats characterized by activated cortical waves.

Chronic treatment with the same dose of haloperidol did not potentiate catalepsy and hypokinesia. Nevertheless, it induced orofacial dyskinesia. This phenomenon was accompanied by similar changes in the STN neuronal activity than those observed after acute haloperidol treatment. We report an increase in the percentage of burst-firing neurons with oscillation rhythms at the same frequency range without a change in the firing rate. These data indicate that changes in the STN neuronal activity are involved in the development of motor disturbances, hypokinesia and catalepsy but not in the development of orofacial dyskinesia induced by repeated injections of haloperidol. Interestingly, a recent study had rise the hypothesis of different functional subcircuits associated with akinetic and dyskinetic dysfunctions in the basal ganglia network: one, including STN and SNr, involved in parkinsonian-like motor symptoms, and the other one, including the entopeduncular nucleus (EP), preferentially involved in L-Dopa induced-dyskinesia (Lacombe et al., 2009). L-DOPA treatment induced a global “wake up” of the striatal efferences of the direct pathway, which resulted in a dramatic decrease of metabolic activity in the EP but not in the SNr. This study highlights the entopeduncular nucleus hypoactivity as a major cellular substrate of L-Dopa-induced dyskinesia.

The electrophysiological changes observed in the STN after the administration of typical APDs depend on the nature of the drug used. In contrast to the present electrophysiological data, in our previous study (Chetrit et al., 2009), in which we used the same protocols in the same experimental conditions, we have shown that acute injection of α -flupentixol induced EPS paralleled by a decrease in the firing rate and a disorganization of the firing pattern of STN neurons. This discharge pattern disorganization was characterized by a switch from a tonic regular to an irregular firing pattern without rhythmic oscillations. This difference could be due to the fact that clinically α -flupentixol is classified in the frontier between typical and atypical APDs depending on its receptor-binding profile (Kuhn et al., 2000). These authors suggest that α -flupentixol has to be labeled at least a “partial atypical neuroleptic”.

CONCLUSION

Our study reports evidence to show that catalepsy and hypokinesia induced by acute as well as chronic treatment with haloperidol are triggered by oscillatory burst firing of STN neurons and that this pattern of discharge is not involved in the development of oral dyskinesia.

REFERENCES

- Aziz TZ, Peggs D, Sambrook MA, Crossman AR (1991) Lesion of the subthalamic nucleus for the alleviation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonism in the primate. *Mov Disord* 6:288-292.
- Baron MS, Wichmann T, Ma D, DeLong MR (2002) Effects of transient focal inactivation of the basal ganglia in parkinsonian primates. *J Neurosci* 22:592-599.
- Belujon P, Bezard E, Taupignon A, Bioulac B, Benazzouz A (2007) Noradrenergic modulation of subthalamic nucleus activity: behavioral and electrophysiological evidence in intact and 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J Neurosci* 27:9595-9606.
- Benazzouz A, Gross C, Feger J, Boraud T, Bioulac B (1993) Reversal of rigidity and improvement in motor performance by subthalamic high-frequency stimulation in MPTP-treated monkeys. *Eur J Neurosci* 5:382-389.
- Bergman H, Wichmann T, DeLong MR (1990) Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science* 249:1436-1438.
- Bergman H, Wichmann T, Karmon B, DeLong MR (1994) The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism. *J Neurophysiol* 72:507-520.
- Bishnoi M, Chopra K, Kulkarni SK (2008) Differential striatal levels of TNF-alpha, NFkappaB p65 subunit and dopamine with chronic typical and atypical neuroleptic treatment: role in orofacial dyskinesia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32:1473-1478.
- Boraud T, Bezard E, Guehl D, Bioulac B, Gross C (1998) Effects of L-DOPA on neuronal activity of the globus pallidus externalis (GPe) and globus pallidus internalis (GPi) in the MPTP-treated monkey. *Brain Res* 787:157-160.
- Browne S, Roe M, Lane A, Gervin M, Morris M, Kinsella A, Larkin C, Callaghan EO (1996) Quality of life in schizophrenia: relationship to sociodemographic factors, symptomatology and tardive dyskinesia. *Acta Psychiatr Scand* 94:118-124.
- Burkhardt JM, Constantinidis C, Anstrom KK, Roberts DC, Woodward DJ (2007) Synchronous oscillations and phase reorganization in the basal ganglia during akinesia induced by high-dose haloperidol. *Eur J Neurosci* 26:1912-1924.
- Chetrit J, Ballion B, Laquitaine S, Belujon P, Morin S, Taupignon A, Bioulac B, Gross CE, Benazzouz A (2009) Involvement of Basal Ganglia network in motor disabilities induced by typical antipsychotics. *PLoS One* 4:e6208.
- Crossman AR, Sambrook MA, Jackson A (1984) Experimental hemichorea/hemiballismus in the monkey. Studies on the intracerebral site of action in a drug-induced dyskinesia. *Brain* 107 (Pt 2):579-596.
- Degos B, Deniau JM, Thierry AM, Glowinski J, Pezard L, Maurice N (2005) Neuroleptic-induced catalepsy: electrophysiological mechanisms of functional recovery induced by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *J Neurosci* 25:7687-7696.
- Dulawa SC, Grandy DK, Low MJ, Paulus MP, Geyer MA (1999) Dopamine D4 receptor-knock-out mice exhibit reduced exploration of novel stimuli. *J Neurosci* 19:9550-9556.
- Hammond C, Feger J, Bioulac B, Souteyrand JP (1979) Experimental hemiballismus in the monkey produced by unilateral kainic acid lesion in corpus Luysii. *Brain Res* 171:577-580.
- Kane JM (1995) Antipsychotic medication in the treatment of schizophrenia. *Isr J Psychiatry Relat Sci* 32:30-37.
- Kaneoke Y, Vitek JL (1996) Burst and oscillation as disparate neuronal properties. *J Neurosci Methods* 68:211-223.

- Krack P, Batir A, Van Blercom N, Chabardes S, Fraix V, Ardouin C, Koudsie A, Limousin PD, Benazzouz A, LeBas JF, Benabid AL, Pollak P (2003) Five-year follow-up of bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med* 349:1925-1934.
- Kuhn KU, Meyer K, Maier W (2000) [Flupenthixol--a partial atypical neuroleptic?]. *Fortschr Neurol Psychiatr* 68 Suppl 1:S38-41.
- Lacombe E, Khaindrava V, Melon C, Oueslati A, Kerkerian-Le Goff L, Salin P (2009) Different functional basal ganglia subcircuits associated with anti-akinetic and dyskinesigenic effects of antiparkinsonian therapies. *Neurobiol Dis* 36:116-125.
- Limousin P, Krack P, Pollak P, Benazzouz A, Ardouin C, Hoffmann D, Benabid AL (1998) Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med* 339:1105-1111.
- Sanberg PR, Pevsner J, Coyle JT (1984) Parametric influences on catalepsy. *Psychopharmacology (Berl)* 82:406-408.
- Stoessl AJ, Rajakumar N (1996) Effects of subthalamic nucleus lesions in a putative model of tardive dyskinesia in the rat. *Synapse* 24:256-261.
- Tai CH, Boraud T, Bezard E, Bioulac B, Gross C, Benazzouz A (2003) Electrophysiological and metabolic evidence that high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus bridges neuronal activity in the subthalamic nucleus and the substantia nigra reticulata. *FASEB J* 17:1820-1830.
- Whittier JR (1947) Ballism and the subthalamic nucleus (hypothalamicus; corpus luyisi) review of the literature and study of 30 cases. *Arch Neurol Psychiatry* 58:672-692.

FIGURES AND LEGENDS

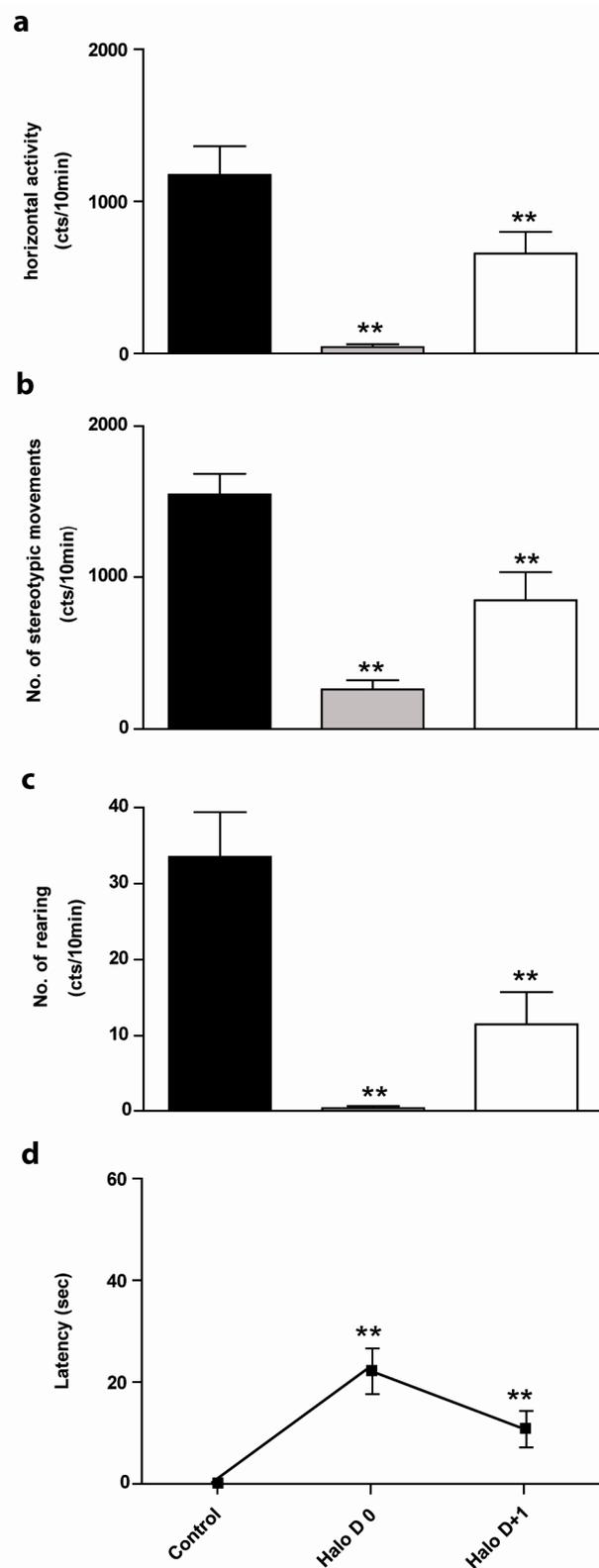


Figure 1. Acute injection of haloperidol induces hypolocomotor activity and catalepsy

(a-c) Histograms illustrating the scored motor activity recorded during the second ten minutes session thirty minutes after the injection of saline (control) or haloperidol (Halo D0, n=8), and one day after haloperidol injection (Halo D+1). Note that haloperidol induced a significant decrease in the scored horizontal activity (a), stereotypic movements (b) and rearing activity (c) in comparison with control values even one day after the injection. Values are presented as the mean \pm S.E.M. cts/10min = counts/10 minutes.

(d) The cataleptic effect of an acute injection of haloperidol forty minutes after the injection on day 0 and one day after. Values are presented as the mean \pm S.E.M. of the latency measured from paw placement until the first complete removal of one paw from the bar during the catalepsy test.

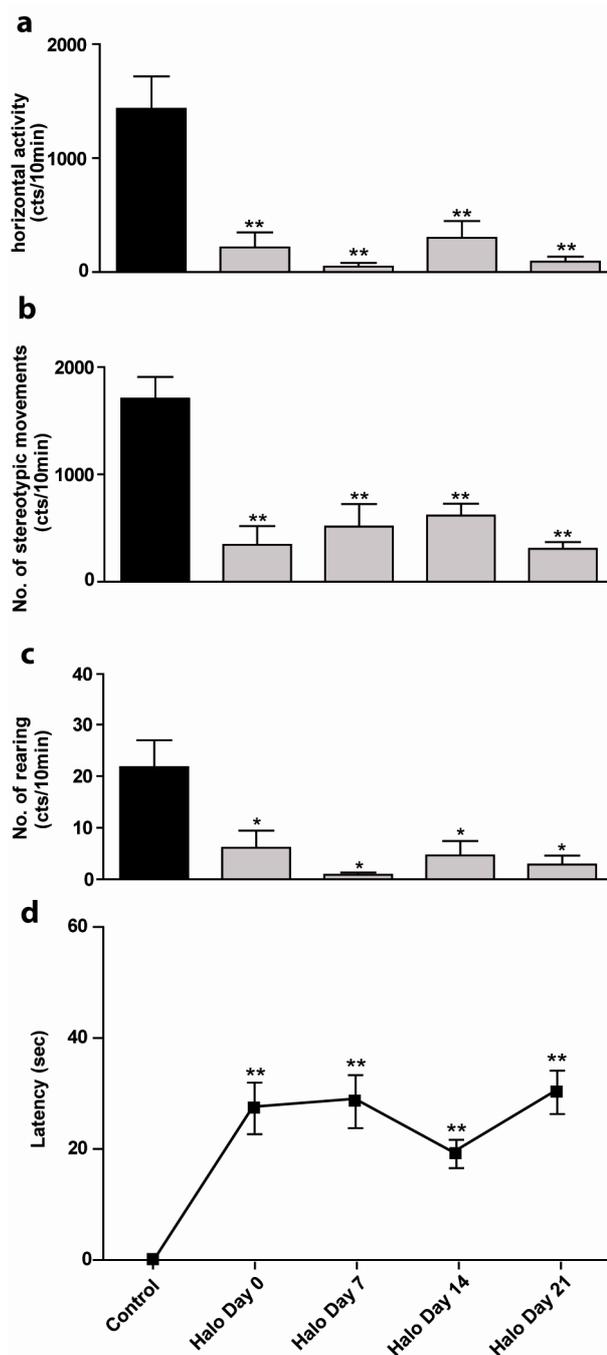


Figure 2. Chronic injections of haloperidol induces hypomotor activity and catalepsy

(a-c) Histograms illustrating the scored motor activity recorded during the second ten minutes session thirty minutes after the injection of saline (control) or haloperidol respectively on day 0, 7, 14 and 21 of the treatment. Note that haloperidol induced a significant decrease in the scored horizontal activity (a), stereotypic movements (b) and vertical activity (c) in comparison with controls. Values are presented as the mean \pm S.E.M. cts/10min = counts/10 minutes.

(d) Evolution of catalepsy induced by chronic treatment with haloperidol forty minutes after the injection. Values are presented as the mean \pm S.E.M. of the latency measured from paw placement until the first complete removal of one paw from the bar during the catalepsy test.

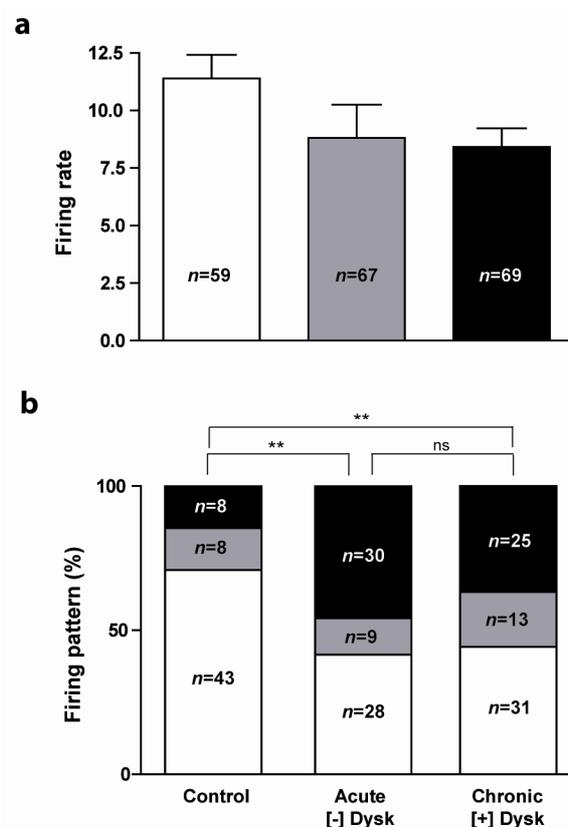


Figure 3: Effects of acute and chronic haloperidol treatment on STN neuronal activity

(a) Both acute and chronic treatment with haloperidol had no effect on the firing rate of STN neurons recorded in urethane anaesthetized rats.

(b) Firing pattern distribution of STN neurons recorded in control rats and in rats that received acute or chronic treatment with haloperidol. Note that both acute and chronic haloperidol treatments induced an increase in the proportion of irregular and burst-firing neurons within the STN, in comparison with controls. White: regular neurons, grey: irregular and black: burst-firing neurons. **: $p < 0.01$ (Chi Square test: χ^2).

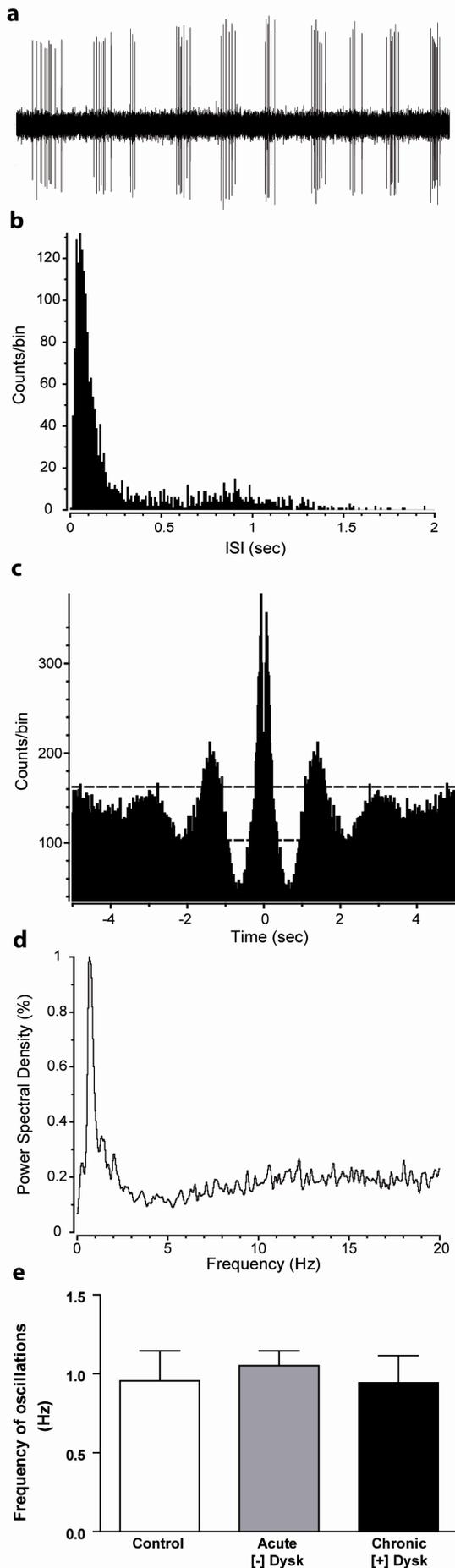


Figure 4: Haloperidol-induced prominent oscillatory firing pattern in STN neurons.

(a) Representative example of 10 seconds extracellular recording of an oscillatory STN neuron after haloperidol treatment. (b) interspike interval histogram, (c) autocorrelogram and (d) The power spectral density of the same oscillatory neuron in (a).

(e) Histograms representing the mean±S.E.M. of frequency of oscillations of all burst-firing neurons recorded in the STN, in control rats (control) and in animals that had received acute ([-] Dysk) or chronic ([+] Dysk) injections of haloperidol. [-] Dysk: rats without orofacial dyskinesia; [+] Dysk: rats with orofacial dyskinesia.

III. Publications annexes.

J'ai participé au sein de l'équipe, à des travaux connexes visant à mieux comprendre le rôle de l'innervation dopaminergique striatale et extrastriatale sur la modulation de l'activité électrique des ganglions de la base. Ces travaux ont fait l'objet de deux publications.

1. Article 4 :

Intrapallidal injection of 6-hydroxydopamine induced changes in dopamine innervation and neuronal activity of globus pallidus

Rabia Bouali-Benazzouz, Chun Hew Tai, Jonathan Chetrit and Abdelhamid Benazzouz.

Neuroscience 164(2): doi:10.1016/j.neuroscience.2009.07.034

INTRAPALLIDAL INJECTION OF 6-HYDROXYDOPAMINE INDUCED CHANGES IN DOPAMINE INNERVATION AND NEURONAL ACTIVITY OF GLOBUS PALLIDUS

R. BOUALI-BENAZZOUC^{a,b1} C. H. TAI^{a,c,d1}
J. CHETRIT^{a,c} AND A. BENAZZOUC^{a,c,e*}

^aUniversité de Bordeaux, 146 Rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France

^bInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 862, NuroCentre Magendie, 146 Rue Léo Saignat, 33077 Bordeaux, France

^cCentre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5227, 146 Rue Léo Saignat, 33077 Bordeaux, France

^dDepartment of Neurology, College of Medicine and University Hospital, National Taiwan University, Taipei, Taiwan

^eCentre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Place Amélie Raba-Léon, 33000 Bordeaux, France

Abstract—The globus pallidus (GP) plays an important role in basal ganglia circuitry. In contrast to the well-characterized actions of dopamine on striatal neurons, the functional role of the dopamine innervation of GP is still not clearly determined. The present study aimed to investigate the effects of intrapallidal injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) on rotational behavior induced by apomorphine, on the loss of dopamine cell bodies in the substantia nigra pars compacta (SNc) and fibers in the GP and striatum and on *in vivo* extracellularly-recorded GP neurons in the rat. Injection of 6-OHDA into GP induced severe loss of tyrosine hydroxylase-immunoreactive (TH-IR) fibers in GP (–85%) with a reduction in the number of TH-IR cell bodies in the SNc (–52%) and fibers in the striatum (–50%). S.c. injection of apomorphine in these rats induced a moderate number of turns (26±6 turns/5 min). Electrophysiological recordings show that 6-OHDA injection in GP induced a significant decrease of the firing rate of GP neurons (16.02±1.11 versus 24.14±1.58 spikes/sec in control animals and 22.83±1.28 in sham animals, one-way ANOVA, $P<0.0001$) without any change in the firing pattern ($\chi^2=1.03$, $df=4$, $P=0.90$). Our results support the premise of the existence of collaterals of SNc dopaminergic axons projecting to the striatum and GP and that dopamine plays a role in the modulation of the firing rate but not the firing pattern of GP neurons. Our data provide important insights into the functional role of the SNc–GP dopaminergic pathway suggesting that dopamine depletion in GP may participate in the development of motor disabilities. © 2009 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

¹ These two authors contributed equally.

*Correspondence to: A. Benazzou, Laboratoire Mouvement Adaptation Cognition, CNRS UMR, 5227 Université Victor Segalen Bordeaux, 2 146 Rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France. Tel: +33-557-57-46-25; fax: +33-556-90-14-21.

E-mail address: abdelhamid.benazzou@u-bordeaux2.fr (A. Benazzou).

Abbreviations: GP, globus pallidus; GPe, external part of globus pallidus; PBS, phosphate-buffered saline; SNc, substantia nigra pars compacta; SNr, substantia nigra pars reticulata; STN, subthalamic nucleus; TBST, TBS containing 0.3% Triton X-100; TH, tyrosine hydroxylase; TH-IR, tyrosine hydroxylase immunoreactivity/immunoreactive; 6-OHDA, 6-hydroxydopamine.

0306-4522/09 \$ - see front matter © 2009 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.neuroscience.2009.07.034

Key words: Parkinson's disease, globus pallidus, basal ganglia, dopamine, 6-hydroxydopamine, extracellular recording.

The globus pallidus (GP in rodent, the equivalent of the external part of globus pallidus, GPe, in primate) is considered as a relay linking the striatum to the output structures of basal ganglia, i.e. the substantia nigra pars reticulata (SNr) and the entopeduncular nucleus (EP in rodent, the equivalent of the internal part of globus pallidus, GPi, in primate), in the so-called indirect pathway (Albin et al., 1989; Alexander and Crutcher, 1990). GP receives GABAergic axon terminals from the striatum and glutamatergic afferents from the subthalamic nucleus (STN) and the parafascicular nucleus of the thalamus (Kincaid et al., 1991; Mouroux et al., 1997). In turn, GP neurons send GABA-mediated inhibitory efferents to the STN and SNr (Parent and Hazrati, 1995; Smith and Bolam, 1990). In addition to the GABAergic and glutamatergic afferents, anatomical studies have shown that GP neurons receive dopamine projections from the substantia nigra pars compacta (SNc) and that these afferents are collaterals of nigro-striatal fibers (Lindvall and Björklund, 1979; Anaya-Martinez et al., 2006; Debeir et al., 2005; for review, Smith and Villalba, 2008). Dopamine in the GP controls both the GABAergic input from the striatum and the glutamatergic input from the STN using D1 and D2 receptor subtypes (Floran et al., 1990, 1997; Cooper and Stanford, 2001; Hernandez et al., 2006; Shin et al., 2003). Dopamine is known to modulate motor information in the striatum and may control this information also in extrastriatal targets such as the STN (Ni et al., 2001a,b) and the GP (Hauber and Lutz, 1999; Hernandez et al., 2006). From a pathological point of view, it has been shown that GP plays an important role in the pathophysiology of Parkinson's disease. Indeed, partial or severe lesion of the dopaminergic nigrostriatal pathway results in alterations of the firing rate and/or pattern of GP neurons (Albin et al., 1989; Breit et al., 2007; Boraud et al., 1998; DeLong, 1990; Magill et al., 2001; Ni et al., 2000).

In contrast to the well-characterized actions of dopamine loss in the striatum, the consequences of dopamine depletion in the GP are unknown. The present study aimed at investigating the effects of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) injection into the GP on (i) the loss of dopamine cell bodies in the SNc and fibers in GP and striatum by using immunohistochemistry of tyrosine hydroxylase (TH) (ii) the rotational behavior induced by a non-selective dopamine agonist, apomorphine and (iii) the neuronal activity (firing

rate and pattern) of GP neurons by using *in vivo* extracellular single unit recordings in the rat.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Experiments were carried out on adult male Wistar rats weighing 280–400 g. Animals were housed under artificial conditions of light (12 hours light/dark cycle, light on at 7:00 AM), temperature (24 °C), and humidity (45%) with food and water available *ad libitum*. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. The experiments were conducted in accordance with the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) and the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. All experiments conformed to the local guidelines on the ethical use of animals.

6-OHDA injection into GP

As previously described (Belujon et al., 2007; Breit et al., 2007), 30 min prior to surgery, animals were injected i.p. with desipramine (25 mg/kg, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) dissolved in 0.9% sodium chloride at a volume of 5 ml/kg body weight. Rats were placed in a stereotaxic frame (Unimecanique, Paris, France) under chloral hydrate anesthesia (400 mg/kg i.p., Sigma). Each animal received a unilateral injection of 5 μ l 6-OHDA (Sigma, 5 mg/ml in sterile NaCl, 0.9%) with 0.1% ascorbic acid into the right GP at coordinates 0.9 mm posterior to bregma, 3.0 mm lateral to the midline and 6.5 mm below the dura according to the brain atlas of Paxinos and Watson (1998). The 6-OHDA injection was made over a 5 min period using a 10 μ l Hamilton microsyringe. At the end of each injection, the syringe needle was left in place for an additional 5 min and then withdrawn slowly to prevent reflux of the solution. The cannula was then left in place for 10 min before being slowly withdrawn. For the sham control group, vehicle (saline plus 0.01% ascorbic acid) was infused into the GP under the same condition as for 6-OHDA. Rats were tested for circling behavior 7–10 days after surgery by a single s.c. injection of apomorphine (0.05 mg/kg, Sigma-Aldrich). Electrophysiological and immunohistochemical studies were carried out 4 to 5 weeks after surgery.

Extracellular recordings

Extracellular single-unit recordings were made 4 weeks after 6-OHDA injection into GP under urethane anesthesia (1.2 mg/kg i.p., Sigma-Aldrich) as previously described (Tai et al., 2003; Breit et al., 2007; Belujon et al., 2007). Rats were placed in a stereotaxic frame (Unimecanique) and the body temperature was continuously controlled (37 ± 0.5 °C). The skull and dura mater overlying GP were then carefully removed and single-unit recordings performed in GP. A glass micropipette electrode (WPI, Inc., Hertfordshire, UK) with an impedance of 5 to 15 MOhm, containing 1% Pontamine Sky Blue dye dissolved in 3 M NaCl was inserted vertically into the GP according to the coordinates given in the brain atlas (Paxinos and Watson, 1998) (AP from 0.8 to 1.4 mm posterior to bregma, L 2.6–3.2 mm, D: 6–7.4 mm from the dura). Extracellular single unit spikes were amplified, bandpass-filtered (300–3000 Hz) using a preamplifier (Neurolog, Digitimer, UK), displayed on an oscilloscope, transferred via a Powerlab interface (AD Instruments, Charlotte, NC, USA) to a computer equipped with Chart 5 software (AD Instruments). Only neuronal activity with a signal-to-noise ratio >3:1 was recorded and used for further investigation. At the end of each recording session, the last recording site used was marked by electrophoretic injection (Iso DAM 80, WPI) of Pontamine Sky Blue through the micropipette at a negative current of 20 μ A for 7 min.

Analysis of electrophysiological data

The spontaneous activity of each GP neuron was analyzed with a spike discriminator using a spike histogram program (AD Instru-

ments) and firing parameters were calculated using Neuroexplorer software (AlphaOmega, Nazareth, Israel). Firing rates of neuronal activity of the three groups of rats were compared using a one-way ANOVA with Bonferroni's post test (GraphPad Prism, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). All values are means \pm standard error of the mean (SEM). Firing patterns were analyzed using the method developed by Kaneko and Vitek (1996) and compared using a chi-square-test as previously described (Tai et al., 2003; Belujon et al., 2007). In addition, in order to verify that 6-OHDA injection was specific of TH fibers and did not destroy GP cell bodies, the number of cells recorded per track in each group was calculated and statistical analysis using Kruskal–Wallis test followed by Dunn's post test was made.

Tissue preparation

At the end of each recording session, the rat was given an overdose of urethane and perfused transcardially with 0.9% saline solution followed by 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS, pH: 7.3). Brains were removed and postfixed in the same fixative for at least one night. They were then placed in 0.1 M PBS with 20% sucrose (Sigma-Aldrich) overnight. The brains were frozen in isopentane at -40 °C and stored at -80 °C. They were then cut into 25 μ m coronal sections using a cryotome and slices were stored in 0.1 M PBS containing 0.02% sodium azide.

Histological validation of recordings

Cresyl Violet staining was used to determine the location of the Pontamine Sky Blue dots marking the last recording site for each rat. Only those brains in which the location of the Pontamine Sky Blue dot was clearly visible in the GP were used for data analysis.

Immunohistochemistry of TH and data analysis

To determine the extent of lesion of the nigro-striatal and nigro-pallidal dopaminergic pathways, we used immunohistochemical staining of TH as previously described (Breit et al., 2001; Ni et al., 2001a). Briefly, sections of the SNC, striatum and GP were pre-incubated with 3% normal horse serum in TBS containing 0.3% Triton X-100 (TBST) for 30 min at room temperature and then with monoclonal antibody to TH raised in mice (dilution: 1/500) (ABCYS, Paris, France) in TBST containing 1% normal horse serum for 24 h at 4 °C. After washing in TBST sections were incubated with biotinylated anti-mouse IgG rat adsorbed (dilution: 1/100) (ABCYS) in TBST containing 1% normal horse serum for 2 h at room temperature. Sections were rinsed again in TBST containing 1% normal horse serum and incubated with extravidin-peroxidase (dilution: 1/500) (Sigma-Aldrich) for 1 h at room temperature. Finally, they were exposed to a mixture of 3,3'-diaminobenzidine, H₂O₂ and nickel. Sections were then mounted on gelatin-coated slides dehydrated in ascending alcohol concentrations and cleared in xylene. Coverslips were mounted with Pertex. Adjacent TH positive slices of GP were counterstained by Cresyl Violet in order to delineate GP.

Microscopic analysis was made as previously reported (Raisman-Vozari et al., 1991; Debeir et al., 2005; Breit et al., 2007). According to the atlas of Paxinos and Watson (1998), anterior, median and posterior levels of the SNc (AP: -4.8 , -5.3 and -6.0 mm relative to bregma, respectively), striatum (AP: 1.2, 0.5 and -0.4 mm relative to bregma, respectively) and GP (AP: -1.2 mm relative to bregma) were selected in order to determine the degree of dopamine cell and fiber loss. TH+ cells were counted in four sections per region of the SNc in each rat ($n=5$). Then, the mean value of TH+ nigral neurons from each animal was expressed as a percentage cell loss of the lesioned side compared to the same side of control rats ($n=5$). The optical density of the TH+ fibers in the striatum and GP was measured using a computerized image

analysis system (Densirag V. D2.99, Biocom, Les Ulis, France) reading optical density as gray levels as previously described (Debeir et al., 2005; Breit et al., 2007). Three sections per striatal or GP level of each animal were analyzed by an examiner and the results were averaged for each region for each animal. For each brain level, nonspecific background densities were measured in a region devoid of TH immunostaining, such as the corpus callosum, and were subtracted from the striatal and GP optical density values. Then, optical density values on the lesioned side were expressed as a percentage loss of the same side of control rats.

For statistical analyses, TH+ cells counts as well as optical density measurements from control and 6-OHDA-lesioned animals were compared using Kruskal–Wallis with Dunn's post test

(GraphPad Prism, GraphPad Software). A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Circling behavior

Ten days after unilateral injection of 6-OHDA into GP we explored whether the injection of 6-OHDA into GP had produced deficits of dopaminergic transmission that were sufficient to induce asymmetrical motor disturbances. The circling behavioral test is used to assess the motor conse-

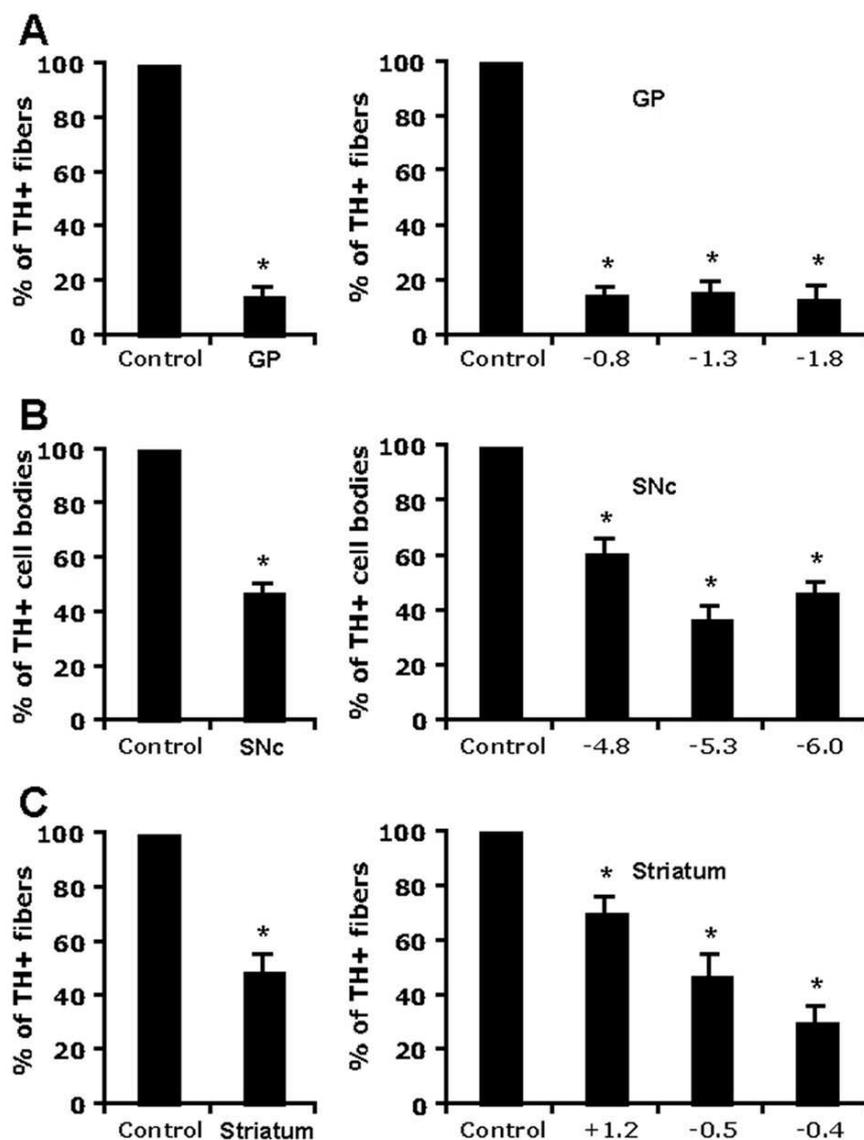


Fig. 1. Intrapallidal injection of 6-OHDA produces a loss of TH-IR (TH+) fibers in the GP (A), cell bodies in the SNc (B) and fibers in the striatum (C). (A, C) Quantification of GP and striatal TH-IR by optical density measurements at the entire structure (left) and at three different levels along the rostrocaudal axis of the structure (right) (anterior, intermediate and posterior parts). Values represent the percentage (mean±SEM) of the optical density relative to the same side of controls. (B) Quantification of SNc TH-IR by counting cell bodies at the entire structure (left) and at the three levels of the structure (right). Values represent the percentage (mean±SEM) of cell bodies relative to the same side of controls. Numbers at the base of each histogram indicate the rostrocaudal distance (in mm) from the bregma according to the atlas of Paxinos and Watson (1998). * Indicates a significant difference ($P < 0.05$) when compared to controls.

quences of dopamine depletion (Ungerstedt and Arbuthnott, 1970; Piallat et al., 1996; Tai et al., 2003). This was investigated in the same animals used for electrophysiology and immunohistochemical studies. The s.c. administration of apomorphine in rats receiving 6-OHDA into GP induced a moderate contralateral circling behavior with a mean±SEM of 26±6 turns/5 min.

Immunohistochemical results

Immunohistochemical results show that unilateral injection of 6-OHDA into GP induced a dramatic loss of TH+ fibers in the entire GP (85.2±6.3%) compared to the same side of control animals ($P<0.001$) (Figs. 1 and 2). This percentage loss of TH+ fibers was 85.1±5.7% in the anterior part of GP, 84.1±6.8% in the intermediate part and 86.5±6.5% in the posterior part. In the SNc, unilateral injection of 6-OHDA into GP produced a moderate loss of TH+ cell bodies in the entire structure (52.4±2.8%) ($P<0.01$). The percentage loss of TH+ cell bodies was 39.0±5.0% in the anterior part, 63.2±4.3% in the intermediate part and

53.1±3.4% in the posterior part of the SNc (Figs. 1 and 3). In addition, TH+ fibers in the striatum were also partially damaged by the injection of 6-OHDA into GP affecting especially the dorsolateral parts (50.4±6.8) ($P<0.01$) (Figs. 1 and 4). This loss was of 29.5±5.3% in the anterior part, 52.3±7.2% in the intermediate part and 69.5±5.4% in the posterior part of the striatum.

Electrophysiological results

A total of 153 neurons were recorded in the GP of three groups of urethane-anesthetized rats: normal control rats ($n=6$ rats, $n=51$ neurons), rats with intrapallidal injection of 6-OHDA ($n=5$ rats, $n=50$ neurons) and sham group ($n=5$ rats, $n=52$ neurons) receiving intrapallidal injection of saline plus 0.01% ascorbic acid. Electrophysiological results obtained in these different groups of rats are summarized in Tables 1 and 2. The number of neurons recorded per track in 6-OHDA rats was not significantly different from that of control and sham rats ($P=0.73$) demonstrating that the injection of 6-OHDA into GP did not

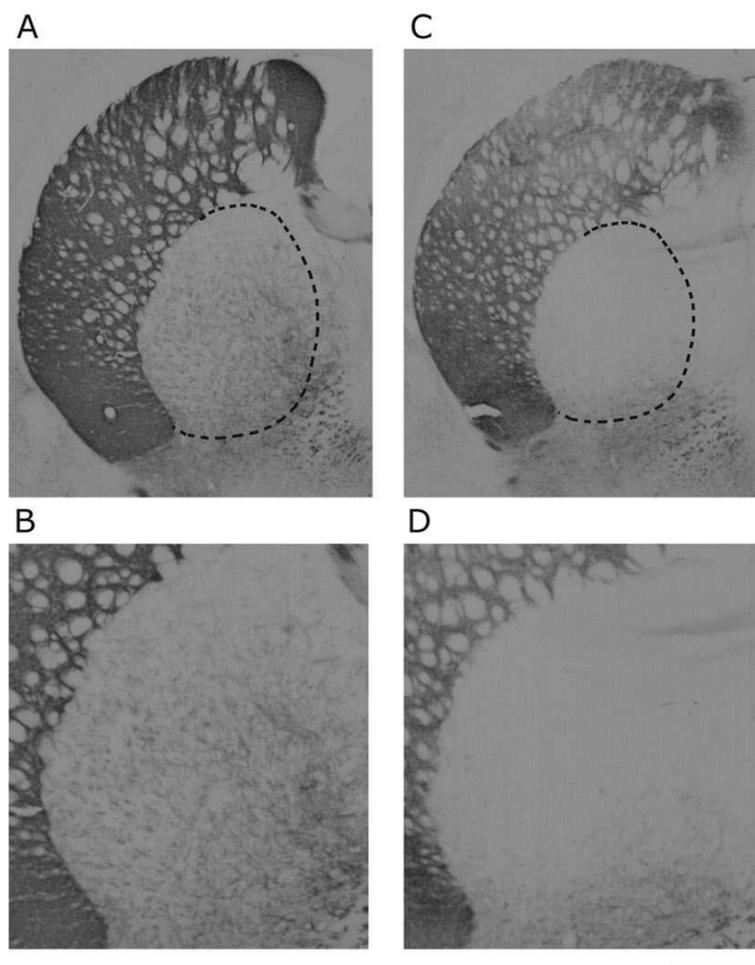


Fig. 2. Effect of intrapallidal injection of 6-OHDA on GP TH-IR fibers. Photomicrographs show sections at the same rostrocaudal ipsilateral levels as the control (A, B) and 6-OHDA-lesioned animals (C, D). B and D are magnifications of A and C respectively. Scale bar=1 mm for A–C and 0.33 mm for B–D.

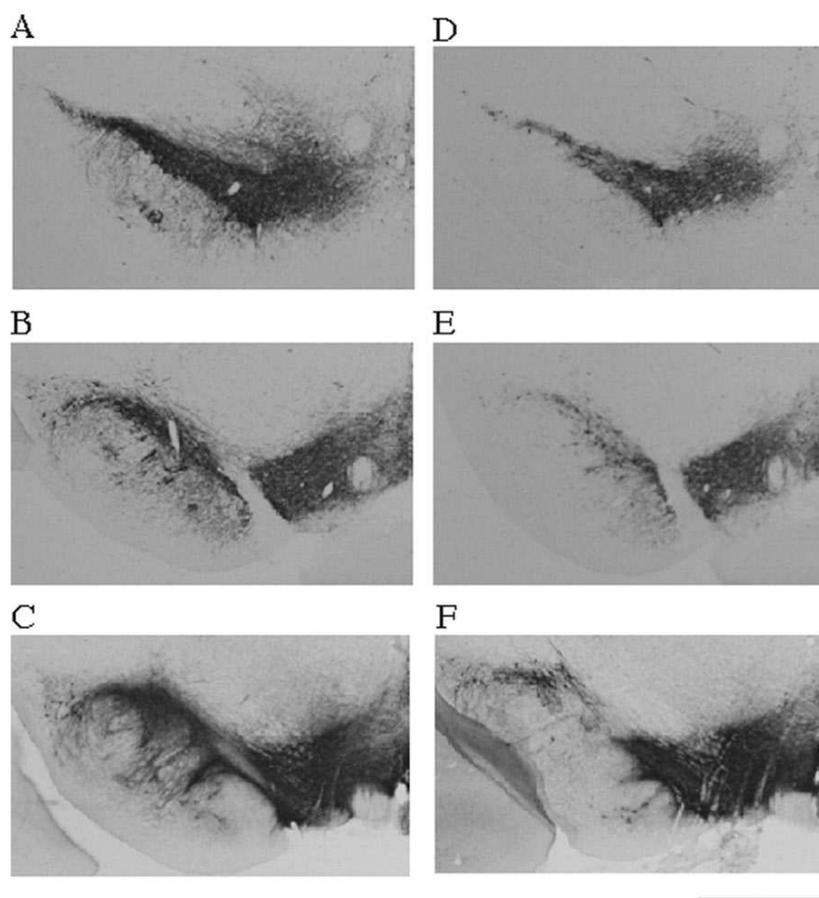


Fig. 3. Effect of intrapallidal injection of 6-OHDA on the SNc TH-IR cell bodies. Photomicrographs show three sections at the same rostrocaudal ipsilateral levels of the control (A–C) and 6-OHDA-lesioned animals (D–F). Scale bar=1 mm.

modify the proportion of spontaneously active neurons recorded in this structure (Table 1).

In normal rats, the mean firing rate of GP neurons was 24.14 ± 1.58 spikes/s ($n=51$). As classically reported in the literature, GP neurons are characterized by three different firing patterns. They discharged regularly (39%), irregularly (47%) or with bursts (14%). In rats receiving an injection of 6-OHDA into GP, the mean firing rate of GP neurons decreased significantly when compared to that obtained in control and sham animals (Table 1) (one-way ANOVA, $F=10.48$, $P<0.0001$; 6-OHDA into GP versus controls, $P<0.001$; 6-OHDA into GP versus Sham, $P<0.01$). However, the distribution of firing patterns in the three groups did not show any significant difference ($\chi^2=1.03$, $df=4$, $P=0.90$) (Table 2).

DISCUSSION

Our results show that intrapallidal injection of 6-OHDA in rats resulted in a dramatic loss of tyrosine hydroxylase immunoreactive (TH-IR) fibers in GP with a moderate retrograde loss of TH-IR cell bodies in the SNc and TH-IR fibers in the striatum. This retrograde degenerative process induced a moderate rotational behavior in response

to the non-selective dopamine agonist, apomorphine. Electrophysiological data show that intrapallidal injection of 6-OHDA resulted in a significant decrease in the firing rate of GP neurons without any change of the firing pattern when compared to the sham and control groups.

Our immunohistochemical results provide new evidence about the topography of dopaminergic projections to the pallidum. We show that intrapallidal injection of 6-OHDA into the dorsal part of the nucleus (the sensorimotor territory), which produced a severe loss of TH-IR fibers in the GP, induced only a partial degeneration of TH+ fibers in the striatum and TH+ cell bodies in the SNc. Interestingly, we show that about half of SNc dopamine neurons project to the GP and that at least a part of these cell bodies also send collaterals to the striatum. These results are in agreement with a previous study (Gauthier et al., 1999) showing that unicellular injection of anterograde tracer into nigral dopaminergic neurons revealed the existence of two subtypes of nigrothal dopaminergic neurons; those that project massively to the striatum with few collaterals to extrastriatal structures and those that innervate the GP and the STN with few collaterals to the striatum. This heterogeneous organization allows single SNc neu-

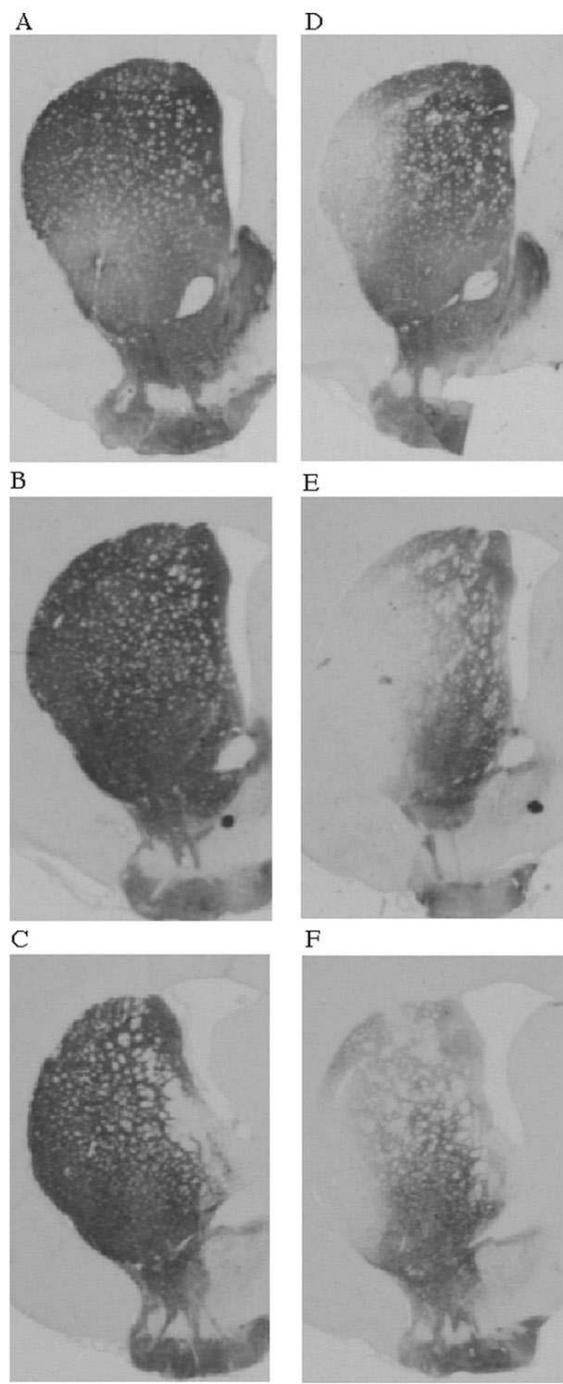


Fig. 4. Effect of intrapallidal injection of 6-OHDA on striatal TH-IR fibers. Photomicrographs show three sections at the same rostrocaudal ipsilateral levels of the control (A–C) and 6-OHDA-lesioned animals (D–F). Scale bar=1 mm.

rons to influence striatal neurons differently and to act directly upon extrastriatal components of the basal ganglia via a highly patterned set of collaterals. Thus, in addition to its strong influence on striatal neurons, the SNc dopami-

nergic neurons also exert their functional influence on GP (Gauthier et al., 1999; Debeir et al., 2005; Anaya-Martinez et al., 2006). In contrast to SNc dopaminergic cells, those of the ventral tegmental area are preserved. This can be explained by the fact that intrapallidal injection of 6-OHDA did not affect the ventral pallidum, which receives the majority of dopamine fibers from the ventral tegmental area (Klitenick et al., 1992).

It is well known that in rats with degeneration of the nigro-striatal pathway after 6-OHDA injection into the SNc, or into the medial forebrain bundle (MFB) or into the striatum, s.c. injection of apomorphine induced contralateral rotational behavior (Burbaud et al., 1995; Piallat et al., 1996; Ungerstedt and Arbuthnott, 1970), which is a consequence of the post-synaptic supersensitivity of dopamine receptors in the striatum (Ungerstedt, 1971). In our study, we show that injection of 6-OHDA into the GP also produced deficits of dopaminergic transmission that were sufficient to induce asymmetrical motor impairment. We found that s.c. injection of apomorphine induced a rotational behavior with a number of turns fewer than that previously reported in rats with 6-OHDA injection into the SNc (Ni et al., 2001a; Hassani et al., 1996). This difference could be explained by the fact that 6-OHDA injection into the GP induced only a partial dopamine cell loss, which is in line with the fact that the intensity of rotational behavior is dependent on the degree of DA lesion and a minimum level of dopaminergic cell loss in the SNc varying between 40 and 50% has to be reached before a rotational response can be elicited (Hefti et al., 1980; Hudson et al., 1993; Przedborski et al., 1995; Deumens et al., 2002; Truong et al., 2006). As long as intrapallidal injection of 6-OHDA caused severe loss of dopamine fibers in the GP but moderate in the striatum and the SNc, the rotational behavior could be due to the action of apomorphine on the striatum but also on GP dopamine receptors. Together, we suggest that dopamine transmission within the GP is necessary to achieve motor control in accordance with a previous study showing that the infusion of dopamine into the GP caused improvement of motor deficits in hemiparkinsonian rats (Galvan et al., 2001).

Table 1. Firing rates of GP neurons recorded in normal rats (control), in rats with saline injection into GP and in rats with 6-OHDA injection into GP

Group of rats	Number of rats	Number of cells	Number of cells per track	Mean firing (spikes/s)
Control	6	51	3.42±0.64	24.14±1.58
Saline into GP	5	52	3.35±0.52	22.35±1.46
6-OHDA into GP	5	50	3.77±0.46	16.02±1.11**§

The values are mean±S.E.M. Post hoc tests were performed only after a one-way ANOVA has shown to be significant ($F=10.48$, $P<0.0001$).

** Indicates a significant difference ($P<0.001$) in the firing rate between 6-OHDA rats and the control group.

§ Indicates a significant difference ($P<0.01$) between 6-OHDA rats and the sham group.

Table 2. Firing patterns of GP neurons recorded in normal rats (control), in rats with saline injection into GP (sham group) and in rats receiving 6-OHDA injection into GP

Group	Regular		Irregular		Burst	
	n	%	n	%	n	%
Control	20	39	24	47	7	14
Saline into GP	22	42	23	43	8	15
6-OHDA into GP	19	38	26	52	5	10

The values are the number of cells and the corresponding percentages. The distribution of firing patterns in the three groups is not significantly different ($\chi^2=1.03$, $df=4$, $P=0.90$).

Our electrophysiological results show that intrapallidal injection of 6-OHDA, which induced a severe loss of TH-IR fibers in GP, induced a significant decrease of the firing rate of GP neurons suggesting that dopamine has an excitatory influence on these cells. A similar result was observed in our previous study in the STN after intrasubthalamic injection of 6-OHDA (Ni et al., 2001a) demonstrating that dopamine exerts an excitatory influence on STN neurons (Ni et al., 2001b). As for the STN, several studies have shown the presence of both D1 and D2 receptors localized presynaptically in the GP and that these dopamine receptors facilitate both GABAergic and glutamatergic neurotransmission (Floran et al., 1997; Querejeta et al., 2001; Hernandez et al., 2007). According to our data, endogenous dopamine, by its action on dopamine receptors, would play an excitatory influence on GP cells. In line with this, Floran et al. (1997) have shown that endogenous dopamine resulted in an inhibitory effect on GABA release in the rat GP (Floran et al., 1997), which was mediated by D2 receptors located on striato-pallidal terminals. Thus, the reduction of GABA release resulted in the disinhibition of pallidal neurons. In line with these findings, Querejeta et al. (2001) reported that intrapallidal administration of the selective D2 agonist quinpirole was an increase in the firing rate of spontaneous activity suggesting that intrapallidal quinpirole blocked the inhibitory effects of striatal stimulation. These authors showed that both the spontaneous rate of firing of GP and its modification by striatopallidal inputs are controlled by intrapallidal dopamine D2 receptors. In addition to the action on D2 receptors located on GABAergic terminals, Hernandez et al. (2007) have shown that presynaptic D1 dopamine receptors facilitate glutamatergic neurotransmission in the rat GP. By using whole-cell patch clamp technique, they have shown that SKF 38393, a D1-like agonist, increased the frequency of the spontaneous excitatory postsynaptic currents. Together, our data suggest that 6-OHDA-induced dopamine depletion in GP results in the absence of activation of D1 and D2 receptors affecting GABAergic and glutamatergic neurotransmission, which can be at the origin of the firing rate decrease of GP neurons.

From a pathological point of view, the implication of nigro-pallidal projections in the pathophysiology of Parkinson's disease is not clearly determined (for review, Smith and Villalba, 2008). In patients, the alteration of dopaminergic innervation of the GPe has been reported quantita-

tively. By using TH immunohistochemistry, Jan et al. (2000) reported a mean loss of 40% of dopaminergic fibers in the GPe; however, a more recent study using biochemical analysis has shown a mean loss of 82% (Rajput et al., 2008). In MPTP-treated monkeys the alteration of dopaminergic innervation is different between species. While the nigro-pallidal projection is relatively spared in MPTP-treated macaques (Parent et al., 1990; Schneider and Dacko, 1991), it is nevertheless affected in the vervet monkey (Bergman et al., 1994) by a mean loss of 60% (Jan et al., 2000). In 6-OHDA rat model obtained after the injection of the toxin in the medial forebrain bundle, dopamine depletion in the GP was 85% (Anaya-Martinez et al., 2006). This loss of GP dopaminergic innervation in animal models and also in parkinsonian patients is likely to have physiological consequences. Indeed, it may participate in the development of pathological neuronal activity in the GP. Several studies have shown the firing rate of GP neurons to be decreased in animal models and that this firing rate decrease was paired with bursting activity (Pan and Walters, 1988; Fillion and Tremblay, 1991; Soares et al., 2004). Others have shown profound changes in the firing pattern including high bursting activity without any change in the firing rate (Hassani et al., 1996; Ni et al., 2000; Magill et al., 2001; Heimer et al., 2006; Breit et al., 2007). Together with these data, our results suggest that dopamine depletion in the GP is responsible for the decrease of firing rate and that the bursty pattern could be a consequence of STN-GP modulation. In line with this, we have previously reported that STN lesions were able to reverse the bursty activity of GP neurons recorded in rats with 6-OHDA lesions (Ni et al., 2000). Another argument favoring the importance of dopamine in GP is that bilateral infusion of D1 or D2 antagonists into the GP resulted in the development of akinesia (Hauber and Lutz, 1999) and that neuroleptic-induced catalepsy can be reversed by lesions of the GP (Hauber et al., 1998; Chetrit et al., 2009).

CONCLUSION

In conclusion, results of the present study support the premise of the existence of axonal collateralization of SNc dopaminergic axons projecting to the striatum and GP. Electrophysiological recordings show that depletion of dopamine in GP induced a significant decrease of the firing rate of GP neurons without any change in the firing pattern demonstrating that dopamine exerts an excitatory effect on GP neurons and does not modulate the firing pattern. Finally, our data provide important insights into the functional role of the SNc–GP dopaminergic pathway suggesting that dopamine depletion in GP may participate in the development of motor disabilities.

Acknowledgments—This work was supported by the University Victor Segalen Bordeaux 2, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), and the Institut Fédératif de Recherche (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) No. 8; CNRS No 13). We wish to thank Nouridine Hardala for his technical assistance.

REFERENCES

- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12:366–375.
- Alexander GE, Crutcher MD (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 13:266–271.
- Anaya-Martinez V, Martinez-Marcos A, Martinez-Fong D, Aceves J, Erij D (2006) Substantia nigra compacta neurons that innervate the reticular thalamic nucleus in the rat also project to striatum or globus pallidus: implications for abnormal motor behavior. *Neuroscience* 143:477–486.
- Belujon P, Bezard E, Taupignon A, Bioulac B, Benazzouz A (2007) Noradrenergic modulation of subthalamic nucleus activity: behavioral and electrophysiological evidence in intact and 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J Neurosci* 27:9595–9606.
- Bergman H, Wichmann T, Karmon B, DeLong MR (1994) The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of Parkinsonism. *J Neurophysiol* 72:507–520.
- Boraud T, Bezard E, Guehl D, Bioulac B, Gross C (1998) Effects of L-DOPA on neuronal activity of the globus pallidus externalis (GPe) and globus pallidus internalis (GPi) in the MPTP-treated monkey. *Brain Res* 787:157–160.
- Breit S, Bouali-Benazzouz R, Benabid AL, Benazzouz A (2001) Unilateral lesion of the nigrostriatal pathway induces an increase of neuronal activity of the pedunculopontine nucleus, which is reversed by the lesion of the subthalamic nucleus in the rat. *Eur J Neurosci* 14:1833–1842.
- Breit S, Bouali-Benazzouz R, Popa RC, Gasser T, Benabid AL, Benazzouz A (2007) Effects of 6-hydroxydopamine-induced severe or partial lesion of the nigrostriatal pathway on the neuronal activity of pallido-subthalamic network in the rat. *Exp Neurol* 205:36–47.
- Burbaud P, Gross C, Benazzouz A, Coussemaeq M, Bioulac B (1995) Reduction of apomorphine-induced rotational behaviour by subthalamic lesion in 6-OHDA lesioned rats is associated with a normalization of firing rate and discharge pattern of pars reticulata neurons. *Exp Brain Res* 105:48–58.
- Chetrit J, Ballion B, Laquitaine S, Belujon P, Morin S, Taupignon A, Bioulac B, Gross CE, Benazzouz A (2009) Involvement of basal ganglia network in motor disabilities induced by typical antipsychotics. *PLoS ONE* 4(7):e6208.
- Cooper AJ, Stanford IM (2001) Dopamine D2 mediated presynaptic inhibition of striatopallidal GABA(A) IPSCs in vitro. *Neuropharmacology* 41:62–71.
- Debeir T, Ginstet L, Francois C, Laurens S, Martel JC, Chopin P, Marien M, Colpaert F, Raisman-Vozari R (2005) Effect of intrastriatal 6-OHDA lesion on dopaminergic innervation of the rat cortex and globus pallidus. *Exp Neurol* 193:444–454.
- DeLong MR (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci* 13:281–285.
- Deumens R, Blokland A, Prickaerts J (2002) Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol* 175:303–317.
- Filion M, Tremblay L (1991) Abnormal spontaneous activity of globus pallidus neurons in monkeys with MPTP-induced Parkinsonism. *Brain Res* 547:142–151.
- Floran B, Aceves J, Sierra A, Martinez-Fong D (1990) Activation of D1 dopamine receptors stimulates the release of GABA in the basal ganglia of the rat. *Neurosci Lett* 116:136–140.
- Floran B, Floran L, Sierra A, Aceves J (1997) D2 receptor-mediated inhibition of GABA release by endogenous dopamine in the rat. *Neurosci Lett* 237:1–4.
- Galvan A, Floran B, Erij D, Aceves J (2001) Intrapallidal dopamine restores motor deficits induced by 6-hydroxydopamine in the rat. *J Neural Transm* 108:153–166.
- Gauthier J, Parent M, Levesque M, Parent A (1999) The axonal arborization of single nigrostriatal neurons in rats. *Brain Res* 834:228–232.
- Hassani OK, Mouroux M, Feger J (1996) Increased subthalamic neuronal activity after nigral dopaminergic lesion independent of disinhibition via the globus pallidus. *Neuroscience* 72:105–115.
- Hauber W, Lutz S (1999) Blockade of dopamine D2, but not of D1 receptors in the rat globus pallidus induced Fos-like immunoreactivity in the caudate-putamen, substantia nigra and entopeduncular nucleus. *Neurosci Lett* 271:73–76.
- Hauber W, Lutz S, Münkler M (1998) The effects of globus pallidus lesions on dopamine-dependent motor behaviour in rats. *Neuroscience* 86:147–157.
- Hefti F, Melamed E, Wurtman RJ (1980) Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: biochemical characterization. *Brain Res* 195:123–137.
- Heimer G, Rivlin-Etzion M, Bar-Gad I, Goldberg JA, Haber SN, Bergman H (2006) Dopamine replacement therapy does not restore the full spectrum of normal pallidal activity in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetra-hydropyridine primate model of Parkinsonism. *J Neurosci* 26:8101–8114.
- Hernández A, Ibañez-Sandoval O, Sierra A, Valdiosera R, Tapia D, Anaya V, Galarraga E, Bargas J, Aceves J (2006) Control of the subthalamic innervation of the rat globus pallidus by D2/3 and D4 dopamine receptors. *J Neurophysiol* 96:2877–2888.
- Hernández A, Sierra A, Valdiosera R, Florán B, Erij D, Aceves J (2007) Presynaptic D1 dopamine receptors facilitate glutamatergic neurotransmission in the rat globus pallidus. *Neurosci Lett* 425:188–191.
- Hudson JL, Van Home CG, Stromberg I, Brock S, Clayton J, Masserano J, Hoffer BJ, Gerhardt GA (1993) Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res* 626:167–174.
- Jan C, François C, Tandé D, Yelnik J, Tremblay L, Agid Y, Hirsch E (2000) Dopaminergic innervation of the pallidum in the normal state, in MPTP-treated monkeys and in parkinsonian patients. *Eur J Neurosci* 12:4525–4535.
- Kaneoke Y, Vitek JL (1996) Burst and oscillation as disparate neuronal properties. *J Neurosci Methods* 68:211–223.
- Kincaid AE, Penney JB Jr, Young AB, Newman SW (1991) The globus pallidus receives a projection from the parafascicular nucleus in the rat. *Brain Res* 553:18–26.
- Klitenick MA, Deutch AY, Churchill L, Kalivas PW (1992) Topography and functional role of dopaminergic projections from the ventral mesencephalic tegmentum to the ventral pallidum. *Neuroscience* 50:371–386.
- Lindvall O, Björklund A (1979) Dopaminergic innervation of the globus pallidus by collaterals from the nigrostriatal pathway. *Brain Res* 172:169–173.
- Magill PJ, Bolam JP, Bevan MD (2001) Dopamine regulates the impact of the cerebral cortex on the subthalamic nucleus-globus pallidus network. *Neuroscience* 106:313–330.
- Mouroux M, Hassani OK, Féger J (1997) Electrophysiological and Fos immunohistochemical evidence for the excitatory nature of the parafascicular projection to the globus pallidus. *Neuroscience* 81:387–397.
- Ni Z, Bouali-Benazzouz R, Gao DM, Benabid AL, Benazzouz A (2000) Changes in the firing pattern of globus pallidus neurons after the degeneration of nigrostriatal pathway are mediated by the subthalamic nucleus in the rat. *Eur J Neurosci* 12:4338–4344.
- Ni ZG, Bouali-Benazzouz R, Gao DM, Benabid AL, Benazzouz A (2001a) Intrasubthalamic injection of 6-hydroxydopamine induces changes in the firing rate and pattern of subthalamic nucleus neurons in the rat. *Synapse* 40:145–153.
- Ni ZG, Gao DM, Bouali-Benazzouz R, Benabid AL, Benazzouz A (2001b) Effect of microiontophoretic application of dopamine on subthalamic nucleus neuronal activity in normal rats and in rats with unilateral lesion of the nigrostriatal pathway. *Eur J Neurosci* 14:373–381.
- Pan HS, Walters JR (1988) Unilateral lesion of the nigrostriatal pathway decreases the firing rate and alters the firing pattern of globus pallidus neurons in the rat. *Synapse* 2:650–656.

- Parent A, Hazrati LN (1995) Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Brain Res Rev* 20:128–154.
- Parent A, Lavoie B, Smith Y, Bédard P (1990) The dopaminergic nigropallidal projection in primates: distinct cellular origin and relative sparing in MPTP-treated monkeys. *Adv Neurol* 53:111–116.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney: Academic Press.
- Pierrat B, Benazzouz A, Benabid AL (1996) Subthalamic nucleus lesion in rats prevents dopaminergic nigral neuron degeneration after striatal 6-OHDA injection: behavioural and immunohistochemical studies. *Eur J Neurosci* 8:1408–1414.
- Przedborski S, Levivier M, Jiang H, Ferreira M, Jackson-Lewis V, Donaldson D, Togasaki DM (1995) Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience* 67:631–647.
- Querejeta E, Delgado A, Valdiosera R, Erij D, Aceves J (2001) Intrapallidal D2 dopamine receptors control globus pallidus neuron activity in the rat. *Neurosci Lett* 300:79–82.
- Raisman-Vozari R, Hirsch E, Javoy-Agid F, Vassort C, Savasta M, Feuerstein C, Thibault J, Agid Y (1991) Quantitative autoradiography of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the rat brain. *J Neurochem* 57:1212–1222.
- Rajput AH, Sitte HH, Rajput A, Fenton ME, Pifl C, Hornykiewicz O (2008) Globus pallidus dopamine and Parkinson motor subtypes: clinical and brain biochemical correlation. *Neurology* 70:1403–1410.
- Schneider JS, Dacko S (1991) Relative sparing of the dopaminergic innervation of the globus pallidus in monkeys made hemi-parkinsonian by intracarotid MPTP infusion. *Brain Res* 556:292–296.
- Shin RM, Masuda M, Miura M, Sano H, Shirasawa T, Song WJ, Kobayashi K, Aosaki T (2003) Dopamine D4 receptor-induced postsynaptic inhibition of GABAergic currents in mouse globus pallidus neurons. *J Neurosci* 23:11662–11672.
- Smith Y, Bolam JP (1990) The output neurones and the dopaminergic neurons of the substantia nigra receive a GABA-containing input from the globus pallidus in the rat. *J Comp Neurol* 296:47–64.
- Smith Y, Villalba R (2008) Striatal and extrastriatal dopamine in the basal ganglia: an overview of its anatomical organization in normal and parkinsonian brains. *Mov Disord* 23(Suppl 3):S534–S547.
- Soares J, Kliem MA, Betarbet R, Greenamyre JT, Yamamoto B, Wichmann T (2004) Role of external pallidal segment in primate Parkinsonism: comparison of the effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonism and lesions of the external pallidal segment. *J Neurosci* 24:6417–6426.
- Tai CH, Boraud T, Bezard E, Bioulac B, Gross CE, Benazzouz A (2003) Electrophysiological and metabolic evidence that high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus bridges neuronal activity in the subthalamic nucleus and the substantia nigra reticulata. *FASEB J* 17:1820–1830.
- Truong L, Allbutt H, Kassiou M, Henderson JM (2006) Developing a preclinical model of Parkinson's disease: a study of behaviour in rats with graded 6-OHDA lesions. *Behav Brain Res* 169:1–9.
- Ungerstedt U, Arbuthnott GW (1970) Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 24:485–493.
- Ungerstedt U (1971) Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand Suppl* 367:69–93.

(Accepted 16 July 2009)
(Available online 21 July 2009)

2. Article 5 :

D2 receptor stimulation, but not D1, restores striatal equilibrium in a rat model of Parkinsonism.

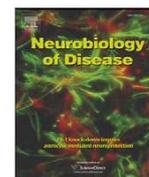
Bérangère Ballion, Francois Frenois, Camila L. Zold, Jonathan Chetrit, M. Gustavo Murer, Francois Gonon.

Neurobiology of Disease 35 (2009) 376–384



Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ynbdi

D2 receptor stimulation, but not D1, restores striatal equilibrium in a rat model of Parkinsonism

Bérangère Ballion^{a,b}, Francois Frenois^{a,b}, Camila L. Zold^c, Jonathan Chetrit^{a,b},
M. Gustavo Murer^c, Francois Gonon^{a,b,*}

^a University of Bordeaux, Bordeaux, F-33076, France

^b CNRS UMR 5227, Bordeaux, F-33076, France

^c Laboratorio de Fisiología de Circuitos Neuronales, Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Ciudad de Buenos Aires (CP1121), Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 April 2009

Revised 26 May 2009

Accepted 28 May 2009

Available online 6 June 2009

Keywords:

Levodopa

Quinpirole

Striatum

Electrophysiology

Dopamine

Parkinson's disease

Striatonigral

Striatopallidal

GABA interneuron

ABSTRACT

In Parkinson's disease dopamine depletion imbalances the two major output pathways of the striatum. L-DOPA replacement therapy is believed to correct this imbalance by providing effective D1 and D2 receptor stimulation to striatonigral and striatopallidal neurons, respectively. Here we tested this assumption in the rat model of Parkinsonism by monitoring the spike response of identified striatal neurons to cortical stimulation. As predicted, in 6-hydroxydopamine lesioned rats we observed that L-DOPA (6 mg/kg + benserazide), apomorphine and the D2 agonist quinpirole (0.5 mg/kg i.p.) counteract the enhanced responsiveness of striatopallidal neurons. Unexpectedly, the depressed responsiveness of striatonigral neurons was corrected by quinpirole whereas D1 stimulation exerted no (apomorphine, cPB) or worsening effects (L-DOPA, SKF38393 10 mg/kg). Therefore, quinpirole, but not D1 stimulation, restores functional equilibrium between the two striatal output pathways. Our results might explain the therapeutic effect of D2-based medications in Parkinson's disease.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

According to pathophysiological models of Parkinson's disease, the dopamine depletion results in an imbalanced activity of projection neurons in the striatum, which is responsible for the hypokinesia associated with this disease (Albin et al., 1989; Bezard et al., 2001; DeLong, 1990). Dopamine replacement therapy by L-DOPA is thought to alleviate parkinsonian motor symptoms by correcting this striatal imbalance.

In the rat striatum, medium sized spiny neurons (MSNs) represent 95% of the neurons. MSNs are GABAergic projection neurons and belong to two populations. Striatonigral neurons form the direct pathway to substantia nigra pars reticulata (SNR) and express substance P and D1 dopamine receptors. Striatopallidal neurons initiate the indirect pathway and express enkephalin (ENK) and D2 receptors (Gerfen and Wilson, 1996). According to anatomical (Deng et al., 2006; Gerfen et al., 1990; Hersch et al., 1995; Le Moine and Bloch, 1995) and genetic (Day et al., 2006; Gantois et al., 2007) studies in rodents, D1 and D2 receptor colocalization is restricted to about 5% of the MSNs.

In the rat model of Parkinson's disease the striatal imbalance caused by dopamine depletion has been documented by anatomo-functional studies (Gerfen, 2000; Gerfen et al., 1990) and directly demonstrated by our electrophysiological study (Mallet et al., 2006). Indeed, using *in vivo* electrophysiological recordings of identified neurons, we showed that striatonigral neurons and striatopallidal neurons exhibit similar sensitivity to cortical stimulation in intact rats (Mallet et al., 2005). In contrast, in the striatum of rats rendered hemiparkinsonian by 6-hydroxydopamine (6-OHDA) injection in the medial forebrain bundle, we observed that both the spontaneous activity and the sensitivity to cortical stimulation of striatonigral neurons decreased, but the opposite effects were induced in striatopallidal neurons (Mallet et al., 2006).

Based on anatomo-functional studies, pathophysiological models of parkinsonian treatments posit that the stimulation of D1 receptors by L-DOPA or D1 agonists counteracts the depressed activity of striatonigral neurons and that stimulation of D2 receptors reverses the overactivity of striatopallidal neurons (Gerfen, 2000; Gerfen et al., 1990). Indeed, systemic treatments with L-DOPA and D1 agonists dramatically increase the expression of immediate early genes specifically in striatonigral neurons in the dopamine-depleted striatum (Carta et al., 2005; Gerfen et al., 1995, 2002; Robertson et al., 1990). Conversely, the dopamine depletion enhances the ENK mRNA (Gerfen et al., 1990) and the mRNA level of *zif268* specifically in striatopallidal

* Corresponding author. Centre National de la Recherche Scientifique UMR 5227, case 63, Université Bordeaux 2, 33076 Bordeaux, France. Fax: +33 556 901 421.

E-mail address: francois.gonon@u-bordeaux2.fr (F. Gonon).

Available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

neurons (Gerfen et al., 1995). These increases are reversed by quinpirole, a D2 agonist (Gerfen et al., 1990, 1995). However, changes in anatomo-functional markers do not necessarily reflect parallel changes in electrophysiological activities (Sgambato et al., 1999). This is an important issue because the latter are more directly related to pathological dysfunctions than the former. Here we used the same electrophysiological approach as previously (Mallet et al., 2006) to test whether systemic treatments with L-DOPA and dopaminergic agonists actually correct the striatal imbalance caused by the dopamine depletion. Although *in vivo* investigations with systemic treatments have obvious limitations regarding mechanistic descriptions, they must be done to provide therapeutically relevant information.

Methods

Animals

Experiments were carried out with male Sprague–Dawley rats in accordance with European Council Directive 86/609/EEC guidelines for the care of laboratory animals and were approved by the Ethical Committee of CNRS, Région Aquitaine. Seven week old rats (240–280 g) were injected with 6-OHDA in the medial forebrain bundle 3–4 weeks before electrophysiological recordings as described (Mallet et al., 2006). The effectiveness of the lesion was asserted with tyrosine hydroxylase immunoreactivity (Mallet et al., 2006). The dopaminergic lesion was considered sufficient when the number of TH positive cell bodies in the substantia nigra pars compacta ipsilateral to the 6-OHDA injection was decreased by at least 90% compared with the contralateral side.

Electrophysiological recordings

Rats were anesthetized with urethane at a dose (1.2 to 1.6 g/kg, *i.p.*) sufficient to abolish any movement response to tail pinch, and single neurons were extracellularly recorded from the rostralateral striatum, as described (Mallet et al., 2005). Briefly, glass pipettes (8–15 M Ω) simultaneously recorded spike discharges and the striatal local field potentials as described (Mallet et al., 2005). In urethane-anesthetized rats the dominant cortical state exhibits a rhythmic activity characterized by slow waves of large amplitude at a frequency close to 1 Hz. This cortical slow wave state induces in the striatum parallel slow oscillations of the striatal field potential (Mallet et al., 2005). In all experiments described here the striatal field potential was continuously monitored to assert that the recorded animal was actually in the slow wave state. If disruption of the slow waves spontaneously occurred, the slow wave state was restored with additional *i.p.* injection of urethane (15% of the initial dose). Antidromic stimulation of the SNR was used to identify MSNs (Mallet et al., 2005). Concentric bipolar electrodes (SNEX-100, Rhodes Medical Instruments, Summerland, CA 93067, USA) were implanted in the rostral pole of ipsilateral SNR (2.4 mm to medial line, 4.9 mm caudal to bregma and 8.0 below the cortical surface). Striatonigral neurons exhibited antidromic responses to SNR stimulation and were named SNR+. Antidromic responses fulfilled the following criteria: (1) constant latency of spike response, (2) all-or-none property of the spike response when the strength of the stimulation was adjusted just above, or just below, threshold, and (3) collision of the antidromic spikes with orthodromic spikes. Because all SNR+ MSNs were silent in 6-OHDA-lesioned rats, the orthodromic spike required for the collision test was evoked by electrical stimulation of the orofacial motor cortex (Mallet et al., 2006). We named SNR– the neurons, which did not exhibit the features of striatal interneurons and which did not exhibit antidromic responses to SNR stimulation (Mallet et al., 2006). Striatal neurons were considered to be unresponsive to antidromic stimulation of the SNR if they exhibited no antidromic spike response to SNR stimulation at maximal current (1.2 mA) while, in the same experiment, at least

one SNR+ neuron was identified by a SNR stimulation at a current ≤ 0.5 mA. Moreover, all but two of the 47 SNR– neurons recorded here in 6-OHDA-lesioned rats were spontaneously active. The two silent SNR– neurons were not further studied.

In order to test the dynamic response of MSNs to cortical input we used paired cortical stimulations at 100 ms intervals as described (Mallet et al., 2006) and we measured the probability of spike discharges in response to both pulses. In order to preserve the

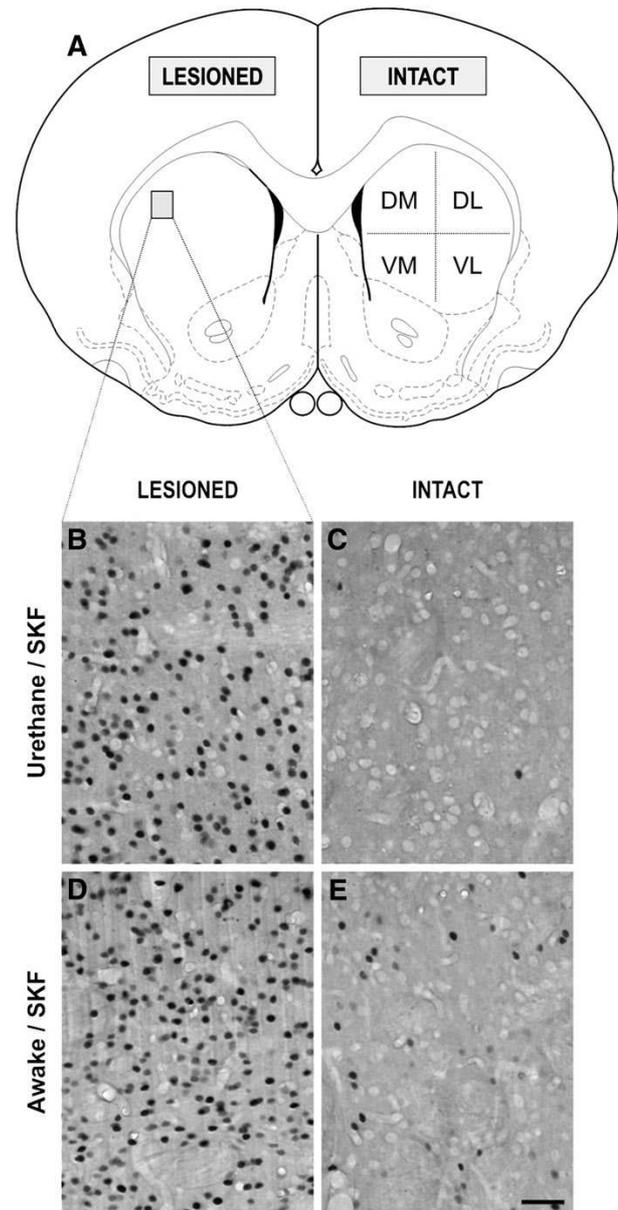


Fig. 1. Fos immunoreactivity in the dorsolateral striatum in the 6-OHDA-lesioned and intact sides of urethane-anesthetized or awake rats, 2 h following saline or D1 agonists treatments. (A) The number of Fos-positive neurons was counted in the four quadrants (DL: dorsolateral, DM: dorsomedian, VL: ventrolateral, VM: ventromedian) of both lesioned and intact striatum. Because we observed no major differences in the drug effects between the four striatal quadrants, the figure shows only micrographs obtained in the dorsolateral striatum. (B–E) Photomicrographs illustrating the effect of SKF-38393 (5 mg/kg, *i.p.*) on the Fos immunoreactivity observed in the lesioned striatum (B, D) and the intact striatum (C, E) of one rat anesthetized with urethane (B, C) and one awake rat (D, E). Scale bar = 50 μ m.

efficiency of the cortical stimulation throughout experiments the stimulating current was limited to a maximum of 800 μ A. Drugs were purchased from Sigma-Aldrich (Lyon, France) and were administered i.p. only once per rat: L-DOPA methyl ester hydrochloride (6 mg/kg), benserazide hydrochloride (15 mg/kg), R(-)-apomorphine hydrochloride hemihydrate (0.2 mg/kg), (\pm)-SKF-38393 (5 and 10 mg/kg), (\pm)-6-Chloro-PB hydrobromide (cPB) (0.5 mg/kg) and (-)-quinpirole hydrochloride (0.5 mg/kg). Drug effects were measured after injections at time ranges that correspond to the maximum of their behavioral effects in 6-OHDA-lesioned rats (Fletcher and Starr, 1989; LaHoste and Marshall, 1990; Lundblad et al., 2002; Ruskin et al., 1999).

Anatomo-functional experiments

The effects of two D1 agonists, SKF-38393 (5 mg/kg, i.p.) and cPB, 0.5 mg/kg, i.p.), on the number of c-Fos-positive neurons were compared to saline treatment in 6-OHDA-lesioned rats either under urethane anesthesia or in awake freely moving rats. Anesthetized rats were fixed on a stereotaxic frame, sham-operated and their slow wave activity was continuously monitored. Saline or D1 agonists were administered to anesthetized rats 4 h after induction of anesthesia. Awake rats were gently moved from their home cage to an individual circular chamber and allowed to habituate for 30 min before either saline or D1 agonist injection. Two hours after drug treatments all rats were sacrificed, under deep urethane anesthesia, by intracardiac perfusion, via the ascending aorta, with sodium chloride (NaCl 9‰) at 4 °C for 5 min followed by 250 ml of a 4% paraformaldehyde (PFA) solution at 4 °C prepared in a 0.2 M phosphate buffer (pH = 7.2). Free-floating serial coronal vibratome sections (60 μ m thick) at the striatal level (between 1.60 mm and -0.26 mm from Bregma according to Paxinos and Watson (1997)) were then collected and preserved in 0.01 M PBS at pH = 7.2 containing 0.03% sodium azide at 4 °C until use.

C-Fos immunohistochemistry

C-Fos immunohistochemistry was performed following a procedure slightly modified from Frenois et al. (2007). Briefly, sections were rinsed in 0.01 M PBS at pH = 7.2 for 10 min, then placed in 0.01 M PBS (pH = 7.2) containing 30% sucrose for 1 h before being fast frozen in isopentane cooled at -40 °C with liquid nitrogen and directly immersed in PBS at room temperature. After rinsing (0.01 M PBS at pH = 7.2, 2 \times 5 min), sections were pre-incubated in 0.01 M PBS (pH 7.2)/1.5% Triton X100/3% normal donkey serum under agitation for 1 h at room temperature. Sections were then incubated overnight at room temperature under agitation with the anti-c-Fos primary antibody (sc52, Santa Cruz Biotechnology, California, USA), diluted 1/8000 in 0.01 M PBS (pH 7.2)/0.3% Triton X100. The following day, sections were rinsed (0.01 M PBS, pH = 7.2, 3 \times 10 min) and incubated under agitation during 2 h at

room temperature with a biotinylated donkey anti-rabbit secondary antibody (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) diluted 1/200 in PBS 0.01 M (pH = 7.2). Sections were rinsed in 0.01 M PBS (pH = 7.2) 3 \times 10 min then incubated 90 min under agitation at room temperature in the ABC complex (Vector Laboratories, Peterborough, UK) diluted 1/200 in 0.01 M PBS at pH = 7.2. After rinsing (PBS 0.01 M, pH = 7.2, 2 \times 10 min), sections were put into 1 \times TBS (pH = 7.6; 3 \times 5 min), before being revealed by diaminobenzidine (0.2 mg/ml) diluted in 1 \times TBS pH = 7.6, in the presence of nickel (40 mg/ml) and 0.3% H₂O₂ (which catalyses the reaction). Sections were then rinsed into 1 \times TBS, pH = 7.6 (2 \times 5 min) and into distilled water (2 \times 5 min), then spread out over slides, air dried then and mounted in Eukitt.

Analysis of c-Fos experiments

The number of c-Fos immunoreactive nuclei was counted using an image analyzer system for cartography (Mercator, Explora Nova, La Rochelle, France) within the entire striatum divided in four quadrants: dorsomedial (DM), dorsolateral (DL), ventromedial (VM) and ventrolateral (VL) (see Fig. 1A). For all rats, quantification was performed within the 6-OHDA-lesioned as well as in the intact striatum. Statistical analysis was performed on individual raw data using a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by *post-hoc* Bonferroni/Dunn multiple comparison test.

Results

Anatomo-functional studies under urethane anesthesia

Systemic administration of D1 agonists much more strongly stimulates the expression of immediate early genes in the 6-OHDA-lesioned striatum than in the intact striatum (Gerfen et al., 1995, 2002; Robertson et al., 1989, 1990). Because these enhanced expressions are largely restricted to striatonigral neurons (Gerfen et al., 1995, 2002; Robertson et al., 1990), these observations have brought strong support to the view that D1 stimulation corrects the depressed activity of striatonigral neurons caused by the dopamine depletion. The first aim of our study was to test whether electrophysiological approaches also support this view. However, because we had to identify MSNs by means of antidromic SNR stimulation, our electrophysiological experiments were performed under urethane anesthesia. Therefore, as a preliminary step, we verified that urethane anesthesia does not alter the anatomo-functional data. As previously reported, in awake freely moving rats the D1 agonists SKF-38393 and cPB strongly stimulated c-Fos expression in the 6-OHDA-lesioned striatum but induced much smaller effects in the intact striatum (Fig. 1 and Table 1). In experimental conditions identical to those of our electrophysiological studies (rats sham-operated under urethane anesthesia) these D1

Table 1
D1 agonist-induced Fos-like immunoreactivity in freely moving and urethane-anesthetized rats with unilateral 6-OHDA lesion.

	Freely moving		Urethane-anesthetized		F value (2-way ANOVAs)	
	Saline	D1 agonist	Saline	D1 agonist	Motor state	Treatment
SKF-38393	n = 5	n = 6	n = 5	n = 5		
Intact DL-STR	9 \pm 5	69 \pm 20	2 \pm 1	1 \pm 1		
Lesioned DL-STR	51 \pm 13	1691 \pm 329	14 \pm 4	1398 \pm 201	0.59	49.99
Intact VL-STR	1 \pm 1	91 \pm 22	0 \pm 1	1 \pm 1		
Lesioned VL-STR	14 \pm 6	1668 \pm 335	12 \pm 4	1111 \pm 127	1.87	45.56
cPB	n = 5	n = 3	n = 5	n = 5		
Intact DL-STR	8 \pm 2	61 \pm 31	7 \pm 6	6 \pm 4		
Lesioned DL-STR	46 \pm 6	1136 \pm 418	26 \pm 4	1421 \pm 272	0.41	36.62
Intact VL-STR	5 \pm 3	76 \pm 35	2 \pm 1	5 \pm 3		
Lesioned VL-STR	39 \pm 11	1013 \pm 322	6 \pm 2	1458 \pm 325	0.93	32.34

Data are mean \pm SEM and represent numbers of Fos-positive nuclei per mm². Two-way ANOVAs demonstrate significant effects of drug treatment with SKF-38393 (5 mg/kg, i.p.) and cPB (0.5 mg/kg, i.p.) in the dorsolateral striatum (DL-STR) and the ventrolateral striatum (VL-STR) ($p < 0.0001$), but no significant effect of motor state (freely moving versus anesthetized) ($p \geq 0.10$). Post hoc tests indicate significant Fos induction by both D1 agonists compared to vehicle treatment in the lesioned striatum in both motor states ($p < 0.0001$).

agonists also strongly stimulated c-Fos expression in the 6-OHDA-lesioned striatum but not in the intact striatum (Fig. 1 and Table 1). Similar increases were observed in both lateral quadrants of the 6-OHDA-lesioned striatum, which corresponded to the localization of the electrophysiological recordings (Table 1) and also in both medial quadrants (data not shown). Preliminary experiments with SKF-38393 at the dose of 10 mg/kg (three 6-OHDA-lesioned rats under urethane anesthesia) gave similar results (data not shown).

Corticostriatal transmission in identified MSNs

As in our previous study we identified here four types of striatal neurons (Mallet et al., 2006). Tonicly active neurons were identified

by their unique, regularly spaced, spontaneous activity between 2 and 6 Hz. These neurons were presumed to be cholinergic interneurons and were not further studied here. Fast spiking GABA interneurons (FSI) were identified by their spike duration, which is briefer than that of all other striatal neurons, and by the fact that they respond with brief burst of 2 to 5 action potentials to supra threshold cortical stimulation (Mallet et al., 2005, 2006). As previously, neurons, which exhibited antidromic responses to SNR stimulation (Fig. 2) were named SNR+ and were considered to be striatonigral MSNs in accordance with previous studies (Ballion et al., 2008; Jaeger et al., 1994; Mallet et al., 2005, 2006; Ryan et al., 1986, 1989). Finally, we named SNR– those neurons, which did not correspond to interneurons and which did not exhibit antidromic responses to SNR stimulation. We previously showed with double labeling that these neurons express the mRNA coding for ENK, a recognized feature of striatopallidal neurons (Mallet et al., 2006). Moreover, we previously observed that, in the 6-OHDA-lesioned striatum, SNR– MSNs are much more spontaneously active than in intact rats, whereas the opposite effect was observed regarding SNR+ neurons (Mallet et al., 2006). Accordingly, all 71 SNR+ neurons studied here in 6-OHDA-lesioned rats were spontaneously silent. In contrast, all but two of the 47 SNR– MSNs studied here were spontaneously active (range: 0.02 to 2.12 Hz; mean \pm SD: 0.62 ± 0.58 Hz). Both silent SNR– MSNs were discarded because they might correspond to striatonigral neurons not detected by the antidromic SNR stimulation.

We tested the spike responses evoked in MSNs by pairs of cortical stimulations applied at 100 ms time intervals. We previously showed in intact rats that the feedforward inhibition by FSIs more dramatically affects the spike responses evoked in MSNs by the first pulse than by the second pulse (Mallet et al., 2005). In 6-OHDA-lesioned rats striatopallidal neurons are more responsive to cortical stimulation and tend to escape this feedforward inhibition. In contrast, the cortical response of striatonigral neurons is depressed by the dopamine depletion and this deficit is worsened by feedforward inhibition, especially the response to the first pulse (Mallet et al., 2006). Indeed, in intact rats the current required to evoke a spike response to the second pulse with a 50% probability was almost identical for SNR+ and SNR– neurons ($395 \pm 24 \mu\text{A}$ $n=73$ and $385 \pm 21 \mu\text{A}$ $n=76$, respectively) (Ballion et al., 2008). Here, in 6OHDA-lesioned rats, this current was enhanced for SNR+ neurons ($540 \pm 24 \mu\text{A}$, mean \pm SEM $n=71$) and decreased for SNR– MSNs ($349 \pm 22 \mu\text{A}$, mean \pm SEM $n=45$). The difference between SNR+ and SNR– neurons is highly significant (unpaired t test, $p<0.0001$). Therefore, the present data

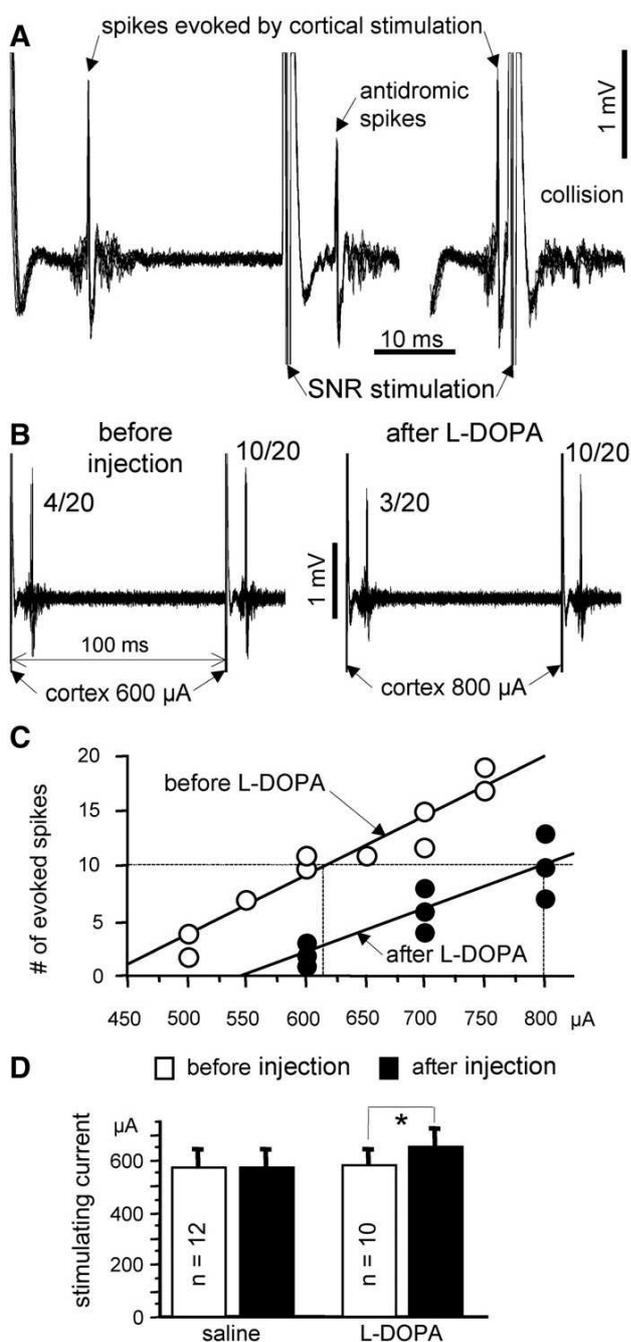


Fig. 2. Effect of L-DOPA on the spike response of SNR+ MSNs to cortical stimulation. (A) Antidromic identification of one SNR+ neuron. The stimulation of the substantia nigra pars reticulata (SNR) was triggered by an orthodromic spike evoked by cortical stimulation with a time interval of 25 ms (left) or 1 ms (right). Recordings show the superimposition of 10 successive responses to SNR stimulation in both conditions. Notice the fixed latency of the antidromic spikes (left) and the collision of the orthodromic spike with the antidromic one at 1 ms intervals (right). Only neurons that fulfilled the 3 criteria of an antidromic response (see Methods) were considered to be striatonigral and called SNR+. (B) Typical example of spike responses evoked in one SNR+ neuron before and after L-DOPA injection. Pairs of cortical stimulations at 100 ms intervals were applied every 3 s by groups of 20 pairs. The spike responses to various stimulations were tested in current ranges, which allowed us to explore in every neuron the full probability scale both before and 30 to 45 min after L-DOPA injection (6 mg/kg + benserazide 15 mg/kg, i.p.). Examples of recordings show the superimposition of the spike responses to cortical stimulations at currents, which evoked a 50% probability in response to the second pulse before (left) and after L-DOPA (right). (C) Number of spikes evoked in the SNR+ neurons illustrated in B in response to the second pulse of the paired cortical stimulation at distinct currents before (white circles) and 30–45 min after L-DOPA (black circles). As illustrated, linear regression allowed us to determine for every neuron the current required for evoking a spike response to the second pulse with a 50% probability before and after L-DOPA or saline injection. (D) Stimulating current required for evoking a spike response with a 50% probability, before and after saline ($n=12$) or L-DOPA ($n=10$) injections. Bar histograms (mean \pm SEM) show that L-DOPA significantly inhibited the spike responses evoked in SNR+ neurons by the second pulse of the cortical stimulation (paired t test, $*p=0.048$).

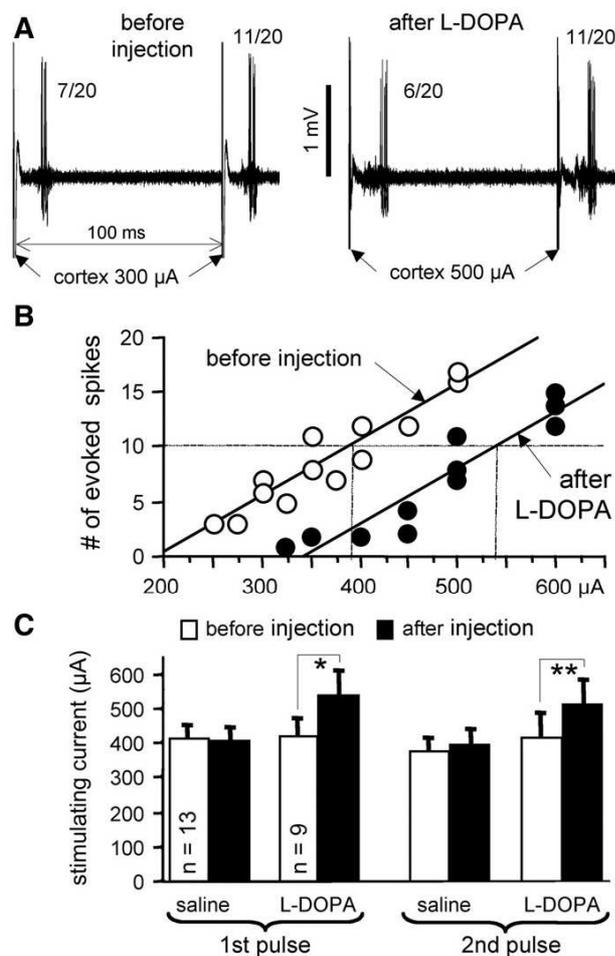


Fig. 3. Effect of L-DOPA on the spike response of SNR[−] MSNs to cortical stimulation. (A) Typical examples of spike responses evoked in one SNR[−] neuron before and after L-DOPA injection. Pairs of cortical stimulations at 100 ms intervals were applied every 3 s by groups of 20. The spike responses to various stimulations were tested in current ranges, which allowed us to explore in every neuron the full probability scale both before and 30 to 45 min after L-DOPA injection (6 mg/kg + benserazide 15 mg/kg, i.p.). Examples of recordings show the superimposition of the spike responses to cortical stimulations at currents, which evoked a 50% probability in response to the second pulse before (left) and after L-DOPA (right). (B) Number of spikes evoked in the SNR[−] neuron illustrated in A in response to the first pulse of the paired cortical stimulation at distinct currents before (white circles) and 30–45 min after L-DOPA (black circles). Linear regression allowed us to determine for every neuron the current required for evoking a spike response to the first and second pulses with a 50% probability before and after L-DOPA or saline injection. (C) Stimulating current required for evoking a spike response with a 50% probability, before and after saline ($n=13$) or L-DOPA ($n=9$) injections. Bar histograms (mean \pm SEM) show that L-DOPA significantly inhibited the spike responses evoked in SNR[−] neurons by the first pulse (paired t test, $*p=0.010$) and by the second pulse of the cortical stimulation (paired t test, $**p=0.004$).

confirm the striatal imbalance described in our previous study (Mallet et al., 2006). Moreover, as in our previous study (Mallet et al., 2006), we found here numerous MSNs, which responded to SNR stimulation in an antidromic manner (fixed latency and all-or-none responses at stimulating currents just above or below threshold), but which did not respond to cortical stimulation at maximal current (800 μ A). Thus, it is likely that identified SNR⁺ neurons, which responded to cortical stimulation, already represented a subpopulation of striatonigral neurons. Among them, about a third responded to the second pulse but their response to the first was too low to be quantified. Therefore, in experiments with drug treatments that inhibit the cortical response

of SNR⁺ neurons, we only considered the spike responses evoked by the second pulse.

Effect of L-DOPA and apomorphine on the spike responses of identified MSNs

In control experiments with saline injections the responsiveness of SNR⁺ (Fig. 2) and of SNR[−] (Fig. 3) neurons to cortical stimulation was fairly stable with time. Compared to saline treatment, L-DOPA significantly inhibited the spike response evoked by the second pulse in SNR⁺ neurons (ANOVA with repeated measures, $F=5.09$ $p=0.035$) (Fig. 2). In SNR[−] neurons (Fig. 3) L-DOPA treatment, compared to saline, also significantly inhibited the spike response evoked by the first pulse (ANOVA with repeated measures; $F=14.54$ $p=0.001$) and the second pulse (ANOVA with repeated measures; $F=6.69$ $p=0.017$). Moreover, L-DOPA moderately depressed the spontaneous discharge activity of SNR[−] neurons (0.43 ± 0.18 Hz after L-DOPA versus 0.57 ± 0.21 Hz before injection, mean \pm SEM, paired t test: $p=0.045$ $n=9$), whereas this activity was fairly stable after saline injection (0.61 ± 0.20 Hz before injection versus 0.63 ± 0.19 Hz after injection, mean \pm SEM, $n=13$). Finally, L-DOPA did not restore the spontaneous activity of SNR⁺ neurons.

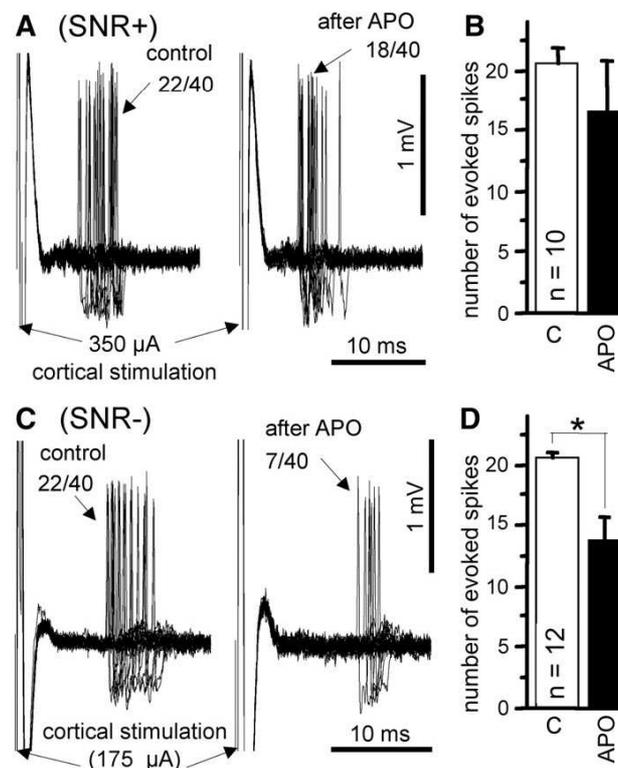


Fig. 4. Effect of apomorphine (0.2 mg/kg i.p.) on the spike response of identified MSNs to cortical stimulation. (A) Typical examples of spike responses evoked in one SNR⁺ neuron. Pairs of cortical stimulations at 100 ms intervals were applied every 3 s by a group of 40. The stimulating current was adjusted by preliminary tests so that the response probability to the second pulse reached 50% before drug injection. Recording traces show the superimposition of the spike responses to the second pulse either before (control) or 20 min after apomorphine injection. (B) Bar histograms (mean \pm SEM, $n=10$) show that apomorphine did not significantly affect the discharge probability of SNR⁺ neurons. (C) Typical examples of spike responses evoked in one SNR[−] MSN. Stimulation conditions were as described in B and recordings show the superimposition of the spike responses to the second pulse either before (control) or 20 min after apomorphine injection. (D) Bar histograms (mean \pm SEM, $n=12$) show that apomorphine significantly depressed the discharge probability of SNR[−] MSNs in response to cortical stimulation (paired t test, $p=0.008$).

Apomorphine, a mixed D1–D2 agonist, did not significantly affect the spike response evoked by the second pulse of the cortical stimulation in SNR+ neurons and significantly decreased it in SNR– MSNs (Fig. 4). Apomorphine also decreased the spike response evoked by the first pulse in the 12 SNR– MSNs studied (paired *t* test, $p = 0.002$; data not shown) and did not affect this response in 7 of the 10 SNR+ neurons (data not shown). In the 3 other SNR+ neurons we were not able to study the spike response to the first pulse because the response probability at maximal stimulating current (800 μ A) was below 50%.

Effects of D1 agonists on SNR+ neurons

In 6-OHDA-lesioned rats SKF-38393 at the dose of 10 mg/kg significantly depressed the probability of the spike response evoked in SNR+ neurons by the second pulse of paired cortical stimulations (Fig. 5A). SKF-38393 at a lower dose (5 mg/kg) and cPB (0.5 mg/kg) has no significant effect on this spike response either in intact or in 6-OHDA-lesioned rats (Fig. 5B). Among the 25 SNR+ neurons tested in 6-OHDA-lesioned rats and which were responsive to the second pulse, 19 were also responsive to the first pulse at a stimulating

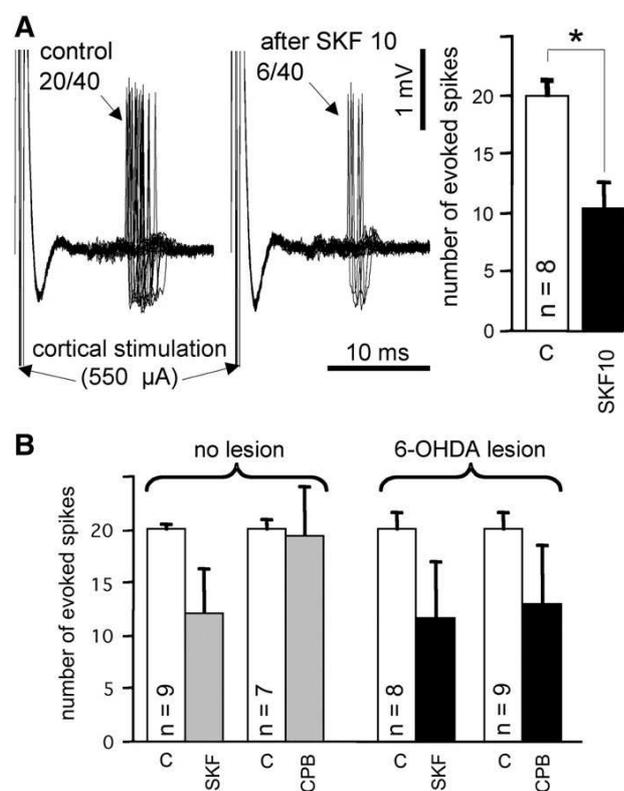


Fig. 5. Effect of D1 agonists on the discharge probability of SNR+ neurons. (A) Typical examples of spike responses evoked in one SNR+ MSN recorded in a 6-OHDA-lesioned rat. Pairs of cortical stimulations at 100 ms intervals were applied every 3 s by group of 40. The stimulating current was adjusted by preliminary tests so that the response probability to the second pulse reached 50% before drug injection. Recordings show the superimposition of the spike responses to the second pulse either before (control) or 30 min after SKF-38393 injection at the dose of 10 mg/kg. Bar histograms (mean \pm SEM, $n = 8$) show that SKF-38393 (10 mg/kg) significantly depressed the discharge probability of SNR+ neurons recorded in 6-OHDA-lesioned rats (paired *t* test, $p = 0.003$). (B) In the same experimental conditions the effects of SKF-38393 (5 mg/kg) and of cPB (0.5 mg/kg) on the discharge probability of SNR+ neurons were studied in 16 intact rats ($n = 9$ and $n = 7$, respectively) and 17 6-OHDA-lesioned rats ($n = 8$ and $n = 9$, respectively). Bar histograms (mean \pm SEM, number of experiments indicated inside bars) show that these treatments tended to depress the discharge probability of SNR+ neurons. However, these effects never reached statistical significance (paired *t* test, $p > 0.1$).

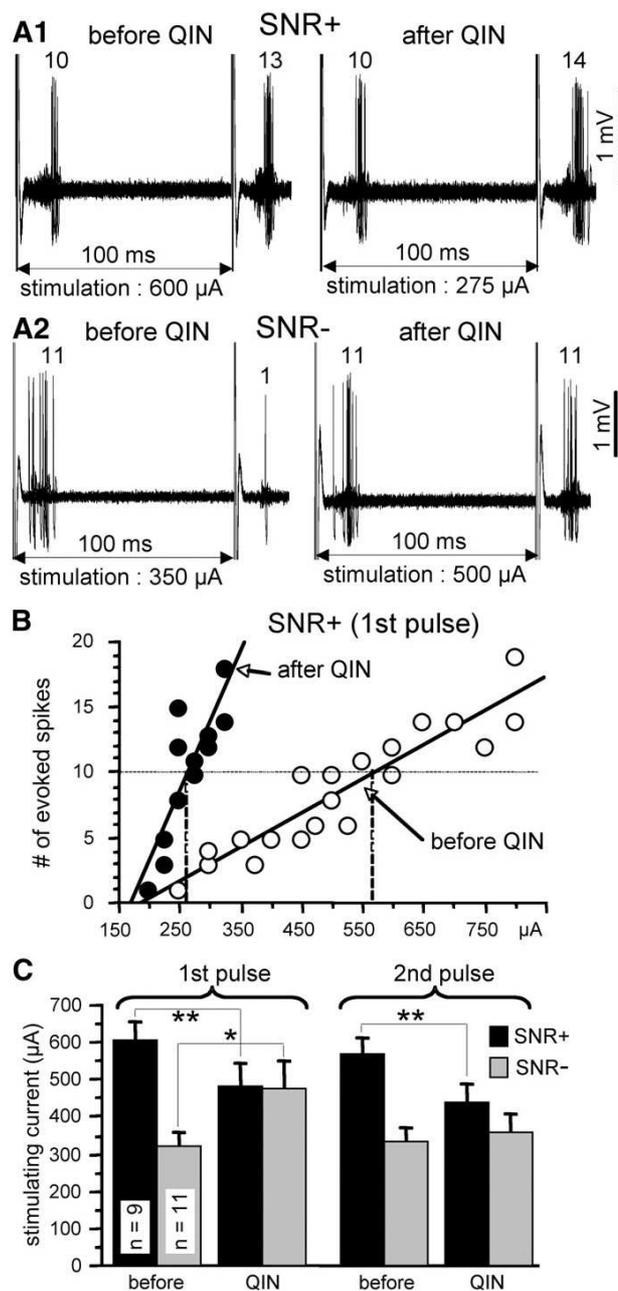


Fig. 6. Effects of quinpirole (QIN, 0.5 mg/kg) on the discharge probability of SNR+ and SNR– MSNs. (A) Typical examples of spike responses evoked in one SNR+ MSN (A1) and one SNR– MSN (A2). Pairs of cortical stimulations at 100 ms intervals were applied every 3 s by group of 20. The spike responses to various stimulations were tested in current ranges, which allowed us to explore in every neuron the full probability scale both before and 20 to 40 min after quinpirole injection. Examples of recordings show the superimposition of the spike responses to cortical stimulations at currents, which evoked a 50% probability in response to the first pulse before (left) and after quinpirole (right). (B) Number of spikes evoked in the SNR+ illustrated in A1 in response to the first pulse of the paired cortical stimulation at distinct currents before (white circles) and 20–40 min after quinpirole (black circles). Linear regression allowed us to determine for every neuron the current required for evoking a spike response with a 50% probability for the first and second pulses, before and after quinpirole. (C) Stimulating current required for evoking a spike response with a 50% probability, before and after quinpirole. Bar histograms (mean \pm SEM) show that quinpirole significantly facilitated the spike responses evoked in 9 SNR+ neurons by the first and second pulses of the cortical stimulation (paired *t* test, $**p < 0.0076$) and significantly inhibited the spike responses evoked in 11 SNR– MSNs by the first pulse of the cortical stimulation (paired *t* test, $*p = 0.011$).

current $\leq 800 \mu\text{A}$. SKF-38393 at doses of 5 and 10 mg/kg and cPB (0.5 mg/kg) did not significantly affect their response to the first pulse (data not shown).

Effects of quinpirole on identified MSNs and on FSIs

As expected, the D2 agonist quinpirole (0.5 mg/kg) inhibited the spike responses evoked in SNR – MSNs by the first and second pulses of paired cortical stimulations. Indeed, the stimulating current required to evoke a spike response with a 50% probability was increased by quinpirole injection. However, this increase reached statistical significance regarding the spike response evoked by the first pulse but not by the second pulse (Fig. 6). To our surprise quinpirole facilitated the spike responses evoked in SNR+ neurons by the first and second pulses. Indeed, the stimulating current required for evoking a spike response with a 50% probability was significantly decreased after quinpirole treatment (Fig. 6). This facilitation was even more robust when considering 3 additional SNR+ neurons, which only responded to the second pulse. Indeed, when considering all these 12 SNR+, the stimulating current required for evoking a spike response to the second pulse was significantly decreased (data not shown, paired *t* test, $p=0.0036$). When comparing SNR+ to SNR – neurons before quinpirole treatment (Fig. 6C), we observed that the stimulating current required to evoke a spike response with a 50% probability was significantly higher for the former than for the latter both regarding the first pulse (unpaired *t* test, $p=0.0002$) and the second pulse (unpaired *t* test, $p=0.0008$). After quinpirole injection we observed no significant differences regarding these currents (Fig. 6C). Therefore, quinpirole reinstates equilibrium between striatonigral and striatopallidal MSNs with regard to their responsiveness to cortical input.

Because FSI exert a potent feedforward inhibition on MSNs, we also investigated the effect of quinpirole on the spike response of FSIs to paired cortical stimulation. As illustrated in Fig. 7A, FSI were identified by their thin spike waveform and their ability to discharge with bursts to supra threshold stimulations. However, we found that quinpirole did not significantly affect the spike responses of the 9 FSI studied (Fig. 7) suggesting that the effects observed in MSNs are not related to drug-induced changes in feedforward inhibition.

Discussion

In accordance with anatomic-functional studies in the rat model of Parkinson's disease (Gerfen, 2000; Gerfen et al., 1990) we show here with our electrophysiological approach that D2 stimulation reverses the enhanced responsiveness of striatopallidal neurons to cortical stimulation. However, regarding striatonigral neurons, two important and unexpected findings resulted from our study. First, L-DOPA and D1 agonists do not counteract, and even worsen, their depressed response to cortical stimulation caused by the dopamine depletion. Second, the D2 agonist quinpirole robustly reverses this depressed response, reinstating a functional equilibrium between striatal output neurons.

Choice of a dynamic index to test corticostriatal transmission

The imbalance of striatal projection neurons caused by the dopamine depletion is well documented by anatomic-functional data (Gerfen, 2000; Gerfen et al., 1990) and by our electrophysiological study (Mallet et al., 2006). In urethane-anesthetized rats this imbalance is obvious both with regard to the spontaneous activity and the spike responses evoked by cortical stimulation. Indeed, in intact rats the spontaneous activity of MSNs is low and very irregular but in 6-OHDA-lesioned rats it is dramatically enhanced specifically in striatopallidal neurons. Although L-DOPA and D2 agonists effectively alleviate parkinsonian symptoms, L-DOPA (present study) and quinpirole (Zold et al., 2007) only moderately reversed (–25% and –28%, respectively) the enhanced spontaneous activity of striatopallidal neurons. However, the spontaneous discharge rate is a tonic parameter, whereas the spike response to cortical stimulation represents a dynamic index, which might be more relevant to movements, especially in the context of the pathophysiology of Parkinson's disease (Leblais et al., 2006). Therefore, we investigated here the spike responses evoked in identified MSNs by cortical stimulation and we used the paired pulse protocol that we previously developed (Mallet et al., 2006).

D2 stimulation, but not D1, corrects the striatal imbalance

To our surprise, we found that stimulation of D1 receptors by L-DOPA, apomorphine, SKF-38393 (5 mg/kg) or cPB did not correct, and actually further worsened (L-DOPA, SKF-38393 10 mg/kg), the depressed response of striatonigral neurons to cortical stimulation in 6-OHDA-lesioned rats. In contrast, the same drug treatments strongly enhance the expression of immediate early genes specifically in striatonigral neurons of the 6-OHDA-lesioned striatum (Carta et al., 2005; Gerfen et al., 1990, 1995, 2002; Paul et al., 1995; Robertson et al., 1990). This discrepancy is not related to our experimental conditions because we observed that D1 agonists induced almost identical stimulations of c-Fos expression in awake rats and in urethane-anesthetized rats. Likewise, barbiturate anesthesia did not affect these D1-mediated stimulations of c-Fos expression (Robertson et al., 1989). Although the mismatch we observe here between early gene expression and discharge activity was not expected, a similar mismatch has been previously reported regarding the discharge and immediate early gene responses of SNR neurons to cortical stimulation (Sgambato et al., 1999). According to Sgambato et al. (1999)

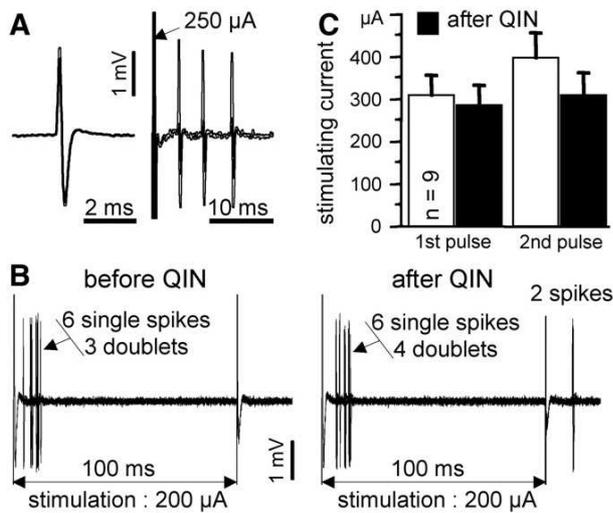


Fig. 7. Effect of quinpirole (QIN, 0.5 mg/kg) on the spike response of fast spiking GABA interneurons (FSI) to paired cortical stimulations. (A) FSI were identified by their spike waveform, which is sharper than that of MSNs, and by their burst responses to supra threshold stimulations. (B) Spike responses evoked by paired cortical stimulation in the FSI identified in A before and after quinpirole injection. Pairs of cortical stimulations at 100 ms intervals were applied every 3 s by group of 20. The spike responses to various stimulations were tested in current ranges, which allowed us to explore in every FSI the full probability scale both before and 20 to 40 min after quinpirole injection. Examples of recordings show the superimposition of the spike responses to cortical stimulations at currents, which evoked a 50% probability in response to the first pulse before (left) and after quinpirole (right). The stimulating current required for evoking a spike response with a 50% probability, before and after quinpirole was determined by means of linear regression as illustrated in Fig. 6B. (C) Bar histograms (mean \pm SEM, $n=9$) show that quinpirole did not significantly affect the spike responses evoked in FSI by the first and second pulses of the cortical stimulation (paired *t* test, $p=0.34$ and $p=0.051$, respectively).

“changes in gene expression induced in the basal ganglia reflect the level of afferent synaptic activity rather than the spike discharge of postsynaptic neurons”. Moreover, our data showing that striatonigral neurons are further inhibited by D1 agonists are in line with a previous electrophysiological study. Indeed, striatonigral neurons are GABAergic and inhibit the discharge activity of SNR neurons (Kita, 1994; Maurice et al., 1999). However, SKF-38393 and cPB, at doses that induce contralateral rotation and strongly stimulate c-Fos expression in the 6-OHDA-lesioned striatum, did not affect the discharge rate of SNR neurons (Ruskin et al., 1999). Therefore, from this previous study it seems unlikely that D1 stimulation strongly enhances the discharge activity of striatonigral neurons in the 6-OHDA-lesioned striatum. Our data are consistent with this prediction.

As predicted by the pathophysiological model of parkinsonian treatment, we found that L-DOPA, apomorphine and the D2 agonist quinpirole depressed the enhanced responsiveness of striatopallidal neurons. Unexpectedly, quinpirole also reversed the depressed responsiveness of striatonigral neurons. This facilitatory effect of quinpirole is highly significant both regarding the spike responses evoked by the first and second pulses. These changes cannot be due to an indirect action of quinpirole on FSI activity because we observed that dopamine depletion (Mallet et al., 2006) and subsequent quinpirole treatment did not affect their responsiveness to cortical input. However, presynaptic D2 receptors exert an inhibitory control on GABA transmissions from MSN collaterals and from FSI terminals to individual MSNs (Delgado et al., 2000; Tecuapetla et al., 2007). Therefore, quinpirole might improve the responsiveness of striatonigral MSNs by inhibiting their GABAergic inputs at a level downstream from spike generation. Further studies with *in vitro* approaches are required to clarify the effects of quinpirole on striatonigral neurons. Taken all together, the differences in the response of striatonigral and striatopallidal neurons to cortical stimulation, which express the functional imbalance caused by the striatal dopamine depletion, are abolished by quinpirole treatment.

Therapeutical implications

Replacement therapy with L-DOPA remains the mainstay of Parkinson's disease treatment. However, long-term L-DOPA therapy is associated, in most patients, with treatment-related involuntary movements known as L-DOPA-induced dyskinesia (LID) (Hauser et al., 2007; Horstink et al., 2006a; Horstink et al., 2006b; Schapira, 2007). In 6-OHDA-lesioned rats with a severe dopamine depletion the first injection of L-DOPA induces abnormal involuntary movements (Lindgren et al., 2007). Clinical and experimental studies point out the role of D1 receptors in the initiation and maintenance of LID (Cenci, 2007; Rascol et al., 2001). More precisely, numerous experimental studies have implicated the hypersensitivity of striatal D1 receptors in LID and assumed that striatonigral neurons are hyperactive during LID (Bezard et al., 2001; Brotchie et al., 2005; Cenci, 2007; Gerfen et al., 2002). However, only a few electrophysiological studies backed this assumption. They showed that LID is associated with a decrease of the firing rate and with changes in the dynamic properties of neurons recorded in the SNR or other output nuclei of the basal ganglia (Boraud et al., 2001; Meissner et al., 2006). However, the causal relationship between these pathological activities and a hypothetical increase in the discharge activity of striatonigral neurons has not been established. Our study shows that, in the severely depleted striatum, D1 stimulation either did not reverse or even worsened (L-DOPA and SKF 38393 at 10 mg/kg) the functional inhibition of striatonigral neurons while the same treatments strongly stimulate their molecular activity (Carta et al., 2005; Gerfen et al., 1995, 2002; Robertson et al., 1990). This functional inhibition might be causally linked to the expression of LID. Indeed, selective lesion of striatonigral neurons in mice also induces the appearance of abnormal involuntary movements (Gantois et al., 2007).

Monotherapy with D2 agonists is efficient in the early stages of Parkinson's disease and is increasingly used because it reduces the incidence of motor complications as compared to L-DOPA therapy (Horstink et al., 2006a; Schapira, 2007). However, in advanced Parkinsonism, D2 agonist treatment is often associated with L-DOPA therapy. This combined treatment is superior to L-DOPA monotherapy because it significantly decreases the incidence of motor fluctuations and LID (Hauser et al., 2007; Horstink et al., 2006b). Indeed, compared to L-DOPA monotherapy, lower doses of L-DOPA can be used with the combined treatment and motor complications are positively related to the duration and doses of L-DOPA treatment (Hauser et al., 2007; Horstink et al., 2006b). However, the mechanisms underlying these D2-based treatments are still debated. Our observations might shed a new light to this question. Indeed, parkinsonian pharmacotherapy is mainly aimed at restoring a dopaminergic stimulation of striatal neurons. However, in healthy subjects physiological dopaminergic functions are achieved by two distinct modes of dopamine release: i) a tonic release, which is generated by the tonic discharge activity of dopaminergic neurons and which mainly stimulates high affinity D2 receptors, and ii) a larger phasic release, which results from brief bursts of dopaminergic action potentials and which transiently stimulates D1 receptors in their low affinity state (Gonon et al., 2000; Goto et al., 2007; Richfield et al., 1989). In the early stage of Parkinsonism, the tonic D2 stimulation achieved by D2 agonists might compensate for the decrease of the tonic dopamine release. We showed here that this D2 stimulation is sufficient to restore a functional equilibrium between both striatal projection pathways. However, this tonic D2 stimulation does not restore the phasic dopaminergic transmission. In the early stages an efficient phasic release might be achieved by surviving dopaminergic neurons providing that D2 agonists could correct the striatal imbalance. In more advanced Parkinsonism, low doses of L-DOPA might help the few surviving dopaminergic neurons to achieve a sufficient phasic transmission in a striatum whose imbalance is already corrected by D2 agonists. Therefore, our study calls for a re-examination of the functional state of striatal projection neurons during chronic treatments with L-DOPA and D2 agonists.

Acknowledgments and funding

We thank Drs Thomas Boraud and Martin Guthrie for critical reading of the manuscript and Jean-Gabriel Hervouet and Laura Cardoit for technical assistance. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the University of Bordeaux and ‘La Fondation de France’ (B.B., F.F. and F.G.), by Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (PICT 26323), Universidad de Buenos Aires and Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Argentina) (C.Z. and M.G.M.). Collaboration between the two groups was funded by International Cooperation Program SECyT-ECOS (A05S01, France and Argentina).

References

- Albin, R.L., et al., 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 12, 366–375.
- Ballion, B., et al., 2008. Intratelencephalic corticostriatal neurons equally excite striatonigral and striatopallidal neurons and their discharge activity is selectively reduced in experimental parkinsonism. *Eur. J. Neurosci.* 27, 2313–2321.
- Bezard, E., et al., 2001. Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: potential for new therapies. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 577–588.
- Boraud, T., et al., 2001. Dopamine agonist-induced dyskinesias are correlated to both firing pattern and frequency alterations of pallidal neurones in the MPTP-treated monkey. *Brain* 124, 546–557.
- Brotchie, J.M., et al., 2005. Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* 112, 359–391.
- Carta, A.R., et al., 2005. Different responsiveness of striatonigral and striatopallidal neurons to L-DOPA after a subchronic intermittent L-DOPA treatment. *Eur. J. Neurosci.* 21, 1196–1204.

- Cenci, M.A., 2007. Dopamine dysregulation of movement control in L-DOPA-induced dyskinesia. *Trends Neurosci.* 30, 236–243.
- Day, M., et al., 2006. Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nat. Neurosci.* 9, 251–259.
- Delgado, A., et al., 2000. Inhibitory control of the GABAergic transmission in the rat neostriatum by D(2) dopamine receptors. *Neuroscience* 95, 1043–1048.
- DeLong, M.R., 1990. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* 13, 281–285.
- Deng, Y.P., et al., 2006. Differential perikaryal localization in rats of D1 and D2 dopamine receptors on striatal projection neuron types identified by retrograde labeling. *J. Chem. Neuroanat.* 32, 101–116.
- Fletcher, G.H., Starr, M.S., 1989. Differential effects of pallidal lesions on the behavioural responses to SKF 38393, LY 171555 and apomorphine in the rat. *Neuroscience* 28, 171–180.
- Frenois, F., et al., 2007. Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. *Psychoneuroendocrinology* 32, 516–531.
- Gantoiu, I., et al., 2007. Ablation of D1 dopamine receptor-expressing cells generates mice with seizures, dystonia, hyperactivity, and impaired oral behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 4182–4187.
- Gerfen, C.R., 2000. Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways. *Trends Neurosci.* 23, 564–70.
- Gerfen, C.R., Wilson, C.J. (Eds.), 1996. *The Basal Ganglia*. Elsevier, Amsterdam.
- Gerfen, C.R., et al., 1990. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250, 1429–1432.
- Gerfen, C.R., et al., 1995. D1 and D2 dopamine receptor function in the striatum: coactivation of D1- and D2-dopamine receptors on separate populations of neurons results in potentiated immediate early gene response in D1-containing neurons. *J. Neurosci.* 15, 8167–8176.
- Gerfen, C.R., et al., 2002. D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum results from a switch in the regulation of ERK1/2/MAP kinase. *J. Neurosci.* 22, 5042–5054.
- Gonon, F., et al., 2000. Geometry and kinetics of dopaminergic transmission in the rat striatum and in mice lacking the dopamine transporter. *Prog. Brain Res.* 25, 291–302.
- Goto, Y., et al., 2007. The Yin and Yang of dopamine release: a new perspective. *Neuropharmacology* 53, 583–587.
- Hauser, R.A., et al., 2007. Ten-year follow-up of Parkinson's disease patients randomized to initial therapy with ropinirole or levodopa. *Mov. Disord.* 22, 2409–2417.
- Hersch, S.M., et al., 1995. Electron microscopic analysis of D1 and D2 dopamine receptor proteins in the dorsal striatum and their synaptic relationships with motor corticostriatal afferents. *J. Neurosci.* 15, 5222–5237.
- Horstink, M., et al., 2006a. Review of the therapeutic management of Parkinson's disease. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Movement Disorder Society-European Section. Part I: early (uncomplicated) Parkinson's disease. *Eur. J. Neurol.* 13, 1170–1185.
- Horstink, M., et al., 2006b. Review of the therapeutic management of Parkinson's disease. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies (EFNS) and the Movement Disorder Society-European Section (MDS-ES). Part II: late (complicated) Parkinson's disease. *Eur. J. Neurol.* 13, 1186–1202.
- Jaeger, D., et al., 1994. Surround inhibition among projection neurons is weak or nonexistent in the rat neostriatum. *J. Neurophysiol.* 72, 2555–2558.
- Kita, H., 1994. Physiology of two disynaptic pathways from the sensori-motor cortex to the basal ganglia output nuclei. In: Percheron, G., et al. (Ed.), *The Basal Ganglia IV*. Plenum, New York.
- LaHoste, G.J., Marshall, J.F., 1990. Nigral D1 and striatal D2 receptors mediate the behavioral effects of dopamine agonists. *Behav. Brain Res.* 38, 233–242.
- Le Moine, C., Bloch, B., 1995. D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J. Comp. Neurol.* 355, 418–426.
- Leblois, A., et al., 2006. Competition between feedback loops underlies normal and pathological dynamics in the basal ganglia. *J. Neurosci.* 26, 3567–3583.
- Lindgren, H.S., et al., 2007. The “motor complication syndrome” in rats with 6-OHDA lesions treated chronically with L-DOPA: relation to dose and route of administration. *Behav. Brain Res.* 177, 150–159.
- Lundblad, M., et al., 2002. Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* 15, 120–132.
- Mallet, N., et al., 2005. Feedforward inhibition of projection neurons by fast spiking GABA interneurons in the rat striatum in vivo. *J. Neurosci.* 25, 3857–3869.
- Mallet, N., et al., 2006. Cortical inputs and GABA interneurons imbalance projection neurons in the striatum of Parkinsonian rats. *J. Neurosci.* 26, 3875–3884.
- Maurice, N., et al., 1999. Relationships between the prefrontal cortex and the basal ganglia in the rat: physiology of the cortico-nigral circuits. *J. Neurosci.* 19, 4674–4681.
- Meissner, W., et al., 2006. Increased slow oscillatory activity in substantia nigra pars reticulata triggers abnormal involuntary movements in the 6-OHDA-lesioned rat in the presence of excessive extracellular striatal dopamine. *Neurobiol. Dis.* 22, 586–598.
- Paul, M.L., et al., 1995. Priming of a D1 dopamine receptor behavioural response is dissociated from striatal immediate-early gene activity. *Neuroscience* 66, 347–359.
- Paxinos, G., Watson, C., 1997. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, London.
- Rascol, O., et al., 2001. Induction by dopamine D1 receptor agonist ABT-431 of dyskinesia similar to levodopa in patients with Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 58, 249–254.
- Richfield, E.K., et al., 1989. Anatomical and affinity state comparisons between dopamine D1 and D2 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 30, 767–777.
- Robertson, H.A., et al., 1989. D1-dopamine receptor agonists selectively activate striatal c-fos independent of rotational behaviour. *Brain Res.* 503, 346–349.
- Robertson, G.S., et al., 1990. Striatonigral projection neurons contain D1 dopamine receptor-activated c-fos. *Brain Res.* 523, 288–290.
- Ruskin, D.N., et al., 1999. Dopamine agonist-mediated rotation in rats with unilateral nigrostriatal lesions is not dependent on net inhibitions of rate in basal ganglia output nuclei. *Neuroscience* 91, 935–946.
- Ryan, L.J., et al., 1986. Substantia nigra stimulation evoked antidromic responses in rat neostriatum. *Exp. Brain Res.* 63, 449–460.
- Ryan, L.J., et al., 1989. Antidromically identified striatonigral projection neurons in the chronically implanted behaving rat: relations of cell firing to amphetamine-induced behaviors. *Behav. Neurosci.* 103, 3–14.
- Schapira, A.H., 2007. Treatment options in the modern management of Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 64, 1083–1088.
- Sgambato, V., et al., 1999. Effect of a functional impairment of corticostriatal transmission on cortically evoked expression of c-Fos and zif 268 in the rat basal ganglia. *Neuroscience* 93, 1313–1321.
- Tecuapetla, F., et al., 2007. Dopaminergic modulation of short-term synaptic plasticity at striatal inhibitory synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 10258–10263.
- Zold, C., et al., 2007. Nigrostriatal lesion induces D2 modulated phase locked activity in the basal ganglia of rats. *Eur. J. Neurosci.* 25, 2131–2144.

Conclusion

La première partie de cette thèse a permis de mettre en évidence pour la première fois l'implication des RD5 du NST dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson. Jusqu'à présent, l'activité constitutive agoniste indépendante des RD5, n'avait pu être démontrée que sur des récepteurs recombinants, exprimés dans des systèmes hétérologues (demshyshyn et al., 2000). Ici, nous avons pu montrer que les RD5 natifs, exprimés au niveau du NST, présentent une activité constitutive. De plus, l'inhibition de cette activité intrinsèque par une approche pharmacologique utilisant un agoniste inverse, améliore les troubles moteurs induits par la déplétion dopaminergique chez le rat. Parallèlement à ces effets comportementaux, l' α -flupentixol injecté localement au niveau du NST, abolit la capacité des neurones du NST à décharger en bouffées, signature pathologique de la maladie de Parkinson, sans affecter les neurones qui déchargent de façon régulière, ni la fréquence de décharge de l'ensemble des neurones enregistrés. Ce résultat confirme l'importance des bouffées du NST dans la manifestation des troubles moteurs de la maladie de Parkinson, et souligne l'implication de l'activité constitutive des RD5 dans la genèse de cette activité pathologique. Ce travail conforte donc l'hypothèse selon laquelle la décharge en bouffées des neurones du NST est une signature électrophysiologique pathologique associée à la manifestation des troubles moteurs de type parkinsonien.

De plus, nous avons montré que l'application locale d' α -flupentixol normalise l'activité métabolique du NST mais également de sa principale cible, la SNr, ce qui tend à démontrer un rétablissement de l'équilibre dans la structure de sortie principale du réseau des ganglions de la base. Car il ne faut pas perdre de vue le fait que le NST fait partie intégrante de ce réseau. Il semble donc très inconvenant d'étudier une seule structure, sans prendre en compte les répercussions que cela peut avoir sur l'ensemble du réseau. De ce fait, les expériences de cytochrome oxydase que nous avons réalisées, nous ont donc permis d'obtenir

une véritable photographie de l'état d'activation du réseau. Comme cela avait déjà été rapporté dans la littérature, l'ensemble des ganglions de la base semble être le siège d'une hyperactivité métabolique causée par la déplétion dopaminergique du système (Blandini et al., 1997 ; Vila et al., 2001 ; Benazzouz et al. 2004). Nous apportons ici la preuve que la manipulation pharmacologique locale du NST, peut engendrer un effet réseau puisque le rétablissement du niveau d'activité métabolique est rapportée non seulement au niveau du NST, mais également au niveau de la SNr, principale cible du NST, et structure de sortie majeure du réseau des GB.

D'autre part, nous apportons également un argument qui confirme l'hypothèse selon laquelle l'activité en bouffées des neurones d'une structure donnée, peut être considérée comme une hyperactivité de la dite structure. En effet, il ne fait nul doute que l'hyperactivité fréquentielle engendre une libération accrue de neurotransmetteur, ce qui augmente l'efficacité de la transmission synaptique. Cette augmentation est par elle-même le reflet d'une hyperactivité. Peut-on de la même façon considérer une activité en bouffées comme une hyperactivité ? A la lueur de nos résultats, il semble que nous puissions répondre par l'affirmative. En effet, nous avons pu mettre en évidence que la lésion du système dopaminergique entraîne une modification drastique du mode de décharge des neurones du NST et de la SNr, sans affecter leur fréquence. En parallèle, la révélation du complexe de cytochrome oxydase nous a permis d'associer ce changement de mode de décharge à une augmentation de l'activité métabolique. Ces résultats, associés à l'étude électrochimique réalisée par Gonon et collaborateurs (1988), nous permettent de penser que le mode de décharge en bouffées, provoque une libération massive de neurotransmetteur, qui peut être à l'origine de l'hyperactivité métabolique que nous avons mesurée.

L'ensemble de ces données met l'accent sur l'importance de l'implication des bouffées de potentiels d'action dans la manifestation des troubles moteurs, et sur la nécessité

d'un outil pharmacologique spécifique des récepteurs D5, qui pourrait relancer l'espoir d'une nouvelle approche thérapeutique pharmacologique dans la lutte contre la maladie de Parkinson.

La deuxième partie de ce travail a permis de confirmer le rôle essentiel de la désorganisation de l'activité électrique des neurones du NST dans la manifestation des troubles moteurs de type parkinsonien (hypokinésie et catalepsie) induits par les antipsychotiques typiques. Une nouvelle fois, ce travail souligne le caractère fondamental du mode de décharge des neurones, bien plus que de leur fréquence. En effet, l'utilisation d'un antipsychotique typique s'accompagne cette fois d'une diminution de la fréquence de décharge des neurones du NST et de la SNr, associée à une désorganisation de l'activité électrique. Le point commun entre ce modèle expérimental de troubles moteurs, et le modèle animal de la maladie de Parkinson demeure l'apparition d'une activité électrique désorganisée, irrégulière ou en bouffées, soupçonnée comme étant à l'origine des déficits moteurs.

En revanche, nos résultats montrent que le NST ne semble pas être impliqué dans l'émergence de dyskinésies tardives induites par les neuroleptiques. En effet, les modifications électrophysiologiques observées après un traitement chronique par des APD typiques induisant des dyskinésies tardives, ne diffèrent pas de celles observées après un traitement aigu entraînant uniquement des troubles moteurs sans dyskinésies tardives.

Nous proposons que le GP pourrait participer à cette désorganisation de façon directe. En effet, nous avons pu mettre en évidence d'une part que les traitements par un APD typique entraîne une augmentation de la fréquence de décharge des neurones du GP, et d'autre part que sa lésion abolit les troubles moteurs, et les modifications électrophysiologiques observées au niveau du NST. De plus, on peut penser qu'une augmentation de la fréquence de décharge

des neurones du GP va conduire à une libération accrue de GABA au niveau du NST, pouvant ainsi engendrer une désorganisation de l'activité électrique au niveau de cette structure.

L'ensemble de ces données suggère qu'une déplétion en dopamine au niveau du GP, que ce soit au cours de la maladie de Parkinson par une perte d'innervation dopaminergique (comme cela a été démontrée dans l'étude à laquelle j'ai participé, publiée dans le journal *Neuroscience*, Bouali-Benazzouz et al., 2009) ou au cours de traitements par des antagonistes dopaminergiques, pourrait contribuer à l'émergence de troubles moteurs.

Si on considère l'ensemble des résultats présentés dans ce manuscrit, on pourra conclure que l'apparition d'un mode de décharge en bouffées au niveau du NST peut être considéré comme un leitmotiv dans la genèse des troubles moteurs hypokinétiques et cataleptiques de type parkinsonien. Nous avons pu montrer que l'activité constitutive des récepteurs D5, démasquée par la déplétion dopaminergique qui survient au cours de la maladie de Parkinson, joue un rôle clé dans la manifestation de ce mode de décharge pathologique. Cependant, d'autres éléments restent à prendre en considération. Notamment lorsqu'on envisage l'intégralité du réseau des ganglions de la base. Ainsi, la réciprocité des connections GP-NST pourrait également participer à la genèse de cette activité pathologique, au regard du rôle primordial que semble jouer le GP lors de la mise en place des troubles moteurs induits par les antipsychotiques typiques.

Perspectives

I. Implication des récepteurs dopaminergiques D5 dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson

Dans le but de compléter cette étude, il est primordial d'utiliser un outil spécifique des RD5. Puisque les agonistes inverses décrits ne sont pas strictement spécifiques des RD5 mais agissent aussi sur les RD2 (Martin et al., 2001), nous proposons une autre approche qui consiste en l'utilisation d'un « peptide découplant » dirigé contre la séquence d'acides aminés 438-448 du RD5, séquence importante pour son activité constitutive (Demchyshyn et al., 2000; Tumova et al., 2003). Ce peptide est actuellement rendu pénétrant par fusion d'une séquence dérivée de la protéine virale TAT du VIH, en collaboration avec M. Tiberi (Université de Montréal, Canada) et M. Garret (Université de Bordeaux, France). Les peptides de fusion contenant cette séquence passent les membranes et sont biologiquement actifs. Ils vont ensuite agir *in situ*, par compétition, ce qui empêchera la fixation des RD5 aux adénylates cyclases dans le but d'inhiber spécifiquement leur activité intrinsèque. L'utilisation de cet outil spécifique novateur devrait nous permettre de confirmer le rôle clé des RD5 dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson, et en faire une cible particulière dans la recherche de nouvelles approches thérapeutique de cette maladie utilisant des agents pharmacologiques.

De plus, il serait également intéressant de poursuivre ces travaux en étudiant les réponses électrophysiologiques des cibles du NST, la SNr et le GP, lorsque l'activité constitutive des RD5 du NST est bloquée par l' α -flupentixol ou par le peptide découplant.

Enfin, dans un but thérapeutique, des tests précliniques des agents pharmacologiques ou des peptides découplants seront réalisés chez un modèle animal de la maladie de Parkinson plus proche de l'Homme, le singe MPTP, semble une étape indispensable.

II. Implication des ganglions de la base dans la manifestation des troubles moteurs induit par les antipsychotiques typiques

Pour compléter nos études, et au vue de nouvelles données publiées récemment par Lacombe et collaborateur (2009), il serait intéressant d'étudier le rôle du noyau entopedonculaire (EP) dans la mise en place des dyskinésies tardives induites par un traitement chroniques aux APD. En effet, cette équipe propose l'existence de micro-circuits au sein du réseau des ganglions de la base. L'un impliquant le NST et la SNr dans la genèse de l'akinésie parkinsonienne et l'autre implquant le noyau EP dans la manifestation des dyskinésies induites par la L-Dopa. Pour vérifier cette hypothèse, nous proposons de caractériser l'activité électrique des neurones du noyau EP chez des rats traités à l'halopéridol de façon chronique après développement des dyskinésies. De plus, une approche lésionnelle visant à détruire le noyau EP devrait permettre de valider cette hypothèse, en supprimant la capacité d'un traitement chronique à l'halopéridol à induire des dyskinésies tardives.

Bibliographie

- Adie EJ, Milligan G (1994) Regulation of basal adenylate cyclase activity in neuroblastoma x glioma hybrid, NG108-15, cells transfected to express the human beta 2 adrenoceptor: evidence for empty receptor stimulation of the adenylate cyclase cascade. *Biochem J* 303 (Pt 3):803-808.
- Afsharpour S (1985) Topographical projections of the cerebral cortex to the subthalamic nucleus. *J Comp Neurol* 236:14-28.
- Afsharpour S (1985) Light microscopic analysis of Golgi-impregnated rat subthalamic neurons. *J Comp Neurol* 236:1-13.
- Agid Y (1991) Parkinson's disease: pathophysiology. *Lancet* 337:1321-1324.
- Aizman O, Brismar H, Uhlen P, Zettergren E, Levey AI, Forssberg H, Greengard P, Aperia A (2000) Anatomical and physiological evidence for D1 and D2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons. *Nat Neurosci* 3:226-230.
- Akaoka H, Aston-Jones G (1991) Opiate withdrawal-induced hyperactivity of locus coeruleus neurons is substantially mediated by augmented excitatory amino acid input. *J Neurosci* 11:3830-3839.
- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12:366-375.
- Alexander GE, DeLong MR, Strick PL (1986) Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci* 9:357-381.
- Alexander GE, Crutcher MD (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 13:266-271.
- Allen LF, Lefkowitz RJ, Caron MG, Cotecchia S (1991) G-protein-coupled receptor genes as protooncogenes: constitutively activating mutation of the alpha 1B-adrenergic receptor enhances mitogenesis and tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:11354-11358.
- Apaydin H, Ahlskog JE, Parisi JE, Boeve BF, Dickson DW (2002) Parkinson disease neuropathology: later-developing dementia and loss of the levodopa response. *Arch Neurol* 59:102-112.
- Aubert I, Guigoni C, Hakansson K, Li Q, Dovero S, Barthe N, Bioulac BH, Gross CE, Fisone G, Bloch B, Bezard E (2005) Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia. *Ann Neurol* 57:17-26.
- Augood SJ, Hollingsworth ZR, Standaert DG, Emson PC, Penney JB, Jr. (2000) Localization of dopaminergic markers in the human subthalamic nucleus. *J Comp Neurol* 421:247-255.

- Aziz TZ, Peggs D, Sambrook MA, Crossman AR (1991) Lesion of the subthalamic nucleus for the alleviation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonism in the primate. *Mov Disord* 6:288-292.
- Ballion B, Frenois F, Zold CL, Chetrit J, Murer MG, Gonon F (2009) D2 receptor stimulation, but not D1, restores striatal equilibrium in a rat model of Parkinsonism. *Neurobiol Dis* 35:376-384.
- Ban TA, Lehmann HE (1974) Thiothixene and the thioxanthenes. *Adv Biochem Psychopharmacol* 9:481-486.
- Barker EL, Westphal RS, Schmidt D, Sanders-Bush E (1994) Constitutively active 5-hydroxytryptamine_{2C} receptors reveal novel inverse agonist activity of receptor ligands. *J Biol Chem* 269:11687-11690.
- Baron MS, Wichmann T, Ma D, DeLong MR (2002) Effects of transient focal inactivation of the basal ganglia in parkinsonian primates. *J Neurosci* 22:592-599.
- Baufreton J, Garret M, Rivera A, de la Calle A, Gonon F, Dufy B, Bioulac B, Taupignon A (2003) D5 (not D1) dopamine receptors potentiate burst-firing in neurons of the subthalamic nucleus by modulating an L-type calcium conductance. *J Neurosci* 23:816-825.
- Baufreton J, Zhu ZT, Garret M, Bioulac B, Johnson SW, Taupignon AI (2005) Dopamine receptors set the pattern of activity generated in subthalamic neurons. *FASEB J* 19:1771-1777.
- Baunez C, Nieoullon A, Amalric M (1995) In a rat model of parkinsonism, lesions of the subthalamic nucleus reverse increases of reaction time but induce a dramatic premature responding deficit. *J Neurosci* 15:6531-6541.
- Beckstead RM (1983) A reciprocal axonal connection between the subthalamic nucleus and the neostriatum in the cat. *Brain Res* 275:137-142.
- Belujon P, Bezard E, Taupignon A, Bioulac B, Benazzouz A (2007) Noradrenergic modulation of subthalamic nucleus activity: behavioral and electrophysiological evidence in intact and 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J Neurosci* 27:9595-9606.
- Benabid AL, Chirossel JP, Mercier C, Louveau A, Passagia JG, Henry S, de Rougemont J, Vrousos C (1987) Removable, adjustable and reusable implants for stereotactic interstitial radiosurgery of brain tumors. *Appl Neurophysiol* 50:278-280.
- Benabid AL, Pollak P, Gervason C, Hoffmann D, Gao DM, Hommel M, Perret JE, de Rougemont J (1991) Long-term suppression of tremor by chronic stimulation of the ventral intermediate thalamic nucleus. *Lancet* 337:403-406.

- Benabid AL, Pollak P, Gross C, Hoffmann D, Benazzouz A, Gao DM, Laurent A, Gentil M, Perret J (1994) Acute and long-term effects of subthalamic nucleus stimulation in Parkinson's disease. *Stereotact Funct Neurosurg* 62:76-84.
- Benazzouz A, Gross C, Feger J, Boraud T, Bioulac B (1993) Reversal of rigidity and improvement in motor performance by subthalamic high-frequency stimulation in MPTP-treated monkeys. *Eur J Neurosci* 5:382-389.
- Benazzouz A, Boraud T, Feger J, Burbaud P, Bioulac B, Gross C (1996) Alleviation of experimental hemiparkinsonism by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus in primates: a comparison with L-Dopa treatment. *Mov Disord* 11:627-632.
- Benazzouz A, Breit S, Koudsie A, Pollak P, Krack P, Benabid AL (2002) Intraoperative microrecordings of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease. *Mov Disord* 17 Suppl 3:S145-149.
- Benazzouz A, Tai CH, Meissner W, Bioulac B, Bezard E, Gross C (2004) High-frequency stimulation of both zona incerta and subthalamic nucleus induces a similar normalization of basal ganglia metabolic activity in experimental parkinsonism. *FASEB J* 18:528-530.
- Bergman H, Wichmann T, DeLong MR (1990) Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science* 249:1436-1438.
- Bergman H, Wichmann T, Karmon B, DeLong MR (1994) The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism. *J Neurophysiol* 72:507-520.
- Bergman H, Feingold A, Nini A, Raz A, Slovin H, Abeles M, Vaadia E (1998) Physiological aspects of information processing in the basal ganglia of normal and parkinsonian primates. *Trends Neurosci* 21:32-38.
- Berretta S, Robertson HA, Graybiel AM (1992) Dopamine and glutamate agonists stimulate neuron-specific expression of Fos-like protein in the striatum. *J Neurophysiol* 68:767-777.
- Berthet A, Porras G, Doudnikoff E, Stark H, Cador M, Bezard E, Bloch B (2009) Pharmacological analysis demonstrates dramatic alteration of D1 dopamine receptor neuronal distribution in the rat analog of L-DOPA-induced dyskinesia. *J Neurosci* 29:4829-4835.
- Bevan MD, Crossman AR, Bolam JP (1994) Neurons projecting from the entopeduncular nucleus to the thalamus receive convergent synaptic inputs from the subthalamic nucleus and the neostriatum in the rat. *Brain Res* 659:99-109.

- Bevan MD, Bolam JP, Crossman AR (1994) Convergent synaptic input from the neostriatum and the subthalamus onto identified nigrothalamic neurons in the rat. *Eur J Neurosci* 6:320-334.
- Bevan MD, Atherton JF, Baufreton J (2006) Cellular principles underlying normal and pathological activity in the subthalamic nucleus. *Curr Opin Neurobiol* 16:621-628.
- Bevan MD, Hallworth NE, Baufreton J (2007) GABAergic control of the subthalamic nucleus. *Prog Brain Res* 160:173-188.
- Bezard E, Bioulac B, Gross CE (1998) Glutamatergic compensatory mechanisms in experimental parkinsonism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 22:609-623.
- Bezard E, Gross CE (1998) Compensatory mechanisms in experimental and human parkinsonism: towards a dynamic approach. *Prog Neurobiol* 55:93-116.
- Bezard E, Ferry S, Mach U, Stark H, Leriche L, Boraud T, Gross C, Sokoloff P (2003) Attenuation of levodopa-induced dyskinesia by normalizing dopamine D3 receptor function. *Nat Med* 9:762-767.
- Billings LM, Marshall JF (2003) D2 antagonist-induced c-fos in an identified subpopulation of globus pallidus neurons by a direct intrapallidal action. *Brain Res* 964:237-243.
- Bishnoi M, Chopra K, Kulkarni SK (2008) Differential striatal levels of TNF-alpha, NFkappaB p65 subunit and dopamine with chronic typical and atypical neuroleptic treatment: role in orofacial dyskinesia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32:1473-1478.
- Blandini F, Garcia-Osuna M, Greenamyre JT (1997) Subthalamic ablation reverses changes in basal ganglia oxidative metabolism and motor response to apomorphine induced by nigrostriatal lesion in rats. *Eur J Neurosci* 9:1407-1413.
- Blandini F, Levandis G, Bazzini E, Nappi G, Armentero MT (2007) Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in the rat: new clues from an old model. *Eur J Neurosci* 25:397-405.
- Bockaert J, Pin JP (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* 18:1723-1729.
- Bolam JP, Smith Y (1990) The GABA and substance P input to dopaminergic neurones in the substantia nigra of the rat. *Brain Res* 529:57-78.
- Bolam JP, Smith Y (1992) The striatum and the globus pallidus send convergent synaptic inputs onto single cells in the entopeduncular nucleus of the rat: a double anterograde labelling study combined with postembedding immunocytochemistry for GABA. *J*

- Comp Neurol 321:456-476.
- Bond RA, Leff P, Johnson TD, Milano CA, Rockman HA, McMinn TR, Apparsundaram S, Hyek MF, Kenakin TP, Allen LF, et al. (1995) Physiological effects of inverse agonists in transgenic mice with myocardial overexpression of the beta 2-adrenoceptor. *Nature* 374:272-276.
- Boraud T, Bezard E, Guehl D, Bioulac B, Gross C (1998) Effects of L-DOPA on neuronal activity of the globus pallidus externalis (GPe) and globus pallidus internalis (GPi) in the MPTP-treated monkey. *Brain Res* 787:157-160.
- Bouali-Benazzouz R, Tai CH, Chetrit J, Benazzouz A (2009) Intrapallidal injection of 6-hydroxydopamine induced changes in dopamine innervation and neuronal activity of globus pallidus. *Neuroscience*.
- Boulay D, Depoortere R, Oblin A, Sanger DJ, Schoemaker H, Perrault G (2000) Haloperidol-induced catalepsy is absent in dopamine D(2), but maintained in dopamine D(3) receptor knock-out mice. *Eur J Pharmacol* 391:63-73.
- Bouthenet ML, Martres MP, Sales N, Schwartz JC (1987) A detailed mapping of dopamine D-2 receptors in rat central nervous system by autoradiography with [125I]iodosulpride. *Neuroscience* 20:117-155.
- Boyson SJ, McGonigle P, Molinoff PB (1986) Quantitative autoradiographic localization of the D1 and D2 subtypes of dopamine receptors in rat brain. *J Neurosci* 6:3177-3188.
- Brown PA, Carman JB (1979) A specific pattern of connections from the sensorimotor region of the cerebral cortex to the thalamus in the rat. *Acta Anat (Basel)* 104:99-103.
- Browne S, Roe M, Lane A, Gervin M, Morris M, Kinsella A, Larkin C, Callaghan EO (1996) Quality of life in schizophrenia: relationship to sociodemographic factors, symptomatology and tardive dyskinesia. *Acta Psychiatr Scand* 94:118-124.
- Bunney BS, Grace AA (1978) Acute and chronic haloperidol treatment: comparison of effects on nigral dopaminergic cell activity. *Life Sci* 23:1715-1727.
- Burbaud P, Gross C, Benazzouz A, Coussemaq M, Bioulac B (1995) Reduction of apomorphine-induced rotational behaviour by subthalamic lesion in 6-OHDA lesioned rats is associated with a normalization of firing rate and discharge pattern of pars reticulata neurons. *Exp Brain Res* 105:48-58.
- Burkhardt JM, Constantinidis C, Anstrom KK, Roberts DC, Woodward DJ (2007) Synchronous oscillations and phase reorganization in the basal ganglia during akinesia induced by high-dose haloperidol. *Eur J Neurosci* 26:1912-1924.

- Burn DJ (2002) Beyond the iron mask: towards better recognition and treatment of depression associated with Parkinson's disease. *Mov Disord* 17:445-454.
- Burstein ES, Spalding TA, Brauner-Osborne H, Brann MR (1995) Constitutive activation of muscarinic receptors by the G-protein Gq. *FEBS Lett* 363:261-263.
- Campbell GA, Eckardt MJ, Weight FF (1985) Dopaminergic mechanisms in subthalamic nucleus of rat: analysis using horseradish peroxidase and microiontophoresis. *Brain Res* 333:261-270.
- Canteras NS, Shammah-Lagnado SJ, Silva BA, Ricardo JA (1990) Afferent connections of the subthalamic nucleus: a combined retrograde and anterograde horseradish peroxidase study in the rat. *Brain Res* 513:43-59.
- Carlsson A, Lindqvist M (1963) Effect Of Chlorpromazine Or Haloperidol On Formation Of 3methoxytyramine And Normetanephrine In Mouse Brain. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 20:140-144.
- Carter DA, Fibiger HC (1978) The projections of the entopeduncular nucleus and globus pallidus in rat as demonstrated by autoradiography and horseradish peroxidase histochemistry. *J Comp Neurol* 177:113-123.
- Cash R, Dennis T, L'Heureux R, Raisman R, Javoy-Agid F, Scatton B (1987) Parkinson's disease and dementia: norepinephrine and dopamine in locus ceruleus. *Neurology* 37:42-46.
- Centonze D, Grande C, Saulle E, Martin AB, Gubellini P, Pavon N, Pisani A, Bernardi G, Moratalla R, Calabresi P (2003) Distinct roles of D1 and D5 dopamine receptors in motor activity and striatal synaptic plasticity. *J Neurosci* 23:8506-8512.
- Chapman MA, See RE (1996) Differential effects of unique profile antipsychotic drugs on extracellular amino acids in the ventral pallidum and globus pallidus of rats. *J Pharmacol Exp Ther* 277:1586-1594.
- Charpentier S, Jarvie KR, Severynse DM, Caron MG, Tiberi M (1996) Silencing of the constitutive activity of the dopamine D1B receptor. Reciprocal mutations between D1 receptor subtypes delineate residues underlying activation properties. *J Biol Chem* 271:28071-28076.
- Chesselet MF, Soghomonian JJ, Salin P (1995) Anatomical localization and regulation of somatostatin gene expression in the basal ganglia and its clinical implications. *Ciba Found Symp* 190:51-59; discussion 59-64.
- Chetrit J, Ballion B, Laquitaine S, Belujon P, Morin S, Taupignon A, Bioulac B, Gross CE, Benazzouz A (2009) Involvement of Basal Ganglia network in motor disabilities

- induced by typical antipsychotics. *PLoS One* 4:e6208.
- Chiodo LA, Bunney BS (1983) Typical and atypical neuroleptics: differential effects of chronic administration on the activity of A9 and A10 midbrain dopaminergic neurons. *J Neurosci* 3:1607-1619.
- Ciliax BJ, Nash N, Heilman C, Sunahara R, Hartney A, Tiberi M, Rye DB, Caron MG, Niznik HB, Levey AI (2000) Dopamine D(5) receptor immunolocalization in rat and monkey brain. *Synapse* 37:125-145.
- Civelli O, Bunzow JR, Grandy DK (1993) Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33:281-307.
- Clarke WP, Bond RA (1998) The elusive nature of intrinsic efficacy. *Trends Pharmacol Sci* 19:270-276.
- Costa T, Herz A (1989) Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7321-7325.
- Costall B, Olley JE (1971) Cholinergic and neuroleptic induced catalepsy: modification by lesions in the globus pallidus and substantia nigra. *Neuropharmacology* 10:581-594.
- Costall B, Naylor RJ, Olley JE (1972) Catalepsy and circling behaviour after intracerebral injections of neuroleptic, cholinergic and anticholinergic agents into the caudate-putamen, globus pallidus and substantia nigra of rat brain. *Neuropharmacology* 11:645-663.
- Coward DM (1992) General pharmacology of clozapine. *Br J Psychiatry Suppl*:5-11.
- Crossman AR, Sambrook MA, Jackson A (1984) Experimental hemichorea/hemiballismus in the monkey. Studies on the intracerebral site of action in a drug-induced dyskinesia. *Brain* 107 (Pt 2):579-596.
- D'Aoust JP, Tiberi M (2009) Role of the extracellular amino terminus and first membrane-spanning helix of dopamine D1 and D5 receptors in shaping ligand selectivity and efficacy. *Cell Signal*.
- Darbaky Y, Forni C, Amalric M, Baunez C (2003) High frequency stimulation of the subthalamic nucleus has beneficial antiparkinsonian effects on motor functions in rats, but less efficiency in a choice reaction time task. *Eur J Neurosci* 18:951-956.
- Dawson TM, Barone P, Sidhu A, Wamsley JK, Chase TN (1988) The D1 dopamine receptor in the rat brain: quantitative autoradiographic localization using an iodinated ligand. *Neuroscience* 26:83-100.

- Dawson VL, Dawson TM, Filloux FM, Wamsley JK (1988) Evidence for dopamine D-2 receptors on cholinergic interneurons in the rat caudate-putamen. *Life Sci* 42:1933-1939.
- De Deurwaerdere P, Navailles S, Berg KA, Clarke WP, Spampinato U (2004) Constitutive activity of the serotonin_{2C} receptor inhibits in vivo dopamine release in the rat striatum and nucleus accumbens. *J Neurosci* 24:3235-3241.
- De Lean A, Rodbard D (1980) Kinetic analysis of cooperative ligand binding: applications to the insulin receptor. *Fed Proc* 39:116-120.
- Degos B, Deniau JM, Thierry AM, Glowinski J, Pezard L, Maurice N (2005) Neuroleptic-induced catalepsy: electrophysiological mechanisms of functional recovery induced by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *J Neurosci* 25:7687-7696.
- Degos B, Deniau JM, Le Cam J, Maily P, Maurice N (2008) Evidence for a direct subthalamo-cortical loop circuit in the rat. *Eur J Neurosci* 27:2599-2610.
- Delfs JM, Anegawa NJ, Chesselet MF (1995) Glutamate decarboxylase messenger RNA in rat pallidum: comparison of the effects of haloperidol, clozapine and combined haloperidol-scopolamine treatments. *Neuroscience* 66:67-80.
- DeLong MR (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci* 13:281-285.
- Delwaide PJ, Sabbatino M, Delwaide C (1986) Some pathophysiological aspects of the parkinsonian rigidity. *J Neural Transm Suppl* 22:129-139.
- Demchyshyn LL, McConkey F, Niznik HB (2000) Dopamine D5 receptor agonist high affinity and constitutive activity profile conferred by carboxyl-terminal tail sequence. *J Biol Chem* 275:23446-23455.
- Deniau JM, Maily P, Maurice N, Charpier S (2007) The pars reticulata of the substantia nigra: a window to basal ganglia output. *Prog Brain Res* 160:151-172.
- Divac I, Mojsilovic-Petrovic J, Lopez-Figueroa MO, Petrovic-Minic B, Moller M (1995) Improved contrast in histochemical detection of cytochrome oxidase: metallic ions protocol. *J Neurosci Methods* 56:105-113.
- Dulawa SC, Grandy DK, Low MJ, Paulus MP, Geyer MA (1999) Dopamine D4 receptor-knock-out mice exhibit reduced exploration of novel stimuli. *J Neurosci* 19:9550-9556.
- Dutton A, Dyball RE (1979) Phasic firing enhances vasopressin release from the rat neurohypophysis. *J Physiol* 290:433-440.

- Ehmann TS, Delva NJ, Beninger RJ (1987) Flupenthixol in chronic schizophrenic inpatients: a controlled comparison with haloperidol. *J Clin Psychopharmacol* 7:173-175.
- Ehringer H, Hornykiewicz O (1960) [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system.]. *Klin Wochenschr* 38:1236-1239.
- Eltayb A, Wadenberg ML, Svensson TH (2005) Enhanced cortical dopamine output and antipsychotic-like effect of raclopride with adjunctive low-dose L-dopa. *Biol Psychiatry* 58:337-343.
- Farde L, Wiesel FA, Halldin C, Sedvall G (1988) Central D2-dopamine receptor occupancy in schizophrenic patients treated with antipsychotic drugs. *Arch Gen Psychiatry* 45:71-76.
- Farde L, Nordstrom AL (1992) PET analysis indicates atypical central dopamine receptor occupancy in clozapine-treated patients. *Br J Psychiatry Suppl*:30-33.
- Farde L, Nordstrom AL, Wiesel FA, Pauli S, Halldin C, Sedvall G (1992) Positron emission tomographic analysis of central D1 and D2 dopamine receptor occupancy in patients treated with classical neuroleptics and clozapine. Relation to extrapyramidal side effects. *Arch Gen Psychiatry* 49:538-544.
- Federman AD, Conklin BR, Schrader KA, Reed RR, Bourne HR (1992) Hormonal stimulation of adenylyl cyclase through Gi-protein beta gamma subunits. *Nature* 356:159-161.
- Feger J, Robledo P (1991) The Effects of Activation or Inhibition of the Subthalamic Nucleus on the Metabolic and Electrophysiological Activities Within the Pallidal Complex and Substantia Nigra in the Rat. *Eur J Neurosci* 3:947-952.
- Feger J, Bevan M, Crossman AR (1994) The projections from the parafascicular thalamic nucleus to the subthalamic nucleus and the striatum arise from separate neuronal populations: a comparison with the corticostriatal and corticosubthalamic efferents in a retrograde fluorescent double-labelling study. *Neuroscience* 60:125-132.
- Filion M, Tremblay L, Bedard PJ (1991) Effects of dopamine agonists on the spontaneous activity of globus pallidus neurons in monkeys with MPTP-induced parkinsonism. *Brain Res* 547:152-161.
- Flores G, Liang JJ, Sierra A, Martinez-Fong D, Quirion R, Aceves J, Srivastava LK (1999) Expression of dopamine receptors in the subthalamic nucleus of the rat: characterization using reverse transcriptase-polymerase chain reaction and autoradiography. *Neuroscience* 91:549-556.

- Fonnum F, Grofava I, Rinvik E (1978) Origin and distribution of glutamate decarboxylase in the nucleus subthalamicus of the cat. *Brain Res* 153:370-374.
- Fowler SC, Liao RM, Skjoldager P (1990) A new rodent model for neuroleptic-induced pseudo-parkinsonism: low doses of haloperidol increase forelimb tremor in the rat. *Behav Neurosci* 104:449-456.
- Fremeau RT, Jr., Duncan GE, Fornaretto MG, Dearry A, Gingrich JA, Breese GR, Caron MG (1991) Localization of D1 dopamine receptor mRNA in brain supports a role in cognitive, affective, and neuroendocrine aspects of dopaminergic neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3772-3776.
- Fritze J, Spreda I (1997) Tolerability of low dose neuroleptics: a case control study of flupenthixol. *Eur Neuropsychopharmacol* 7:261-266.
- Fuchs H, Hauber W (2004) Changes in extracellular dopamine in the rat globus pallidus induced by typical and atypical antipsychotic drugs. *Neurochem Int* 45:1029-1038.
- Fujimoto K, Kita H (1992) Responses of rat substantia nigra pars reticulata units to cortical stimulation. *Neurosci Lett* 142:105-109.
- Galvan A, Floran B, Erlij D, Aceves J (2001) Intrapallidal dopamine restores motor deficits induced by 6-hydroxydopamine in the rat. *J Neural Transm* 108:153-166.
- Garcia-Cairasco N, Miguel EC, Rauch SL, Leckman JF (1997) Current controversies and future directions in basal ganglia research. Integrating basic neuroscience and clinical investigation. *Psychiatr Clin North Am* 20:945-962.
- Gerfen CR, Staines WA, Arbuthnott GW, Fibiger HC (1982) Crossed connections of the substantia nigra in the rat. *J Comp Neurol* 207:283-303.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Jr., Sibley DR (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250:1429-1432.
- Gerfen CR, Keefe KA, Gauda EB (1995) D1 and D2 dopamine receptor function in the striatum: coactivation of D1- and D2-dopamine receptors on separate populations of neurons results in potentiated immediate early gene response in D1-containing neurons. *J Neurosci* 15:8167-8176.
- Gerfen CR (2000) Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways. *Trends Neurosci* 23:S64-70.
- Gill SS, Heywood P (1997) Bilateral dorsolateral subthalamotomy for advanced Parkinson's disease. *Lancet* 350:1224.

- Gilman AG (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 56:615-649.
- Gingrich JA, Caron MG (1993) Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu Rev Neurosci* 16:299-321.
- Goetz CG, Stebbins GT (1995) Mortality and hallucinations in nursing home patients with advanced Parkinson's disease. *Neurology* 45:669-671.
- Gonon FG (1988) Nonlinear relationship between impulse flow and dopamine released by rat midbrain dopaminergic neurons as studied by in vivo electrochemistry. *Neuroscience* 24:19-28.
- Gonzalez-Lima F, Jones D (1994) Quantitative mapping of cytochrome oxidase activity in the central auditory system of the gerbil: a study with calibrated activity standards and metal-intensified histochemistry. *Brain Res* 660:34-49.
- Grace AA, Bunney BS, Moore H, Todd CL (1997) Dopamine-cell depolarization block as a model for the therapeutic actions of antipsychotic drugs. *Trends Neurosci* 20:31-37.
- Graybiel AM (1990) Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 13:244-254.
- Graybiel AM (2005) The basal ganglia: learning new tricks and loving it. *Curr Opin Neurobiol* 15:638-644.
- Groenewegen HJ, Berendse HW (1990) Connections of the subthalamic nucleus with ventral striatopallidal parts of the basal ganglia in the rat. *J Comp Neurol* 294:607-622.
- Grotewiel MS, Sanders-Bush E (1999) Differences in agonist-independent activity of 5-Ht2A and 5-HT2c receptors revealed by heterologous expression. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 359:21-27.
- Guigoni C, Aubert I, Li Q, Gurevich VV, Benovic JL, Ferry S, Mach U, Stark H, Leriche L, Hakansson K, Bioulac BH, Gross CE, Sokoloff P, Fisone G, Gurevich EV, Bloch B, Bezard E (2005) Pathogenesis of levodopa-induced dyskinesia: focus on D1 and D3 dopamine receptors. *Parkinsonism Relat Disord* 11 Suppl 1:S25-29.
- Gurevich EV, Joyce JN (1999) Distribution of dopamine D3 receptor expressing neurons in the human forebrain: comparison with D2 receptor expressing neurons. *Neuropsychopharmacology* 20:60-80.
- Halliday GM, Blumbergs PC, Cotton RG, Blessing WW, Geffen LB (1990) Loss of brainstem serotonin- and substance P-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain Res* 510:104-107.

- Hallworth NE, Bevan MD (2005) Globus pallidus neurons dynamically regulate the activity pattern of subthalamic nucleus neurons through the frequency-dependent activation of postsynaptic GABAA and GABAB receptors. *J Neurosci* 25:6304-6315.
- Hammond C, Feger J, Bioulac B, Souteyrand JP (1979) Experimental hemiballism in the monkey produced by unilateral kainic acid lesion in corpus Luysii. *Brain Res* 171:577-580.
- Hammond C, Yelnik J (1983) Intracellular labelling of rat subthalamic neurones with horseradish peroxidase: computer analysis of dendrites and characterization of axon arborization. *Neuroscience* 8:781-790.
- Hammond C, Rouzair-Dubois B, Feger J, Jackson A, Crossman AR (1983) Anatomical and electrophysiological studies on the reciprocal projections between the subthalamic nucleus and nucleus tegmenti pedunculopontinus in the rat. *Neuroscience* 9:41-52.
- Hammond C, Bergman H, Brown P (2007) Pathological synchronization in Parkinson's disease: networks, models and treatments. *Trends Neurosci* 30:357-364.
- Hassani OK, Mouroux M, Feger J (1996) Increased subthalamic neuronal activity after nigral dopaminergic lesion independent of disinhibition via the globus pallidus. *Neuroscience* 72:105-115.
- Hassani OK, Francois C, Yelnik J, Feger J (1997) Evidence for a dopaminergic innervation of the subthalamic nucleus in the rat. *Brain Res* 749:88-94.
- Hassani OK, Feger J (1999) Effects of intrasubthalamic injection of dopamine receptor agonists on subthalamic neurons in normal and 6-hydroxydopamine-lesioned rats: an electrophysiological and c-Fos study. *Neuroscience* 92:533-543.
- Hauber W, Lutz S, Munkle M (1998) The effects of globus pallidus lesions on dopamine-dependent motor behaviour in rats. *Neuroscience* 86:147-157.
- Hauber W, Lutz S (1999) Dopamine D1 or D2 receptor blockade in the globus pallidus produces akinesia in the rat. *Behav Brain Res* 106:143-150.
- Hauber W, Lutz S (1999) Blockade of dopamine D2, but not of D1 receptors in the rat globus pallidus induced Fos-like immunoreactivity in the caudate-putamen, substantia nigra and entopeduncular nucleus. *Neurosci Lett* 271:73-76.
- Hauber W, Neuscheler P, Nagel J, Muller CE (2001) Catalepsy induced by a blockade of dopamine D1 or D2 receptors was reversed by a concomitant blockade of adenosine A(2A) receptors in the caudate-putamen of rats. *Eur J Neurosci* 14:1287-1293.
- Hernandez A, Sierra A, Valdiosera R, Floran B, Erlij D, Aceves J (2007) Presynaptic D1 dopamine receptors facilitate glutamatergic neurotransmission in the rat globus

- pallidus. *Neurosci Lett* 425:188-191.
- Hersch SM, Ciliax BJ, Gutekunst CA, Rees HD, Heilman CJ, Yung KK, Bolam JP, Ince E, Yi H, Levey AI (1995) Electron microscopic analysis of D1 and D2 dopamine receptor proteins in the dorsal striatum and their synaptic relationships with motor corticostriatal afferents. *J Neurosci* 15:5222-5237.
- Hess EJ, Norman AB, Creese I (1988) Chronic treatment with dopamine receptor antagonists: behavioral and pharmacologic effects on D1 and D2 dopamine receptors. *J Neurosci* 8:2361-2370.
- Hirsch EC, Perier C, Orioux G, Francois C, Feger J, Yelnik J, Vila M, Levy R, Tolosa ES, Marin C, Trinidad Herrero M, Obeso JA, Agid Y (2000) Metabolic effects of nigrostriatal denervation in basal ganglia. *Trends Neurosci* 23:S78-85.
- Hollerman JR, Grace AA (1992) Subthalamic nucleus cell firing in the 6-OHDA-treated rat: basal activity and response to haloperidol. *Brain Res* 590:291-299.
- Holmes A, Hollon TR, Gleason TC, Liu Z, Dreiling J, Sibley DR, Crawley JN (2001) Behavioral characterization of dopamine D5 receptor null mutant mice. *Behav Neurosci* 115:1129-1144.
- Hornykiewicz O (2001) Dopamine and Parkinson's disease. A personal view of the past, the present, and the future. *Adv Neurol* 86:1-11.
- Hornykiewicz O (2002) Dopamine miracle: from brain homogenate to dopamine replacement. *Mov Disord* 17:501-508.
- Hornykiewicz O (2006) The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain. *J Neural Transm Suppl*:9-15.
- Houeto JL, Damier P, Bejjani PB, Staedler C, Bonnet AM, Arnulf I, Pidoux B, Dormont D, Cornu P, Agid Y (2000) Subthalamic stimulation in Parkinson disease: a multidisciplinary approach. *Arch Neurol* 57:461-465.
- Hunt SP, Pini A, Evan G (1987) Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* 328:632-634.
- Hurtig HI, Trojanowski JQ, Galvin J, Ewbank D, Schmidt ML, Lee VM, Clark CM, Glosser G, Stern MB, Gollomp SM, Arnold SE (2000) Alpha-synuclein cortical Lewy bodies correlate with dementia in Parkinson's disease. *Neurology* 54:1916-1921.
- Hutchison WD, Allan RJ, Opitz H, Levy R, Dostrovsky JO, Lang AE, Lozano AM (1998) Neurophysiological identification of the subthalamic nucleus in surgery for Parkinson's disease. *Ann Neurol* 44:622-628.

- Hutchison WD, Dostrovsky JO, Walters JR, Courtemanche R, Boraud T, Goldberg J, Brown P (2004) Neuronal oscillations in the basal ganglia and movement disorders: evidence from whole animal and human recordings. *J Neurosci* 24:9240-9243.
- Javoy-Agid F, Agid Y (1980) Is the mesocortical dopaminergic system involved in Parkinson disease? *Neurology* 30:1326-1330.
- Johnson AE, Coirini H, Kallstrom L, Wiesel FA (1994) Characterization of dopamine receptor binding sites in the subthalamic nucleus. *Neuroreport* 5:1836-1838.
- Jurgens U (1984) The efferent and afferent connections of the supplementary motor area. *Brain Res* 300:63-81.
- Kane JM (1995) Antipsychotic medication in the treatment of schizophrenia. *Isr J Psychiatry Relat Sci* 32:30-37.
- Kaneoke Y, Vitek JL (1996) Burst and oscillation as disparate neuronal properties. *J Neurosci Methods* 68:211-223.
- Kapur S, Zipursky R, Jones C, Remington G, Houle S (2000) Relationship between dopamine D(2) occupancy, clinical response, and side effects: a double-blind PET study of first-episode schizophrenia. *Am J Psychiatry* 157:514-520.
- Kebabian JW, Calne DB (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277:93-96.
- Keefe KA, Gerfen CR (1995) D1-D2 dopamine receptor synergy in striatum: effects of intrastriatal infusions of dopamine agonists and antagonists on immediate early gene expression. *Neuroscience* 66:903-913.
- Kenakin T (2001) Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation. *FASEB J* 15:598-611.
- Kenakin T (2004) Allosteric modulators: the new generation of receptor antagonist. *Mol Interv* 4:222-229.
- Khan ZU, Gutierrez A, Martin R, Penafiel A, Rivera A, de la Calle A (2000) Dopamine D5 receptors of rat and human brain. *Neuroscience* 100:689-699.
- Kita H, Chang HT, Kitai ST (1983) Pallidal inputs to subthalamus: intracellular analysis. *Brain Res* 264:255-265.
- Kita H, Kitai ST (1987) Efferent projections of the subthalamic nucleus in the rat: light and electron microscopic analysis with the PHA-L method. *J Comp Neurol* 260:435-452.
- Kitai ST, Sugimori M, Kocsis JD (1976) Excitatory nature of dopamine in the nigro-caudate pathway. *Exp Brain Res* 24:351-363.
- Kitai ST, Deniau JM (1981) Cortical inputs to the subthalamus: intracellular analysis. *Brain Res* 214:411-415.

- Krack P, Pollak P, Limousin P, Hoffmann D, Xie J, Benazzouz A, Benabid AL (1998) Subthalamic nucleus or internal pallidal stimulation in young onset Parkinson's disease. *Brain* 121 (Pt 3):451-457.
- Krack P, Batir A, Van Blercom N, Chabardes S, Fraix V, Ardouin C, Koudsie A, Limousin PD, Benazzouz A, LeBas JF, Benabid AL, Pollak P (2003) Five-year follow-up of bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med* 349:1925-1934.
- Kreiss DS, Anderson LA, Walters JR (1996) Apomorphine and dopamine D(1) receptor agonists increase the firing rates of subthalamic nucleus neurons. *Neuroscience* 72:863-876.
- Kreiss DS, Mastropietro CW, Rawji SS, Walters JR (1997) The response of subthalamic nucleus neurons to dopamine receptor stimulation in a rodent model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 17:6807-6819.
- Kuhn KU, Meyer K, Maier W (2000) [Flupenthixol--a partial atypical neuroleptic?]. *Fortschr Neurol Psychiatr* 68 Suppl 1:S38-41.
- Kumar R, Lozano AM, Kim YJ, Hutchison WD, Sime E, Halket E, Lang AE (1998) Double-blind evaluation of subthalamic nucleus deep brain stimulation in advanced Parkinson's disease. *Neurology* 51:850-855.
- Kunzle H (1977) Projections from the primary somatosensory cortex to basal ganglia and thalamus in the monkey. *Exp Brain Res* 30:481-492.
- Kunzle H (1978) An autoradiographic analysis of the efferent connections from premotor and adjacent prefrontal regions (areas 6 and 9) in macaca fascicularis. *Brain Behav Evol* 15:185-234.
- Labarre D, Meissner W, Boraud T (2008) Measure of the regularity of events in sthchastic point processes, Application to neuron activity analysis. In: International Conference on Acoustic, Speech and Signal Processing (ICASSP). Las Vegas (USA).
- Lacombe E, Khaindrava V, Melon C, Oueslati A, Kerkerian-Le Goff L, Salin P (2009) Different functional basal ganglia subcircuits associated with anti-akinetic and dyskinesigenic effects of antiparkinsonian therapies. *Neurobiol Dis* 36:116-125.
- Le Moine C, Bloch B (1996) Expression of the D3 dopamine receptor in peptidergic neurons of the nucleus accumbens: comparison with the D1 and D2 dopamine receptors. *Neuroscience* 73:131-143.
- Lei W, Jiao Y, Del Mar N, Reiner A (2004) Evidence for differential cortical input to direct pathway versus indirect pathway striatal projection neurons in rats. *J Neurosci*

- 24:8289-8299.
- Levy R, Hazrati LN, Herrero MT, Vila M, Hassani OK, Mouroux M, Ruberg M, Asensi H, Agid Y, Feger J, Obeso JA, Parent A, Hirsch EC (1997) Re-evaluation of the functional anatomy of the basal ganglia in normal and Parkinsonian states. *Neuroscience* 76:335-343.
- Levy R, Lang AE, Dostrovsky JO, Pahapill P, Romas J, Saint-Cyr J, Hutchison WD, Lozano AM (2001) Lidocaine and muscimol microinjections in subthalamic nucleus reverse Parkinsonian symptoms. *Brain* 124:2105-2118.
- Limousin P, Pollak P, Benazzouz A, Hoffmann D, Broussolle E, Perret JE, Benabid AL (1995) Bilateral subthalamic nucleus stimulation for severe Parkinson's disease. *Mov Disord* 10:672-674.
- Limousin P, Pollak P, Benazzouz A, Hoffmann D, Le Bas JF, Broussolle E, Perret JE, Benabid AL (1995) Effect of parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation. *Lancet* 345:91-95.
- Limousin P, Krack P, Pollak P, Benazzouz A, Ardouin C, Hoffmann D, Benabid AL (1998) Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med* 339:1105-1111.
- Lisman JE (1997) Bursts as a unit of neural information: making unreliable synapses reliable. *Trends Neurosci* 20:38-43.
- Lundberg JM, Rudehill A, Sollevi A, Theodorsson-Norheim E, Hamberger B (1986) Frequency- and reserpine-dependent chemical coding of sympathetic transmission: differential release of noradrenaline and neuropeptide Y from pig spleen. *Neurosci Lett* 63:96-100.
- MacGibbon GA, Lawlor PA, Bravo R, Dragunow M (1994) Clozapine and haloperidol produce a differential pattern of immediate early gene expression in rat caudate-putamen, nucleus accumbens, lateral septum and islands of Calleja. *Brain Res Mol Brain Res* 23:21-32.
- Magill PJ, Bolam JP, Bevan MD (2001) Dopamine regulates the impact of the cerebral cortex on the subthalamic nucleus-globus pallidus network. *Neuroscience* 106:313-330.
- Mallet N, Le Moine C, Charpier S, Gonon F (2005) Feedforward inhibition of projection neurons by fast-spiking GABA interneurons in the rat striatum in vivo. *J Neurosci* 25:3857-3869.

- Mallet N, Ballion B, Le Moine C, Gonon F (2006) Cortical inputs and GABA interneurons imbalance projection neurons in the striatum of parkinsonian rats. *J Neurosci* 26:3875-3884.
- Mallet N, Pogosyan A, Sharott A, Csicsvari J, Bolam JP, Brown P, Magill PJ (2008) Disrupted dopamine transmission and the emergence of exaggerated beta oscillations in subthalamic nucleus and cerebral cortex. *J Neurosci* 28:4795-4806.
- Mansour A, Meador-Woodruff JH, Zhou Q, Civelli O, Akil H, Watson SJ (1992) A comparison of D1 receptor binding and mRNA in rat brain using receptor autoradiographic and in situ hybridization techniques. *Neuroscience* 46:959-971.
- Marsden CD, Obeso JA (1994) The functions of the basal ganglia and the paradox of stereotaxic surgery in Parkinson's disease. *Brain* 117 (Pt 4):877-897.
- Marshall JF, Henry BL, Billings LM, Hoover BR (2001) The role of the globus pallidus D2 subfamily of dopamine receptors in pallidal immediate early gene expression. *Neuroscience* 105:365-378.
- Martin MW, Scott AW, Johnston DE, Jr., Griffin S, Luedtke RR (2001) Typical antipsychotics exhibit inverse agonist activity at rat dopamine D1-like receptors expressed in Sf9 cells. *Eur J Pharmacol* 420:73-82.
- Martres MP, Sales N, Bouthenet ML, Schwartz JC (1985) Localisation and pharmacological characterisation of D-2 dopamine receptors in rat cerebral neocortex and cerebellum using [¹²⁵I]iodosulpride. *Eur J Pharmacol* 118:211-219.
- McCormick DA, Contreras D (2001) On the cellular and network bases of epileptic seizures. *Annu Rev Physiol* 63:815-846.
- Meibach RC, Katzman R (1979) Catecholaminergic innervation of the subthalamic nucleus: evidence for a rostral continuation of the A9 (substantia nigra) dopaminergic cell group. *Brain Res* 173:364-368.
- Meissner W, Leblois A, Hansel D, Bioulac B, Gross CE, Benazzouz A, Borraud T (2005) Subthalamic high frequency stimulation resets subthalamic firing and reduces abnormal oscillations. *Brain* 128:2372-2382.
- Meltzer HY, Park S, Kessler R (1999) Cognition, schizophrenia, and the atypical antipsychotic drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13591-13593.
- Millan MJ, Gobert A, Audinot V, Dekeyne A, Newman-Tancredi A (1999) Inverse agonists and serotonergic transmission: from recombinant, human serotonin (5-HT)_{1B} receptors to G-protein coupling and function in corticolimbic structures in vivo. *Neuropsychopharmacology* 21:61S-67S.

- Milligan G, Bond RA, Lee M (1995) Inverse agonism: pharmacological curiosity or potential therapeutic strategy? *Trends Pharmacol Sci* 16:10-13.
- Milligan G, Bond RA (1997) Inverse agonism and the regulation of receptor number. *Trends Pharmacol Sci* 18:468-474.
- Mintz M, Herberg LJ (1986) Endogenous dopaminergic asymmetry affects development of seizures kindled in the rat amygdala. *Exp Neurol* 93:253-260.
- Mitchell IJ, Clarke CE, Boyce S, Robertson RG, Peggs D, Sambrook MA, Crossman AR (1989) Neural mechanisms underlying parkinsonian symptoms based upon regional uptake of 2-deoxyglucose in monkeys exposed to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neuroscience* 32:213-226.
- Moghaddam B, Bunney BS (1990) Acute effects of typical and atypical antipsychotic drugs on the release of dopamine from prefrontal cortex, nucleus accumbens, and striatum of the rat: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem* 54:1755-1760.
- Monakow KH, Akert K, Kunzle H (1978) Projections of the precentral motor cortex and other cortical areas of the frontal lobe to the subthalamic nucleus in the monkey. *Exp Brain Res* 33:395-403.
- Monod J, Wyman J, Changeux JP (1965) On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J Mol Biol* 12:88-118.
- Moore SJ, Cooper DC, Spruston N (2009) Plasticity of burst firing induced by synergistic activation of metabotropic glutamate and acetylcholine receptors. *Neuron* 61:287-300.
- Morgan JI, Cohen DR, Hempstead JL, Curran T (1987) Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science* 237:192-197.
- Morgan JI, Curran T (1989) Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends Neurosci* 12:459-462.
- Morisset S, Rouleau A, Ligneau X, Gbahou F, Tardivel-Lacombe J, Stark H, Schunack W, Ganellin CR, Schwartz JC, Arrang JM (2000) High constitutive activity of native H3 receptors regulates histamine neurons in brain. *Nature* 408:860-864.
- Moro E, Scerrati M, Romito LM, Roselli R, Tonali P, Albanese A (1999) Chronic subthalamic nucleus stimulation reduces medication requirements in Parkinson's disease. *Neurology* 53:85-90.
- Mouroux M, Hassani OK, Feger J (1995) Electrophysiological study of the excitatory parafascicular projection to the subthalamic nucleus and evidence for ipsi- and contralateral controls. *Neuroscience* 67:399-407.

- Mukherjee J, Christian BT, Narayanan TK, Shi B, Mantil J (2001) Evaluation of dopamine D-2 receptor occupancy by clozapine, risperidone, and haloperidol in vivo in the rodent and nonhuman primate brain using ¹⁸F-fallypride. *Neuropsychopharmacology* 25:476-488.
- Murer MG, Riquelme LA, Tseng KY, Pazo JH (1997) Substantia nigra pars reticulata single unit activity in normal and 6OHDA-lesioned rats: effects of intrastriatal apomorphine and subthalamic lesions. *Synapse* 27:278-293.
- Nadjar A, Brotchie JM, Guigoni C, Li Q, Zhou SB, Wang GJ, Ravenscroft P, Georges F, Crossman AR, Bezard E (2006) Phenotype of striatofugal medium spiny neurons in parkinsonian and dyskinetic nonhuman primates: a call for a reappraisal of the functional organization of the basal ganglia. *J Neurosci* 26:8653-8661.
- Nambu A, Takada M, Inase M, Tokuno H (1996) Dual somatotopical representations in the primate subthalamic nucleus: evidence for ordered but reversed body-map transformations from the primary motor cortex and the supplementary motor area. *J Neurosci* 16:2671-2683.
- Nambu A, Tokuno H, Inase M, Takada M (1997) Corticosubthalamic input zones from forelimb representations of the dorsal and ventral divisions of the premotor cortex in the macaque monkey: comparison with the input zones from the primary motor cortex and the supplementary motor area. *Neurosci Lett* 239:13-16.
- Nambu A, Tokuno H, Takada M (2002) Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal 'hyperdirect' pathway. *Neurosci Res* 43:111-117.
- Neer EJ (1995) Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80:249-257.
- Nguyen TV, Kosofsky BE, Birnbaum R, Cohen BM, Hyman SE (1992) Differential expression of c-fos and zif268 in rat striatum after haloperidol, clozapine, and amphetamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4270-4274.
- Ni Z, Bouali-Benazzouz R, Gao D, Benabid AL, Benazzouz A (2000) Changes in the firing pattern of globus pallidus neurons after the degeneration of nigrostriatal pathway are mediated by the subthalamic nucleus in the rat. *Eur J Neurosci* 12:4338-4344.
- Ni ZG, Bouali-Benazzouz R, Gao DM, Benabid AL, Benazzouz A (2001) Time-course of changes in firing rates and firing patterns of subthalamic nucleus neuronal activity after 6-OHDA-induced dopamine depletion in rats. *Brain Res* 899:142-147.

- Ni Z, Bouali-Benazzouz R, Gao D, Benabid AL, Benazzouz A (2001) Intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine induces changes in the firing rate and pattern of subthalamic nucleus neurons in the rat. *Synapse* 40:145-153.
- Nicola SM, Surmeier J, Malenka RC (2000) Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu Rev Neurosci* 23:185-215.
- Nieoullon A, Scarfone E, Kerkerian L, Errami M, Dusticier N (1985) Changes in choline acetyltransferase, glutamic acid decarboxylase, high-affinity glutamate uptake and dopaminergic activity induced by kainic acid lesion of the thalamostriatal neurons. *Neurosci Lett* 58:299-304.
- Norcross K, Spehlmann R (1978) A quantitative analysis of the excitatory and depressant effects of dopamine on the firing of caudatal neurons: electrophysiological support for the existence of two distinct dopamine-sensitive receptors. *Brain Res* 156:168-174.
- O'Dowd BF (1993) Structures of dopamine receptors. *J Neurochem* 60:804-816.
- Oertel WH, Mugnaini E (1984) Immunocytochemical studies of GABAergic neurons in rat basal ganglia and their relations to other neuronal systems. *Neurosci Lett* 47:233-238.
- Olanow CW, Watts RL, Koller WC (2001) An algorithm (decision tree) for the management of Parkinson's disease (2001): treatment guidelines. *Neurology* 56:S1-S88.
- Olsson M, Nikkhah G, Bentlage C, Bjorklund A (1995) Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *J Neurosci* 15:3863-3875.
- Ossowska K, Smialowska M, Wolfarth S (1983) A biphasic influence of globus pallidus lesions: spontaneous catalepsy followed by anticataleptic effect. *Pharmacol Biochem Behav* 19:169-176.
- Palombo E, Porrino LJ, Bankiewicz KS, Crane AM, Sokoloff L, Kopin IJ (1990) Local cerebral glucose utilization in monkeys with hemiparkinsonism induced by intracarotid infusion of the neurotoxin MPTP. *J Neurosci* 10:860-869.
- Pan HS, Walters JR (1988) Unilateral lesion of the nigrostriatal pathway decreases the firing rate and alters the firing pattern of globus pallidus neurons in the rat. *Synapse* 2:650-656.
- Parent M, Toussaint C (1983) Flupenthixol versus haloperidol in acute psychosis. *Pharmatherapeutica* 3:354-364.
- Parent A, Smith Y (1987) Organization of efferent projections of the subthalamic nucleus in the squirrel monkey as revealed by retrograde labeling methods. *Brain Res* 436:296-310.

- Parent A, Hazrati LN (1995) Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Brain Res Rev* 20:128-154.
- Parent A, Hazrati LN (1995) Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev* 20:91-127.
- Parent A, Cicchetti F (1998) The current model of basal ganglia organization under scrutiny. *Mov Disord* 13:199-202.
- Paxinos G, Watson C (1996) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press.
- Percheron G, Filion M, Tremblay L, Fenelon G, Francois C, Yelnik J (1993) The role of the medial pallidum in the pathophysiology of akinesia in primates. *Adv Neurol* 60:84-87.
- Perier C, Vila M, Feger J, Agid Y, Hirsch EC (2000) Functional activity of zona incerta neurons is altered after nigrostriatal denervation in hemiparkinsonian rats. *Exp Neurol* 162:215-224.
- Pitts SM, Horvitz JC (2000) Similar effects of D(1)/D(2) receptor blockade on feeding and locomotor behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 65:433-438.
- Pollak P, Benabid AL, Gross C, Gao DM, Laurent A, Benazzouz A, Hoffmann D, Gentil M, Perret J (1993) [Effects of the stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson disease]. *Rev Neurol (Paris)* 149:175-176.
- Pollak P, Benabid AL, Limousin P, Benazzouz A, Hoffmann D, Le Bas JF, Perret J (1996) Subthalamic nucleus stimulation alleviates akinesia and rigidity in parkinsonian patients. *Adv Neurol* 69:591-594.
- Reimold M, Solbach C, Noda S, Schaefer JE, Bartels M, Beneke M, Machulla HJ, Bares R, Glaser T, Wormstall H (2007) Occupancy of dopamine D(1), D (2) and serotonin (2A) receptors in schizophrenic patients treated with flupentixol in comparison with risperidone and haloperidol. *Psychopharmacology (Berl)* 190:241-249.
- Ren Q, Kurose H, Lefkowitz RJ, Cotecchia S (1993) Constitutively active mutants of the alpha 2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 268:16483-16487.
- Richelson E (1984) Neuroleptic affinities for human brain receptors and their use in predicting adverse effects. *J Clin Psychiatry* 45:331-336.
- Riederer P, Wuketich S (1976) Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis. *J Neural Transm* 38:277-301.

- Rinvik E, Ottersen OP (1993) Terminals of subthalamonigral fibres are enriched with glutamate-like immunoreactivity: an electron microscopic, immunogold analysis in the cat. *J Chem Neuroanat* 6:19-30.
- Robertson GS, Fibiger HC (1992) Neuroleptics increase c-fos expression in the forebrain: contrasting effects of haloperidol and clozapine. *Neuroscience* 46:315-328.
- Robledo P, Feger J (1990) Excitatory influence of rat subthalamic nucleus to substantia nigra pars reticulata and the pallidal complex: electrophysiological data. *Brain Res* 518:47-54.
- Robledo P, Feger J (1991) Acute monoaminergic depletion in the rat potentiates the excitatory effect of the subthalamic nucleus in the substantia nigra pars reticulata but not in the pallidal complex. *J Neural Transm Gen Sect* 86:115-126.
- Rouzaire-Dubois B, Scarnati E (1987) Pharmacological study of the cortical-induced excitation of subthalamic nucleus neurons in the rat: evidence for amino acids as putative neurotransmitters. *Neuroscience* 21:429-440.
- Rouzaire-Dubois B, Scarnati E (1987) Increase in glutamate sensitivity of subthalamic nucleus neurons following bilateral decortication: a microiontophoretic study in the rat. *Brain Res* 403:366-370.
- Ruskin DN, Marshall JF (1995) D1 dopamine receptors influence Fos immunoreactivity in the globus pallidus and subthalamic nucleus of intact and nigrostriatal-lesioned rats. *Brain Res* 703:156-164.
- Ruskin DN, Marshall JF (1997) Differing influences of dopamine agonists and antagonists on Fos expression in identified populations of globus pallidus neurons. *Neuroscience* 81:79-92.
- Rusmann H, Ghika J, Combremont P, Villemure JG, Bogousslavsky J, Burkhard PR, Vingerhoets FJ (2004) L-dopa-induced dyskinesia improvement after STN-DBS depends upon medication reduction. *Neurology* 63:153-155.
- Ryan LJ, Clark KB (1992) Alteration of neuronal responses in the subthalamic nucleus following globus pallidus and neostriatal lesions in rats. *Brain Res Bull* 29:319-327.
- Ryan LJ, Sanders DJ, Clark KB (1992) Auto- and cross-correlation analysis of subthalamic nucleus neuronal activity in neostriatal- and globus pallidal-lesioned rats. *Brain Res* 583:253-261.

- Sadikot AF, Parent A, Smith Y, Bolam JP (1992) Efferent connections of the centromedian and parafascicular thalamic nuclei in the squirrel monkey: a light and electron microscopic study of the thalamostriatal projection in relation to striatal heterogeneity. *J Comp Neurol* 320:228-242.
- Samama P, Cotecchia S, Costa T, Lefkowitz RJ (1993) A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem* 268:4625-4636.
- Sanberg PR, Pevsner J, Coyle JT (1984) Parametric influences on catalepsy. *Psychopharmacology (Berl)* 82:406-408.
- Saper CB, Loewy AD (1982) Projections of the pedunclopontine tegmental nucleus in the rat: evidence for additional extrapyramidal circuitry. *Brain Res* 252:367-372.
- Sato F, Lavallee P, Levesque M, Parent A (2000) Single-axon tracing study of neurons of the external segment of the globus pallidus in primate. *J Comp Neurol* 417:17-31.
- Savasta M, Dubois A, Benavides J, Scatton B (1986) Different neuronal location of [3H]SCH 23390 binding sites in pars reticulata and pars compacta of the substantia nigra in the rat. *Neurosci Lett* 72:265-271.
- Savasta M, Dubois A, Scatton B (1986) Autoradiographic localization of D1 dopamine receptors in the rat brain with [3H]SCH 23390. *Brain Res* 375:291-301.
- Scatton B, Lehmann J (1982) N-methyl-C-aspartate-type receptors mediate striatal 3H-acetylcholine release evoked by excitatory amino acids. *Nature* 297:422-424.
- Scatton B, Rouquier L, Javoy-Agid F, Agid Y (1982) Dopamine deficiency in the cerebral cortex in Parkinson disease. *Neurology* 32:1039-1040.
- Seeman P, Van Tol HH (1994) Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 15:264-270.
- Sheng M, Greenberg ME (1990) The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4:477-485.
- Sim LJ, Selley DE, Childers SR (1995) In vitro autoradiography of receptor-activated G proteins in rat brain by agonist-stimulated guanylyl 5'-[gamma-[35S]thio]-triphosphate binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7242-7246.
- Sim LJ, Hampson RE, Deadwyler SA, Childers SR (1996) Effects of chronic treatment with delta9-tetrahydrocannabinol on cannabinoid-stimulated [35S]GTPgammaS autoradiography in rat brain. *J Neurosci* 16:8057-8066.
- Smith Y, Parent A, Seguela P, Descarries L (1987) Distribution of GABA-immunoreactive neurons in the basal ganglia of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *J Comp Neurol*

- 259:50-64.
- Smith Y, Parent A (1988) Neurons of the subthalamic nucleus in primates display glutamate but not GABA immunoreactivity. *Brain Res* 453:353-356.
- Smith Y, Bolam JP (1989) Neurons of the substantia nigra reticulata receive a dense GABA-containing input from the globus pallidus in the rat. *Brain Res* 493:160-167.
- Smith Y, Bolam JP (1990) The output neurones and the dopaminergic neurones of the substantia nigra receive a GABA-containing input from the globus pallidus in the rat. *J Comp Neurol* 296:47-64.
- Smith Y, Bolam JP, Von Krosigk M (1990) Topographical and Synaptic Organization of the GABA-Containing Pallidosubthalamic Projection in the Rat. *Eur J Neurosci* 2:500-511.
- Smith Y, Shink E, Sidibe M (1998) Neuronal circuitry and synaptic connectivity of the basal ganglia. *Neurosurg Clin N Am* 9:203-222.
- Smith Y, Kieval JZ (2000) Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 23:S28-33.
- Smith Y, Villalba R (2008) Striatal and extrastriatal dopamine in the basal ganglia: an overview of its anatomical organization in normal and Parkinsonian brains. *Mov Disord* 23 Suppl 3:S534-547.
- Stoessl AJ, Rajakumar N (1996) Effects of subthalamic nucleus lesions in a putative model of tardive dyskinesia in the rat. *Synapse* 24:256-261.
- Strazielle C, Kremarik P, Gherzi-Egea JF, Lalonde R (1998) Regional brain variations of cytochrome oxidase activity and motor coordination in Lurcher mutant mice. *Exp Brain Res* 121:35-45.
- Sugimoto T, Hattori T (1983) Confirmation of thalamosubthalamic projections by electron microscopic autoradiography. *Brain Res* 267:335-339.
- Sugimoto T, Hattori T, Mizuno N, Itoh K, Sato M (1983) Direct projections from the centre median-parafascicular complex to the subthalamic nucleus in the cat and rat. *J Comp Neurol* 214:209-216.
- Surmeier DJ, Kitai ST (1993) D1 and D2 dopamine receptor modulation of sodium and potassium currents in rat neostriatal neurons. *Prog Brain Res* 99:309-324.
- Svenningsson P, Le Moine C (2002) Dopamine D1/5 receptor stimulation induces c-fos expression in the subthalamic nucleus: possible involvement of local D5 receptors. *Eur J Neurosci* 15:133-142.

- Tai CH, Boraud T, Bezard E, Bioulac B, Gross C, Benazzouz A (2003) Electrophysiological and metabolic evidence that high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus bridles neuronal activity in the subthalamic nucleus and the substantia nigra reticulata. *FASEB J* 17:1820-1830.
- Tepper JM, Koos T, Wilson CJ (2004) GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trends Neurosci* 27:662-669.
- Thomas DR, Faruq SA, Balcerek JM, Brown AM (1995) Pharmacological characterisation of [³⁵S]-GTPγS binding to Chinese hamster ovary cell membranes stably expressing cloned human 5-HT_{1D} receptor subtypes. *J Recept Signal Transduct Res* 15:199-211.
- Tiberi M, Caron MG (1994) High agonist-independent activity is a distinguishing feature of the dopamine D_{1B} receptor subtype. *J Biol Chem* 269:27925-27931.
- Tseng KY, Kargieman L, Gacio S, Riquelme LA, Murer MG (2005) Consequences of partial and severe dopaminergic lesion on basal ganglia oscillatory activity and akinesia. *Eur J Neurosci* 22:2579-2586.
- Tumova K, Iwasiow RM, Tiberi M (2003) Insight into the mechanism of dopamine D₁-like receptor activation. Evidence for a molecular interplay between the third extracellular loop and the cytoplasmic tail. *J Biol Chem* 278:8146-8153.
- Tumova K, Zhang D, Tiberi M (2004) Role of the fourth intracellular loop of D₁-like dopaminergic receptors in conferring subtype-specific signaling properties. *FEBS Lett* 576:461-467.
- van der Kooy D, Hattori T (1980) Dorsal raphe cells with collateral projections to the caudate-putamen and substantia nigra: a fluorescent retrograde double labeling study in the rat. *Brain Res* 186:1-7.
- Vila M, Levy R, Herrero MT, Faucheux B, Obeso JA, Agid Y, Hirsch EC (1996) Metabolic activity of the basal ganglia in parkinsonian syndromes in human and non-human primates: a cytochrome oxidase histochemistry study. *Neuroscience* 71:903-912.
- Vila M, Marin C, Ruberg M, Jimenez A, Raisman-Vozari R, Agid Y, Tolosa E, Hirsch EC (1999) Systemic administration of NMDA and AMPA receptor antagonists reverses the neurochemical changes induced by nigrostriatal denervation in basal ganglia. *J Neurochem* 73:344-352.

- Vila M, Perier C, Feger J, Yelnik J, Faucheux B, Ruberg M, Raisman-Vozari R, Agid Y, Hirsch EC (2000) Evolution of changes in neuronal activity in the subthalamic nucleus of rats with unilateral lesion of the substantia nigra assessed by metabolic and electrophysiological measurements. *Eur J Neurosci* 12:337-344.
- Vingerhoets FJ, Villemure JG, Temperli P, Pollo C, Pralong E, Ghika J (2002) Subthalamic DBS replaces levodopa in Parkinson's disease: two-year follow-up. *Neurology* 58:396-401.
- Walters JR, Roth RH (1976) Dopaminergic neurons: an in vivo system for measuring drug interactions with presynaptic receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 296:5-14.
- Wan W, Ennulat DJ, Cohen BM (1995) Acute administration of typical and atypical antipsychotic drugs induces distinctive patterns of Fos expression in the rat forebrain. *Brain Res* 688:95-104.
- Whittier JR (1947) Ballism and the subthalamic nucleus (hypothalamicus; corpus luyssi) review of the literature and study of 30 cases. *Arch Neurol Psychiatry* 58:672-692.
- Whittier JR, Mettler FA (1949) Studies on the subthalamus of the rhesus monkey; hyperkinesia and other physiologic effects of subthalamic lesions; with special reference to the subthalamic nucleus of Luys. *J Comp Neurol* 90:319-372.
- Wilson SA (1925) The Croonian lectures on some disorders of motility and muscle tone, with special reference to the corpus striatum. *Lancet* 209:53-62.
- Wilson CJ, Kawaguchi Y (1996) The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. *J Neurosci* 16:2397-2410.
- Wong-Riley MT (1989) Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci* 12:94-101.
- Wu YN, Hyland BI, Chen JJ (2007) Biomechanical and electromyogram characterization of neuroleptic-induced rigidity in the rat. *Neuroscience* 147:183-196.
- Youdim MB, Edmondson D, Tipton KF (2006) The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat Rev Neurosci* 7:295-309.
- Zigmond MJ, Abercrombie ED, Berger TW, Grace AA, Stricker EM (1990) Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications. *Trends Neurosci* 13:290-296.