

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2011

Thèse n° 1828

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologies, Santé

Option : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement le

30 septembre 2011

par

Claire Delaville

née le 29 décembre 1985 à Beauvais

Implication des systèmes monoaminergiques dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson : étude comportementale et électrophysiologique *in vivo*

Membres du Jury

| | | |
|--|---|--------------------|
| M ^f J.M. Cabelguen | Professeur des Universités, Bordeaux | Président |
| M ^{me} C. Courbon-Brefel | MCU-PH, Neurologue, Toulouse | Rapporteur |
| M ^f . D. Guehl | Professeur des Universités, Bordeaux | Examineur |
| M ^{me} . L. Kerkerian-Le Goff | Directeur de Recherche CNRS, Marseille | Rapporteur |
| M ^f . A. Benazzouz | Directeur de Recherche Inserm, Bordeaux | Directeur de thèse |

A mes parents,
mes frères et belles-sœurs,
mes neveux
mes amis.

L'ensemble de ces travaux à été réalisé au sein du laboratoire « Mouvement Adaptation Cognition » (CNRS UMR 5227) puis de « l'institut des maladies neurodégénératives » (CNRS UMR 5293) de l'université Victor Segalen Bordeaux 2. Je remercie donc les docteurs **Jean-René Cazalets** et **Erwan Bezard** pour m'avoir accueillie dans leurs laboratoires et m'avoir permis de travailler dans les meilleures conditions scientifiques.

Mes premiers remerciements vont bien entendu à mon Directeur de thèse, **Abdelhamid Benazzouz**, pour m'avoir supportée pendant ces 3 ans et demi. Un grand merci pour sa patience, sa bonne humeur et la confiance qu'il me porte. Merci d'avoir géré cette thèse avec patience et constance tout en me donnant la liberté et l'orientation nécessaires à mes réflexions.

Je tiens à remercier le Pr **Jean-Marie Cabelguen** qui me fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Merci aussi de m'avoir initiée à la recherche fondamentale sur la locomotion. Son encadrement et sa rigueur scientifique pendant mon master 1 m'ont confirmé dans mon choix de m'orienter vers la recherche.

Merci aux Drs. **Christine Courbon-Brefel** et **Lydia Kerkerien-Le Goff** pour avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteurs. Et merci également au Dr **Dominique Guehl** d'avoir consenti à juger cette thèse.

Je tiens également à remercier tous les membres passés et présents de la « basal ganglia team » : **Christian Gross**, **André Garenne**, **Liliana Garcia**, **Jérôme Baufreton**, **Anne Taupignon**, **Rachida Amari** et **Rinske Vlamming**s. Merci à **Martin Guthrie** pour tout le

travail de relecture de franglais qu'il a fait et merci à **François Gonon** d'avoir partagé avec moi un peu de son expérience en électrophysiologie.

Merci également à **Geneviève**, **Elisabeth** et **Jean-Marie** pour avoir pris soin du côté administratif, des commandes et des animaux. Et un grand merci à **Laura** d'avoir coupé une grande partie des cerveaux... Cela m'a été d'une aide précieuse!

Je tiens tout particulièrement à remercier **Philippe De Deurwaedère** pour toute son aide autant d'un point de vue expérimentale que pour la réflexion scientifique. Sa patience, ses conseils et remarques et ses questions pas toujours faciles à comprendre m'ont énormément aidée dans mon éveil scientifique.

Je souhaite remercier aussi toutes les personnes qui ont apporté énormément de bonne humeur et de rire dans « la rotule ».

Tout d'abord **Steve**, le japonais dans l'âme, et **Emilie S.** lors de leurs discussions irréelles du midi. Emilie, la squatteuse principale du fauteuil d'Hamid, quand tu veux pour une petite discussion avec toi-même en face de moi...

Merci aussi à **Sylvia** et **Bérangère**, mes ex-colocataires de bureau, pour nos discussions scientifiques entres autres ... Je tiens aussi a remercier Sylvia pour son aide en HPLC et microdialyse qui m'ont été d'une très grande utilité ! Mais aussi pour ses délires avec Steph et Emilie qui me font toujours rire... Sergei vous remercie d'ailleurs !

Je tiens aussi à remercier **Emilie F.** et **Mark**, mes nouveaux colocataires de bureau, pour toutes nos discussions et vos expressions « rigolotes »...

Bien entendu merci à tous les autres qui passent de temps en temps dans le bureau et avec qui on peut se relaxer aux pauses du midi et du soir : **Cristina**, **Julien**, **Nico**, **Quentin**, **Jean-Yves**, **Loïc**, **Léa**, **Camille**, ...

Aude et **Mélanie** les prochaines à passer, bon courage et surtout amusez-vous bien pendant le temps qui vous reste dans ce laboratoire !

Merci aussi aux étudiants qui m'ont appris bien plus que ce que je ne leur ai appris : **Khaled**, **Mariam**, **Clément**, **Jonathan Z.**, **Emilie F.**, **Omar** et **Safa**. Et je n'oublierai bien entendu pas **Babar** et **Pamphyle** ! J'espère ne pas vous avoir trop traumatisé et que vous ne garderez pas un mauvais souvenir de votre passage plus ou moins bref ici !

Last but not least, un grand MERCI à **Jonathan C.** et **Stéph** pour cette première année où vous m'avez tout appris ! Je garderai toujours en mémoire le premier jour et sa grille barbecue, les sous mains ridicules, le bubble tumble... Merci pour tous ses souvenirs !

Enfin, je terminerai par remercier l'ensemble de **ma famille** qui a toujours été là pour me soutenir et m'encourager même lorsque je ne n'arrêtais pas de râler. Merci aussi à **mes amis** pour nos week-ends et soirées mémorables qui permettent de décompresser et tout particulièrement **Maria** et **Aurore** pour nos discussions interminables sur tout et surtout sur rien !

Le travail effectué pendant cette thèse a permis la réalisation des communications suivantes :

Publications dans des revues à comité de lecture

Delaville C., De Deurwaerdère P. and Benazzouz A. *Noradrenaline and parkinson's disease.* *Frontiers in system neuroscience.* 2011 May 18.

Delaville C., Chetrit J., Abdallah K., Morin S., Cardoit L., De Deurwaerdère P. and Benazzouz A. *Involvement of monoamine deficiency in motor and nonmotor disabilities of Parkinson's disease: behavioural, biochemical and electrophysiological studies.* *Neurobiology of Aging.* En revision

Delaville C., Zapata J., Cardoit L., De Deurwaerdère P. and Benazzouz A. *Noradrenergic control of the subthalamic nucleus and motor behavior.* *Journal of neurosciences.* En revision.

Delaville C., Navailles S., Benazzouz A. *Effects of noradrénaline and serotonin depletions on the electrical activity of globus pallidus and substantia nigra reticulata neurons in the context of parkinsonism.* Soumis.

Chetrit J., **Delaville C.**, Aristieta A., Morin S., Benazzouz A. *Acute versus chronic treatment with Haloperidol : neuronal correlates in the subthalamic nucleus.* Soumis

Abedi M.P., **Delaville C.**, De Deurwaerdère P., Benjelloun W. and Benazzouz A. *Intrapallidal injection of 6-OHDA induced motor impairment and changes in the neuronal activity of the subthalamic nucleus and substantia nigra pars reticulata in the rat.* En préparation.

Sabbar M., **Delaville C.**, De Deurwaerdère P., Benazzouz A. and Lakhdar-Ghazal N. *Lead acetate induced motor and non-motor disabilities associated with a change in the firing pattern of subthalamic nucleus neurons.* En préparation.

Retailleau A., **Delaville C.**, De Deurwaerdère P., Abrous N., Leinekugel X., Benazzouz A. *Involvement of dopamine deficiency in memory disorders: behavioral, biochemical and electrophysiological studies in 6-hydroxydopamine rat model of parkinsonism.* En préparation.

Khalki H., **Delaville C.**, Milan L., De Deurwaerdère P. Navailles S. *Effect of L-Dopa on serotonergic neurons: an electrophysiological and neurochemical study.* En préparation.

Janssen M.L.F., Visser-Vandewalle V., Zwartjes D.G.M., **Delaville C.**, Temel Y., Benazzouz A. *The motor, limbic and associative cortico-subthalamic pathways are not fully segregated in the rat.* En préparation.

Communications affichées

Delaville C., Chetrit J., Morin S., Cardoit L., De Deurwaerdère P. and Benazzouz A. *Effects of noradrenaline depletion in intact and 6-hydroxydopamine-lesioned rats: behavioural and electrophysiological studies.* 9^{ème} colloque de la société de neurosciences française des neurosciences, 26-29th May, 2009, Bordeaux, France

Delaville C., Chetrit J., Morin S., Cardoit L., De Deurwaerdère P. and Benazzouz A. *Effects of noradrenaline depletion in intact and 6-hydroxydopamine-lesioned rats: behavioural and electrophysiological studies.* 3rd Mediterranean Conference of Neuroscience, 13-16th December, 2009, Alexandrie, Egypt.

Delaville C., Chetrit J., Abdallah K., Morin S., Cardoit L., De Deurwaerdère P. and Benazzouz A. *Involvement of monoamine deficiency in motor and non motor disabilities of Parkinson's disease: behavioural, biochemical and electrophysiological studies.* Journée IFR neurosciences, 15 Avril 2010, Bordeaux, France.

Delaville C., Chetrit J., Abdallah K., Morin S., Cardoit L., De Deurwaerdère P. and Benazzouz A. *Involvement of monoamine deficiency in motor and non motor disabilities of Parkinson's disease: behavioural, biochemical and electrophysiological studies.* Journée de l'école doctorale, 28 Avril 2010, Bordeaux, France.

Delaville C., Chetrit J., Abdallah K., Morin S., Cardoit L., De Deurwaerdère P. and Benazzouz A. *Involvement of monoamine deficiency in motor and non motor disabilities of Parkinson's disease: behavioural, biochemical and electrophysiological studies.* International Basal Ganglia Society, 20-24th June 2010, Long Branch, NJ, USA.

Retailleau A., Leinekugel X, **Delaville C.**, De Deurwaerdère P., Abrous N and Benazzouz A. *Involvement of dopamine deficiency in memory disorders: behavioral, biochemical and electrophysiological studies in 6-hydroxydopamine rat model of parkinsonism.* International Basal Ganglia Society, 20-24th June 2010, Long Branch, NJ, USA.

Delaville C., Chetrit J., Abdallah K., Morin S., Cardoit L., De Deurwaerdère P., Benazzouz A. *Involvement of monoamine deficiency in motor and non motor disabilities of Parkinson's disease: behavioural, biochemical and electrophysiological studies.* Federation of European Neuroscience Societies, 3-7th July, Amsterdam, The Netherlands.

Delaville C., Zapata J., Cardoit L., Benazzouz A. *Noradrenergic control of the subthalamic nucleus and motor behavior.* 10^{ème} colloque de la société de neurosciences française des neurosciences, 25-27th May, 2011, Bordeaux, France

Sabbar M., **Delaville C.**, De Deurwaerdère P., Benazzouz A. and Lakhdar-Ghazal N. *Behavioural, biochemical and electrophysiological consequences of lead exposure in the rat.* 10^{ème} colloque de la société de neurosciences française des neurosciences, 25-27th May, 2011, Marseille, France

Communications orales

Involvement of monoamine deficiency in motor and non motor disabilities of Parkinson's disease: behavioural, biochemical and electrophysiological studies. Club des ganglions de la base – club des mouvements anormaux, 25 et 26 Mars 2010, Grenoble, France.

Noradrenergic control of the subthalamic nucleus and motor behaviour. Club des ganglions de la base – club des mouvements anormaux, 23 et 24 Mai 2011, Marseille, France

Résumé

Depuis les années 60, la maladie de Parkinson est considérée comme une conséquence de la perte des neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta*. Cependant, dans les modèles animaux de cette pathologie, la perte dopaminergique seule ne reproduit pas de façon simultanée les symptômes moteurs et non moteurs observés chez les patients. De plus en plus d'études suggèrent l'implication des systèmes noradrénergique et sérotoninergique à la fois dans la manifestation des symptômes mais aussi dans les effets secondaires de la L-Dopa et de la stimulation à haute fréquence (SHF) du noyau sous thalamique (NST). Le travail de cette thèse s'inscrit dans ce champ de recherche visant une meilleure compréhension de la physiopathologie et la thérapie de la maladie de Parkinson.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au rôle respectif des trois monoamines dans la manifestation des symptômes moteurs et non moteurs ainsi que dans l'activité pathologique de trois structures majeures des ganglions de la base, le NST, la *pars reticulata* de la substance noire et le globus pallidus. L'ensemble de nos résultats démontre que la perturbation des trois systèmes monoaminergiques joue un rôle important à la fois dans la manifestation des troubles moteurs et non moteurs mais aussi dans l'induction de l'activité électrique pathologique des neurones au sein des ganglions de la base.

Dans un second temps, nous avons étudié l'efficacité des traitements antiparkinsoniens sur les troubles moteurs et non-moteurs induits par les différentes déplétions monoaminergiques. Nos résultats montrent que quand la déplétion dopaminergique est associée à la déplétion d'une autre monoamine la SHF du NST présente une efficacité moins importante que celle lors d'une déplétion en dopamine seule. Ceci permet d'expliquer le manque d'efficacité de ce traitement chez certains patients.

Enfin, comme peu d'études se sont intéressées au rôle de la noradrénaline dans la modulation de l'activité neuronale au sein des ganglions de la base, nous avons étudié les effets d'agents noradrénergiques injectés localement dans le NST sur le comportement moteur et sur l'activité électrique des neurones du NST. Nos résultats montrent que la modulation noradrénergique au niveau du NST ne dépendait pas de l'innervation dopaminergique au sein des ganglions de la base. De plus, nous avons pu mettre en évidence que les récepteurs alpha1 modulent la fréquence de décharge, tandis que les récepteurs alpha2 jouent un rôle important dans la genèse de l'activité en bouffée des neurones du NST ce qui pourrait être à l'origine des déficits moteurs.

Les résultats des travaux de cette thèse ont donc permis d'apporter de nouvelles évidences sur l'implication des trois systèmes monoaminergiques dans la physiopathologie des symptômes moteurs et non moteurs, dans l'activité pathologique des ganglions de la base ainsi que dans l'efficacité des traitements antiparkinsoniens. De plus, nous avons pu montrer que les récepteurs noradrénergiques alpha sont impliqués dans le contrôle de l'activité des neurones du NST et par conséquent dans le contrôle moteur.

Mots clés : maladie de Parkinson, dopamine, noradrénaline, sérotonine, noyau sous thalamique, ganglions de la base, électrophysiologie, comportement moteur et non moteur, biochimie.

Abstract

The loss of dopamine (DA) nigro-striatal neurons has been the pathophysiological focus of the devastating conditions of Parkinson's disease, but depletion of DA alone in animal models has failed to simultaneously elicit both the motor and non-motor deficits of PD. There is growing evidence that additional loss of locus coeruleus noradrenaline (NA) and dorsal raphe serotonin (5-HT) neurons in PD could be involved in the clinical expression of many of the observed deficits but also on the efficiency and on the side effects of antiparkinsonian treatments, L-Dopa and High Frequency Stimulation (HFS) of the subthalamic nucleus (STN).

First, we focused on the respective role of DA, NA and 5-HT systems on motor and non-motor deficits and on the pathological activity of three basal ganglia nuclei, STN, substantia nigra *pars reticulata* and globus pallidus. Results of the present study bring new insights into the combined roles of the three monoaminergic systems in the motor and non motor symptoms of PD and also into the pathological activity of basal ganglia nuclei.

Second, we studied the involvement of DA, NA and 5-HT depletions on the efficiency of L-Dopa and HFS of STN. Our results show that when DA depletion is combined with another monoamine depletion, STN HFS is less efficient compared to the situation when DA is depleted alone. These data provide a clear explanation on the lack of efficacy of this treatment in some operated parkinsonian patients.

Finally, as few studies focused on NAergic modulation of basal ganglia, we studied the effects of NAergic agents locally injected into the STN on motor behavior and also on STN neuronal activity. We show that alpha 1 NAergic receptors are implicated in the modulation of firing rate and that alpha 2 receptors play an important role in the emergence of burst activity, which could be at the origin of motor deficits.

Results of this thesis provide new evidences on the involvement of the three monoaminergic systems in motor and non motor symptoms and also in the efficiency of antiparkinsonian treatments. Moreover, we show that NAergic alpha receptors are implicated in the control of STN neuronal activity and consequently in the motor control.

Key Words : Parkinson's disease, dopamine, noradrenaline, serotonin, subthalamic nucleus, basal ganglia, electrophysiology, motor and non motor behavior, biochemistry.

❧ SOMMAIRE ❧

| | |
|--|----|
| Abréviations | 1 |
| Présentation générale..... | 2 |
| INTRODUCTION..... | 6 |
| I. Maladie de Parkinson | 6 |
| I.1. Généralités | 6 |
| I.2. Symptômes moteurs et non-moteurs..... | 7 |
| I.2.1. Symptômes moteurs..... | 7 |
| I.2.2. Symptômes non-moteurs | 8 |
| I.3. Traitements | 9 |
| I.3.1. Traitements pharmacologiques : | 9 |
| I.3.2. Traitement chirurgical : stimulation à haute fréquence du NST..... | 10 |
| II. Ganglions de la base | 11 |
| II.1. Organisation anatomo-fonctionnelle | 11 |
| II.2. Le noyau sous-thalamique : plaque tournante des ganglions de la base. | 14 |
| II.2.1. Considérations anatomiques du NST | 14 |
| II.2.2. Considérations fonctionnelles du NST | 16 |
| III. Système dopaminergique et Substance noire <i>pars compacta</i> | 18 |
| III.1. Généralités..... | 18 |
| III.1.1. Anatomie de la voie dopaminergique nigro-striée | 19 |
| III.1.2. Récepteurs dopaminergiques..... | 20 |
| III.2. Dopamine : rôles physiologiques et implications pathologiques | 20 |
| III.2.1. Rôles physiologiques et dérégulation de la SNc | 20 |
| III.2.2. SNc et maladie de Parkinson..... | 21 |
| IV. Système noradrénergique et Locus Cœruleus | 23 |
| IV.1. Généralités | 23 |
| IV.1.1. Anatomie du Locus Cœruleus..... | 23 |
| IV.1.2. Récepteurs noradrenergiques | 24 |

| | |
|---|-----------|
| IV.2. Noradréline : rôles physiologiques et implications pathologiques..... | 26 |
| IV.2.1. Rôles physiologiques et dérégulation du Locus Coeruleus | 26 |
| IV.2.2. Locus Coeruleus et maladie de Parkinson | 27 |
| V. Système sérotoninergique et Raphé Dorsal..... | 29 |
| V.1. Généralités..... | 29 |
| V.1.1. Anatomie du Raphé Dorsal | 30 |
| V.1.2. Récepteurs sérotoninergiques..... | 31 |
| V.2. Sérotonine : rôles physiologiques et implications pathologiques | 33 |
| V.2.1. Rôles physiologiques et dérégulation du Raphé Dorsal | 33 |
| V.2.2. Raphé Dorsal et maladie de Parkinson..... | 33 |
| VI. Interactions des trois systèmes monoaminergiques | 34 |
| VII. Objectifs généraux du projet de recherche..... | 36 |
| | |
| MATERIEL ET METHODES | 38 |
| | |
| I. Substances Pharmacologiques..... | 38 |
| II. Modèle d'étude | 40 |
| II.1. Nomination des différents groupes d'animaux utilisés et chronologie | 40 |
| II.1.1. Déplétions DAergiques, noradrénergiques et 5-HTergiques :..... | 40 |
| II.1.2. Modulation noradrénergique locale au niveau du NST:..... | 41 |
| II.2. Lésion du système DAergique : | 41 |
| II.2.1. Lésion DAergique unilatérale..... | 41 |
| II.2.2. Lésion DAergique bilatérale : | 43 |
| II.3. Lésion du système noradrénergique | 43 |
| II.4. Lésion du système 5-HTergique..... | 44 |
| II.5. Implantation de guides canules et d'électrodes de stimulation | 44 |
| II.5.1. Modulation noradrénergique locale au niveau du NST:..... | 44 |
| II.5.2. Stimulation à Haute Fréquence chez l'animal vigil..... | 45 |
| III. Electrophysiologie in vivo chez le rat anesthésié | 46 |
| III.1. Enregistrement extracellulaire unitaire : | 46 |
| III.1.1. Chirurgie : | 46 |
| III.1.2. Caractéristique des électrodes d'enregistrement : | 47 |
| III.2. Acquisition des signaux | 48 |

| | |
|--|---------------|
| III.2.1. Caractérisation de l'activité spontanée des neurones :..... | 48 |
| III.2.2. Modulation noradrénergique locale au niveau du NST : | 48 |
| III.3. Analyse de l'activité neuronale enregistrée : | 49 |
| III.4. Analyses statistiques : | 51 |
| III.4.1. Caractérisation de l'activité spontanée des neurones :..... | 51 |
| III.4.2. Modulation noradrénergique locale au niveau du NST : | 51 |
| IV. Etude comportementale | 52 |
| IV.1. Mesure de l'activité locomotrice..... | 52 |
| IV.1.1. Evaluation de l'activité motrice globale : Actimétrie | 52 |
| IV.1.2. Evaluation de l'asymétrie motrice : <i>Stepping test</i> | 54 |
| IV.1.3. Evaluation de la catalepsie : <i>Bar test</i> | 54 |
| IV.2. Mesure de l'anxiété et de la peur : <i>Elevated plus maze</i> | 55 |
| IV.3. Mesure des comportements dits « d'anhédonie et de dépression » : | 56 |
| IV.3.1. Test de la préférence au sucrose (anhédonie) : | 56 |
| IV.3.2. Test dit « de dépression » : Test de la nage forcée (FST) :..... | 57 |
| V. Histologie et immunohistochimie | 57 |
| V.1. Vérification des sites d'implantations et d'enregistrements | 57 |
| VI.2. Vérification de la lésion des neurones dopaminergiques de la SNc et des fibres dans le striatum..... | 59 |
| VI. Détermination biochimique des contenus tissulaires en monoamines | 60 |
| VI.1. Traitement du tissu :..... | 60 |
| VI.2. Analyse par HPLC des surnageants :..... | 61 |
| VI.3. Détection électrochimique : | 61 |
| VI.4. Analyses statistiques : | 62 |
| RESULTATS ET DISCUSSION..... | 63 |
| I-Impact des déplétions monoaminergiques sur les comportements moteurs et non- moteurs ainsi que sur l'activité des neurones du NST dans le contexte de la maladie de Parkinson | 63 |
| I.1. Résumé..... | 63 |
| I.2. Article 1: Emerging dysfunctions consequent to combined monoaminergic depletions in parkinsonism | 66 |

| | |
|--|------------|
| I.3. Article 2: Effects of noradrenaline and serotonin depletions on the electrical activity of globus pallidus and substantia nigra reticulata neurons in experimental parkinsonism | 103 |
| I.4. Conclusions et perspectives | 130 |
| II-Effets des traitements antiparkinsoniens sur les comportements moteurs et non-moteurs induits par les différentes déplétions monoaminergiques | 131 |
| II.1. Résumé | 131 |
| II.2. Article 3 : Effets des traitements antiparkinsoniens sur les comportements moteurs et non-moteurs induits par les différentes déplétions monoaminergiques | 134 |
| II.4. Conclusions et perspectives..... | 160 |
| III- Contrôle NAergique du NST et du comportement moteur in vivo chez le rat | 163 |
| III.1. Résumé | 163 |
| III.2. Article 5: Noradrenergic control of the subthalamic nucleus and motor behavior | 164 |
| III.3. Conclusions et perspectives | 188 |
| CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES | 191 |
| PUBLICATIONS ANNEXES | 195 |
| I. Revue: Noradrenaline and Parkinson's disease | 195 |
| II. Acute versus chronic treatment with Haloperidol : neuronal correlates in the subthalamic nucleus. submited..... | 208 |
| III. Articles en préparation | 228 |
| BIBLIOGRAPHIE | 229 |

Abréviations

5-HT : sérotonine

6-OHDA : 6-hydroxydopamine

ARs : récepteurs adrénergiques

DA : dopamine

DBH : dopamine beta hydroxylase

DCAA : decarboxylase d'acides aminés aromatiques

GABA : acide gamma amino butyrique

GPe : globus pallidus externe

GPi : globus pallidus interne

HPLC : chromatographie liquide à haute performance

i.p. : intra péritonéale

LC : locus cœruleus

L-Dopa : L-3,4-dihydroxyphénylalanine

MFB : faisceau médian du télencéphale (medial forebrain bundle)

MPTP : 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine

NA : noradrénaline

NST : noyau sous thalamique

RCPG : récepteurs couplés aux protéines G

RD : raphé dorsal

SHF : Stimulation à Haute Fréquence

SNc : substance noire pars compacta

SNr : substance noire pars reticulata

TH : tyrosine hydroxylase

PRESENTATION

GENERALE

Présentation générale

La maladie de Parkinson est, depuis les travaux originaux d'Ehringer et Hornykiewicz en 1960, considérée comme une maladie dopamino-dépendante. En effet, ils ont mis en évidence pour la première fois, et ce de façon directe, la déplétion sévère de dopamine (DA) au niveau du striatum chez les patients parkinsoniens. Ceci a défini la scène des champs de recherche sur le rôle de la DA dans la régulation de l'activité du striatum, ainsi que celle des autres structures des ganglions de la base, pour le demi-siècle qui suivit. La dégénérescence progressive des neurones DAergiques de la *pars compacta* de la substance noire (SNc) est ainsi devenue la caractéristique essentielle de la physiopathologie de la maladie de Parkinson.

Cependant, dans cette même étude, Ehringer et Hornykiewicz (Ehringer and Hornykiewicz, 1960) ont aussi montré une déplétion significative de la noradrénaline (NA), principalement issue du Locus Cœruleus (LC) (Chan-Palay, 1991, 1991; Chan-Palay and Asan, 1989), et de la sérotonine (5-HT), principalement issue du Raphé Dorsal (RD). En effet, d'autres études post-mortem chez des patients parkinsoniens ont mis en évidence une dégénérescence de plus de 80% des neurones NAergique (Bertrand *et al.*, 1997; Ehringer and Hornykiewicz, 1960, 1998; German *et al.*, 1992; Tohgi *et al.*, 1997; Zarow *et al.*, 2003) et de 40 à 70% des neurones 5-HTergiques (Halliday *et al.*, 1990; Kish, 2003; Kish *et al.*, 2008; Politis *et al.*, 2010). Le système NAergique central détiendrait un rôle important dans l'apparition de l'akinésie (Narabayashi, 1983), de phénomènes de blocage ou « freezing » (Mizuno *et al.*, 1994), de tremblements (Yamazaki *et al.*, 1979), mais aussi dans la manifestation des symptômes non moteurs de la maladie de parkinson telle que la dépression (Chan-Palay and Asan, 1989) et les troubles de la vigilance (Stern *et al.*, 1984). Le système 5-HTergique, quant à lui, est largement reconnu comme un facteur de développement de plusieurs pathologies telles que la dépression, les troubles du sommeil et les désordres

psychiatriques aussi observés chez les patients parkinsoniens (Halliday *et al.*, 1990; Jellinger, 1991; Murai *et al.*, 2001).

Des études anatomiques ont mis en évidence l'innervation des ganglions de la base par les trois systèmes monoaminergiques (DAergique, NAergique et 5-HTergique). Ces structures sous-corticales sont impliquées non seulement dans le contrôle moteur mais aussi dans les aspects cognitifs, émotionnels et motivationnels du comportement (Graybiel, 2005; Mink, 1996). Bien que complexe, le rôle que joue la DA sur la régulation des ganglions de la base a été largement étudié. Au cours des dix dernières années, un certain nombre de travaux ont mis en avant l'influence extrastriatale de la DA (Smith and Villalba, 2008) et la présence des récepteurs DAergiques au niveau des différentes structures des ganglions de la base (Smith and Kieval, 2000; Smith and Villalba, 2008). De plus, les applications locales d'agents DAergiques modulent l'activité électrophysiologique *in vitro* (Baufreton *et al.*, 2003; Baufreton *et al.*, 2005) et *in vivo* (Chetrit *et al.*, 2009; Hassani and Feger, 1999; Ni *et al.*, 2001) et altèrent les comportements moteurs (Parry *et al.*, 1994). Des études fonctionnelles ont clairement mis en évidence une influence du système NAergique issu du LC sur l'activité des neurones DAergiques de la voie nigro-striée (Jenner *et al.*, 1983; Ponzio *et al.*, 1981). L'innervation NAergique issue du LC est présente au sein des ganglions de la base et plus particulièrement au niveau du noyau sous-thalamique (NST) (Aston-Jones *et al.*, 2000; Burkhardt *et al.*, 2007; Canteras *et al.*, 1990; Jones and Moore, 1977; Jones and Yang, 1985). *In vitro*, la NA ainsi que les agonistes et les antagonistes des récepteurs NAergiques modulent l'activité électrique des neurones du NST (Arcos *et al.*, 2003; Belujon *et al.*, 2007). Ces agents, lorsqu'ils sont administrés de façon systémique *in vivo* chez le rat, influencent le comportement des animaux (Belujon *et al.*, 2007; Srinivasan and Schmidt, 2003) et modifient l'activité électrique des neurones du NST (Belujon *et al.*, 2007). Cependant aucune donnée comportementale ni électrophysiologique *in vivo* n'existe concernant la modulation directe

des récepteurs noradrénergiques au sein du NST. Le système 5-HTergique est aussi en forte interaction anatomo-fonctionnelle avec les systèmes DAergique et NAergique (Dailly *et al.*, 2006; Guiard *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2009). L'innervation 5-HTergique provenant du RD est abondamment présente dans les différentes structures des ganglions de la base (Lavoie and Parent, 1990). Bien qu'elle soit plus étudiée pour son implication dans les troubles cognitifs, notamment la dépression, de plus en plus d'études s'intéressent à son implication dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson et plus particulièrement dans l'apparition des symptômes tardifs comme les mouvements anormaux involontaires induits par le traitement chronique à la L-Dopa (Hollister *et al.*, 1979; Navailles *et al.*, 2010; Ng *et al.*, 1972; Tanaka *et al.*, 1999).

La L-Dopa ainsi que la stimulation à haute fréquence (SHF) du NST sont les deux traitements de référence de la maladie de Parkinson. Ce ne sont pas des traitements curatifs des processus neurodégénératifs à l'origine de la maladie, mais seulement des traitements symptomatiques soulageant essentiellement mais de façon très efficace les troubles moteurs de la maladie. La L-Dopa, en tant que précurseur de la DA, permet de compenser la déplétion DAergique dans le système nerveux central. Cependant, après quelques années de traitements une perte d'efficacité de la L-Dopa et l'apparition de mouvements anormaux involontaires sont observées. L'approche neurochirurgicale qui consiste en la SHF du NST permet une amélioration symptomatique stable dans le temps avec une réduction importante des effets secondaires des traitements médicamenteux grâce à la diminution de leur prise. Cependant, elle nécessite l'implantation d'appareils de stimulation, amenant un certain risque infectieux, et des réglages fréquents par une équipe entraînée. De plus, d'autres effets secondaires comme l'apparition de troubles compulsifs et l'augmentation de la dépression ont été mis en évidence sans que l'on puisse expliquer leurs origines.

En résumé, la maladie de Parkinson semble donc être une pathologie avec une affection des trois systèmes monoaminergiques et non une pathologie purement dopamino-dépendante. Mais l'impact de chaque déplétion monoaminergique sur les comportements moteurs et non moteurs ainsi que sur l'activité des neurones des différentes structures des ganglions de la base reste à élucider. L'efficacité ainsi que les effets secondaires induits par les traitements pharmacologiques et chirurgicaux utilisés chez les patients parkinsoniens dépendent-ils de ces différentes déplétions ?

Cette thèse s'inscrit dans ce champ de recherche visant une meilleure compréhension de la physiopathologie de la maladie de Parkinson en s'intéressant au rôle respectif des trois monoamines dans la manifestation des symptômes moteurs et non moteurs ainsi que dans l'activité pathologique de trois structures majeures des ganglions de la base, le NST, la *pars reticulata* de la substance noire (SNr) et la partie externe du globus pallidus (GPe). L'efficacité des traitements de la maladie de Parkinson par Stimulation à Haute Fréquence (SHF) et/ou à la L-Dopa sur les troubles moteurs et non-moteurs a été étudiée dans les différentes situations de déplétions monoaminergiques. Enfin, comme peu d'études se sont intéressées au rôle de la NA dans la modulation de l'activité neuronale au sein des ganglions de la base (Arcos *et al.*, 2003; Belujon *et al.*, 2007), nous avons étudié les effets d'agents noradrénergiques injectés localement dans le NST sur le comportement moteur et sur l'activité électrique des neurones du NST.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I. Maladie de Parkinson

I.1. Généralités

La maladie de Parkinson a été décrite pour la première fois en 1817 par le médecin anglais James Parkinson comme « paralysie agitante ». C'est une maladie neurodégénérative qui est considérée par la communauté scientifique comme principalement due à la dégénérescence des neurones DAergiques de la substance noire *pars compacta* (SNc). Cependant, toutes les voies DAergiques 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 la genèse des troubles cognitifs et certains aspects de l'akinésie (Javoy-Agid and Agid, 1980; Scatton *et al.*, 1982). Bien que l'atteinte du système DAergique soit considérée comme la cause principale de la maladie de Parkinson, de nombreux travaux neuroanatomiques ont démontré la dégénérescence des neurones noradrénergiques du Locus Cœruleus (LC) (Chan-Palay and Asan, 1989; Ehringer and Hornykiewicz, 1960; Greenfield and Bosanquet, 1953; Tretiakoff, 1919) et des neurones 5-HTergiques du Raphé Dorsal (RD) (Fahn *et al.*, 1971; Scatton *et al.*, 1983; Shannak *et al.*, 1994).

D'après la théorie de Braak et Del Tredici (2008), les centres monoaminergiques dégénéraient de façon caudo-rostrale dans la maladie de Parkinson. Ainsi, à une stade avancé de la maladie, on note une perte d'environ 75 % des corps cellulaires DAergiques de la SNc (Ehringer and Hornykiewicz, 1960), 80% des voies noradrénergiques du LC (Cash *et al.*, 1987), et d'environ 60% des voies 5-HTergiques du RD (Scatton *et al.*, 1983 ; Kish, 2003 ; 2008).

La dégénérescence cellulaire n'est jamais totale mais diverses études laissent à penser que le processus dégénératif est continu. Par exemple, dans la substance noire, la perte des neurones DAergiques est d'environ 1% par an, alors que chez le sujet normal, la

dégénérescence est deux fois moins rapide (Riederer and Wuketich, 1976; Scherman *et al.*, 1989).

I.2. Symptômes moteurs et non-moteurs

I.2.1. Symptômes moteurs

Les troubles moteurs associés à la maladie de Parkinson sont souvent qualifiés de symptômes cardinaux. Ils regroupent les quatre manifestations les plus courantes 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 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 et 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 incommodant, 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.

I.2.2. Symptômes 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 et sont généralement les plus handicapantes pour le patient. Ces complications regroupent des désordres cognitifs, psychiatriques, ainsi que des **troubles du système autonome**, de la **mémoire** et du **sommeil**.

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 les dégénérescences des voies DAergique, noradrénergique et/ou cholinergique semblent être impliquées (Apaydin *et al.*, 2002; Hurtig *et al.*, 2000). Parfois, les démences peuvent être accompagnées de **psychoses**, généralement caractérisées par des hallucinations visuelles (Goetz and Stebbins, 1995). La complication non motrice considérée comme la plus commune est sans nul doute la **dépression** (Burn, 2002; Olanow *et al.*, 2001). Les traitements utilisés pour les dépressions sont ceux couramment utilisés chez les dépressifs non parkinsoniens, tels que les inhibiteurs de la recapture de la 5-HT ou de la NA ou les antidépresseurs tricycliques (Burn, 2002; Richard *et al.*, 1997). Dans la maladie de Parkinson, il a aussi été montré que la modulation de l'interaction des systèmes noradrénergique et DAergique était impliquée dans les troubles dépressifs (Remy *et al.*, 2005).

Beaucoup de patients parkinsoniens présentent un sentiment **d'anxiété** accru. Il est généralement associé aux complications motrices, notamment lors de l'état « off » après traitement à la L-Dopa. Les trois systèmes monoaminergiques seraient impliqués dans ces manifestations bien que les mécanismes précis restent inconnus (Burn, 2002; Olanow *et al.*, 2001).

I.3. Traitements

La compréhension de la physiopathologie de la maladie de Parkinson et le développement des modèles animaux de la maladie de Parkinson ont permis de développer plusieurs stratégies thérapeutiques. Il n'existe cependant pas de traitement curatif des processus de neurodégénérescence à l'origine de la maladie, mais seulement des traitements symptomatiques soulageant essentiellement les troubles moteurs de la maladie. Deux types d'approches existent : une approche pharmacologique visant à compenser la déplétion DAergique dans le système nerveux central et une approche neurochirurgicale qui consiste en la stimulation électrique à haute fréquence de différents noyaux des ganglions de la base et plus particulièrement du NST.

I.3.1. Traitements pharmacologiques :

L'approche pharmacologique permet de compenser la déplétion DAergique dans le système nerveux central par différentes méthodes : i) la stimulation directe des récepteurs DAergiques (agonistes DAergiques), ii) la potentialisation de ces effets en inhibant la dégradation de la DA résiduelle (MAO B, inhibiteurs enzymatiques), iii) le rétablissement des taux de DA circulants (L-Dopa). Ce dernier est le traitement pharmacologique de référence. La L-Dopa, précurseur de la DA, est efficace à court et moyen terme sur la triade symptomatique motrice « tremblement-rigidité-akinésie ». Classiquement, on décrit trois étapes du traitement à la L-Dopa de la maladie de Parkinson. La première est appelée la **lune de miel**. C'est une période variant de 3 à 6 ans, qui se définit par une qualité de vie pratiquement normale. C'est la période de meilleure efficacité du traitement à la L-Dopa, pendant laquelle les symptômes sont améliorés de façon spectaculaire. Cette étape est suivie par des périodes de **fluctuations et de complications motrices** affectant 60% des patients. 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 «freezing ») sont également présents 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 (mouvements anormaux involontaires) sont mises en évidence, et inversement, lorsque le taux chute, des périodes d'akinésie et de bradykinésie apparaissent. 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 sensibles à la L-Dopa.

I.3.2. Traitement chirurgical : stimulation à haute fréquence du NST

La Stimulation à Haute Fréquence (SHF) du NST améliore l'ensemble des symptômes moteurs majeurs de la maladie de Parkinson (Benazzouz *et al.*, 1993; Limousin *et al.*, 1998; Limousin *et al.*, 1995). Cette amélioration de la fonction motrice permet une diminution importante de la dose de L-Dopa (de l'ordre de 50 à 80% de la dose journalière) et même, chez un bon nombre de patients, l'arrêt total des médicaments DAergiques (Moro and Albanese, 1999; Vingerhoets *et al.*, 2002).

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 dû à la réduction importante des effets secondaires induits par les traitements médicamenteux, la stimulation cérébrale profonde nécessite l'implantation d'appareils de stimulation, amenant un certain risque infectieux, et des réglages fréquents par une équipe entraînée. De plus, d'autres effets secondaires comme l'apparition de troubles compulsifs et l'augmentation de la dépression ont été mis en évidence (Temel *et al.*,

2005 ; Voon et al., 2008). Ces désavantages laissent donc tout naturellement la porte ouverte à la mise au point d'autres stratégies thérapeutiques.

II. Ganglions de la base

II.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 (cf. figure 1). L'activité de ces aires corticales est régulée par un ensemble de boucles cortico-sous-corticales où interviennent les ganglions de la base (Gerfen *et al.*, 1990).

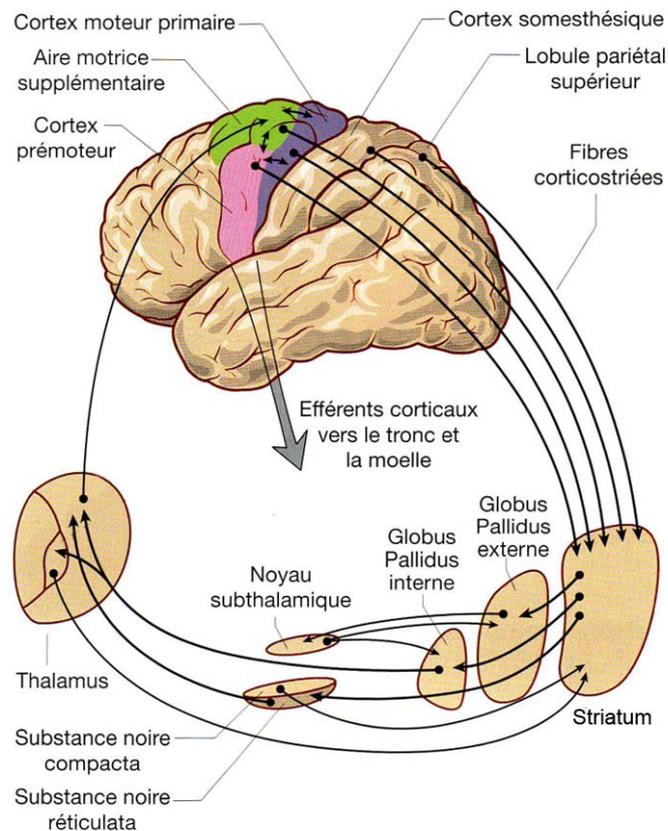


Figure 1 : Représentation schématique de la boucle cortico-sous-corticale du circuit moteur, faisant intervenir les ganglions de la base. (D'après Graybiel *et al.*, 1990)

D'après le modèle anatomo-fonctionnel classiquement admis des ganglions de la base (Albin *et al.*, 1989; Alexander and Crutcher, 1990; Alexander *et al.*, 1990), le striatum représente la structure d'entrée principale de l'information en provenance de plusieurs régions corticales. La substance noire réticulée (SNr) et le globus pallidus interne (GPi, équivalent du noyau entopédunculaire chez le rongeur) sont les structures de sortie, projetant principalement sur les noyaux moteurs 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 (Burkhardt *et al.*, 2007) (cf. figure 2). La voie directe a 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 and Smith, 1990). Les MSN projetant sur le GPe expriment quant à eux l'enképhaline (Gerfen *et al.*, 1990). L'activation de la voie directe faciliterait le mouvement en désinhibant les neurones thalamo-corticaux, alors que l'activation de la voie indirecte 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 DAergique striatale issue de la substance noire compacte (SNc). De plus une troisième voie hyperdirecte connectant le cortex directement au NST existe. Cette voie permet un contrôle rapide de l'activité des ganglions de la base via le NST

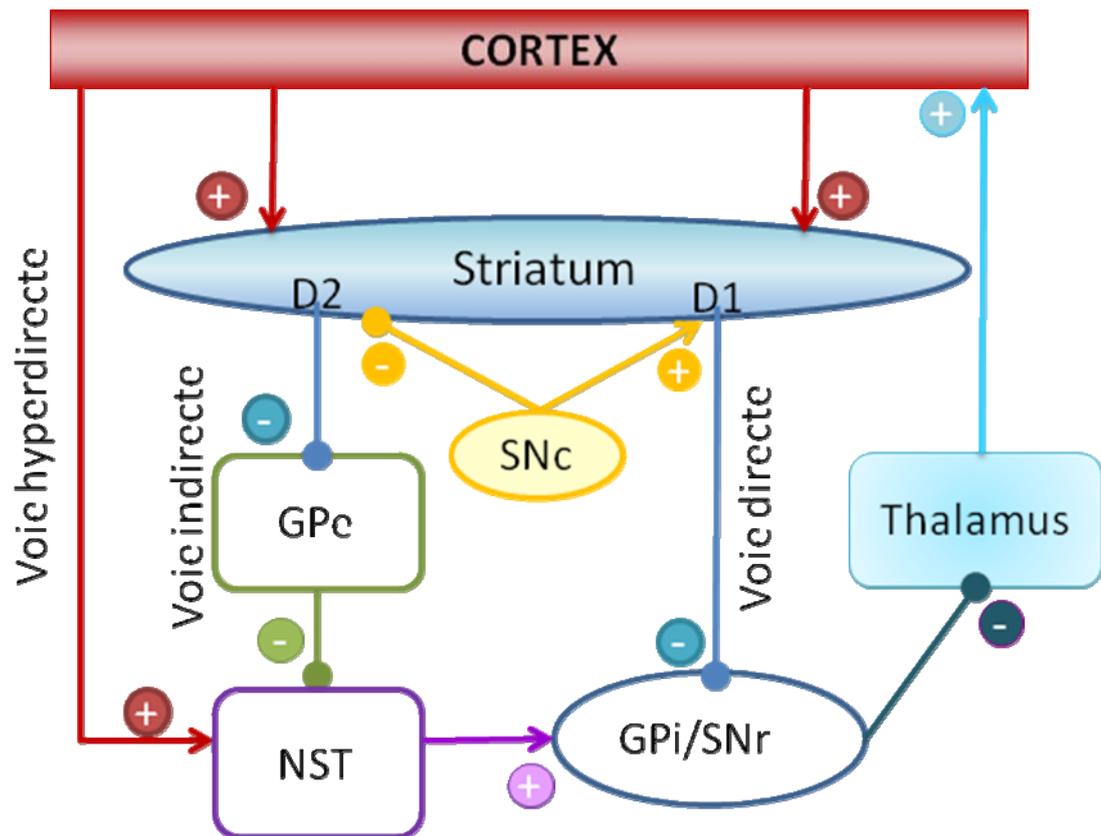


Figure 2 : Représentation schématique anatomo-fonctionnelle du circuit moteur impliquant le cortex, les ganglions de la base et le thalamus.

GPe et GPi (globus pallidus externe et interne) ; NST (noyau sous-thalamique) ; SNc et SNr (substance noire compacte et réticulée). Rond: inhibitions GABAergiques ; flèches: excitations glutamatergiques. D1 et D2 : récepteurs dopaminergiques D1 et D2. *D'après Albin et al.(1989).*

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

II.2.1. Considérations anatomiques du NST

Le NST est l'un des plus petits noyaux des ganglions de la base. 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.

Afférences

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 des projections importante en provenance des cortex oro-facial et pré-moteur (Afsharpour, 1985; Canteras *et al.*, 1990; Degos *et al.*, 2008; Kitai and Deniau, 1981) et du thalamus (Parent and Smith, 1987). De plus, il existe des projections massives du GPe qui innervent la quasi-totalité du NST (Parent and Hazrati, 1995). Ce sont les principales afférences GABAérgiques (Fonnum *et al.*, 1978; Oertel and Mugnaini, 1984; Smith and Parent, 1988; Smith *et al.*, 1987).

Le NST établit également un lien réciproque avec la SNc (Berendse and Groenewegen, 1990; Hassani *et al.*, 1997; Kita and Kitai, 1987; Mintz *et al.*, 1986). Cependant, il n'existe pas de claire organisation topographique de cette projection (Hassani *et al.*, 1997). En plus des projections mentionnées précédemment, d'autres régions innervent le NST chez le rongeur, comme le locus coeruleus (Canteras *et al.*, 1990; Pifl *et al.*, 1991) et le raphé dorsal (Wallman *et al.*, 2011) (cf. figure 3).

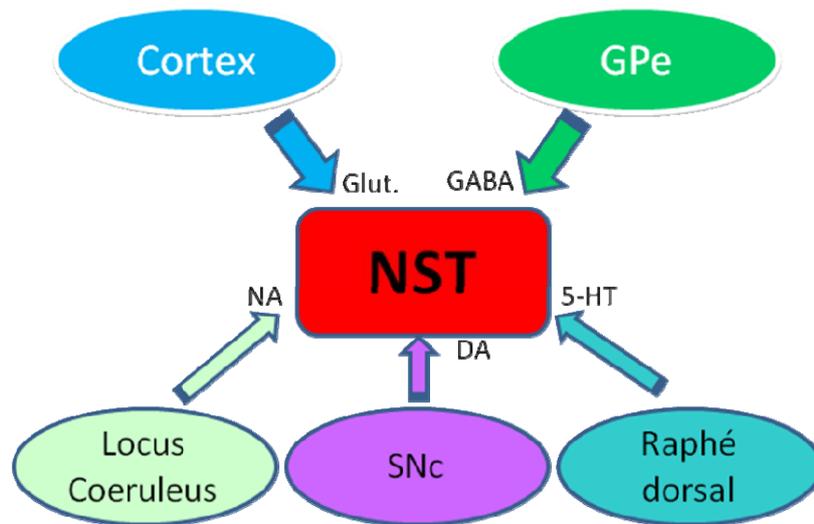


Figure 3 : Représentation schématique des afférences majeures et neuromodulatrices du NST, chez le rat. GPe : globus pallidus externe ; NST : noyau sous-thalamique ; SNc : substance noire *pars compacta* ; Glut : glutamate ; NA : noradrénaline ; DA : dopamine ; 5-HT : sérotonine.

Peu de données sont disponibles quant à l'impact de ces monoamines sur l'activité du NST. Cependant, le NST exprime des récepteurs DAergiques, noradrénergiques et 5-HTergiques pré-synaptiques et postsynaptiques, et des études électrophysiologiques *in vitro* ont montré qu'il existe une modulation par les trois monoamines de l'activité des neurones du NST (Arcos *et al.*, 2003; Baufreton *et al.*, 2005; Belujon *et al.*, 2007; Wallman *et al.*, 2011). Ainsi ces afférences dites mineures pourraient avoir une importance fonctionnelle à ne pas négliger.

Efférences

Le NST projette majoritairement sur les structures de sortie des ganglions de la base, la SNr et le GPI, mais il projette également sur le GPe (Smith *et al.*, 1998). Chez le rat, les neurones du NST présentent un grand nombre de collatérales (Hammond and Yelnik, 1983; Kita *et al.*, 1983; Van Der Kooy and Hattori, 1980). Des marquages intracellulaires (Hammond and Yelnik, 1983; Kita *et al.*, 1983), des données électrophysiologiques

(Hammond and Yelnik, 1983), et des marquages utilisant des transporteurs multimodaux (Bevan *et al.*, 1994; Bevan *et al.*, 1994; Bolam and Smith, 1992) 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 (Groenewegen and Berendse, 1990; Kita and Kitai, 1987; Mintz *et al.*, 1986), le noyau pédonculopontin (Hammond and Yelnik, 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 amène à conclure sur la position anatomique centrale que tient le NST au sein du réseau des ganglions de la base.

II.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 (Crossman *et al.*, 1984; Hammond *et al.*, 1979; Whittier, 1947; Whittier and Mettler, 1949).

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 DAergique de la voie nigro-striée. L'administration intra-cérébrale de 6-hydroxydopamine (6-OHDA) chez le rongeur ou l'administration systémique de 1-Méthyl-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 ganglions de la base. Les altérations les plus marquantes sont sans doute l'hyperactivité et l'augmentation de l'activité électrique en bouffée du NST et de ses cibles, tant au niveau électrophysiologique (Bergman *et al.*, 1994; Kreiss *et al.*, 1997; Ni *et al.*, 2001) que métabolique (Benazzouz *et al.*, 2004; Blandini *et al.*, 1997; Vila *et al.*, 1996; Vila *et al.*, 1999). D'après ces données, l'inhibition du NST devrait améliorer les symptômes cliniques de la maladie de Parkinson.

Afin d'éviter l'apparition d'effets non désirables et irréversibles, comme les mouvements anormaux involontaires décrits suite à la lésion du NST (Aziz *et al.*, 1991; Bergman *et al.*, 1990), Benazzouz *et al.* (1993) ont remplacé la lésion du NST par sa stimulation à haute fréquence. 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.*, 1991; Benabid *et al.*, 1987). L'akinésie et la rigidité sont abolies par la SHF du NST chez le singe rendu hémiparkinsonien par l'injection intra-carotidienne unilatérale de MPTP (Benazzouz *et al.*, 1996; Benazzouz *et al.*, 1993). Ces effets bénéfiques obtenus chez le modèle animal de la maladie de Parkinson ont conduit à proposer la SHF du NST comme traitement thérapeutique chez des patients parkinsoniens (Benabid *et al.*, 1994; Pollak, 1995). La SHF du NST unilatérale et bilatérale améliore de façon spectaculaire les principaux troubles moteurs de la maladie de Parkinson : l'akinésie, la rigidité, les troubles de la posture et même les tremblements de repos (Krack *et al.*, 2003, 2003; Limousin *et al.*, 1995; Limousin *et al.*, 1995; Pollak *et al.*, 1996).

D'un point de vue électrophysiologique, l'augmentation de la proportion des neurones capables de décharger en bouffées de potentiels d'action, également appelés « bursts », a été constatée (Bergman *et al.*, 1994; Hassani *et al.*, 1996; Ni *et al.*, 2001; Vila *et al.*, 2000). La signification physiopathologique de 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 à la même fréquence de décharge (Dutton and Dyball, 1979; Gonon, 1988; Lisman, 1997; Lundberg *et al.*, 1986). D'un point de vue fonctionnel, le mode de décharge en bouffées est plus « efficace » que le mode de décharge régulier (Bergman *et al.*, 1994).

III. Système dopaminergique et Substance noire *pars compacta*

III.1. Généralités

La DA 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 DA ont permis de distinguer 8 voies DAergiques dans le cerveau. Les quatre principales prennent naissance dans le mésencéphale (cf. figure 4). Il s'agit d'abord du faisceau DAergique associé au circuit de la récompense. Il est constitué par la **voie méso-limbique** qui a pour origine les neurones de l'aire tegmentale ventrale qui innervent plusieurs structures du système limbique dont le noyau accumbens. Cette voie est importante pour la mémoire et la motivation de nos comportements. **La voie méso-corticale** met aussi en jeu les neurones de l'aire tegmentale ventrale qui innervent 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...). **La voie tubéro-infundibulaire**, qui projette de l'hypothalamus à l'hypophyse, influence la sécrétion de certaines hormones comme la prolactine. Enfin, **la voie nigro-striée** projette de la substance noire vers le striatum (noyau caudé et putamen) mais aussi vers les autres structures des ganglions de la base, cette région est impliquée dans le contrôle moteur. La dégénérescence de ces neurones est associée aux symptômes moteurs de la maladie de Parkinson (Smith and Kieval, 2000; Smith and Villalba, 2008).

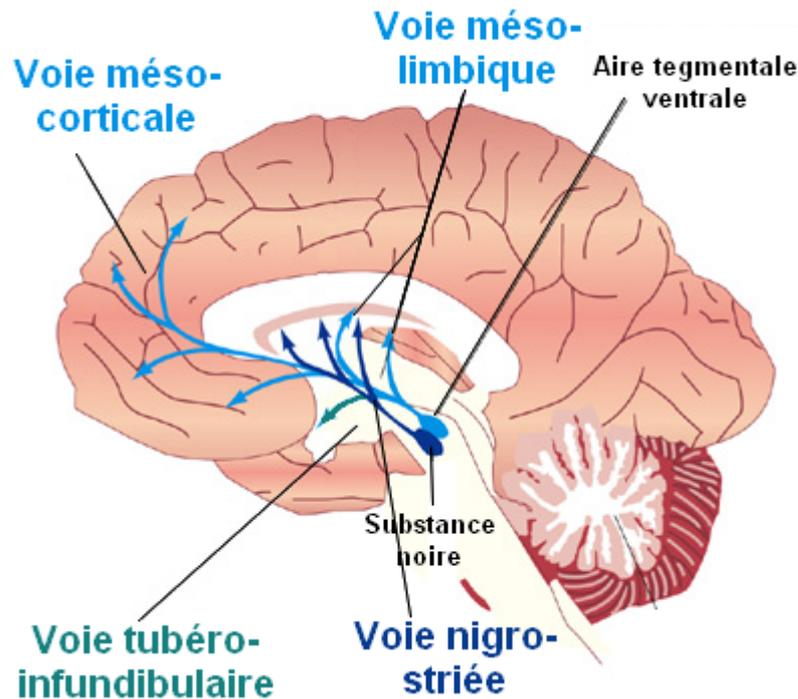


Figure 4 : Représentation schématique des quatre voies dopaminergiques centrales. Les voies méso-corticale et méso-limbique proviennent de l'Aire tegmentale ventrale et innervent respectivement le cortex préfrontal et le noyau accumbens. La voie nigro-striée naît dans la SNC et innerve le striatum alors que la voie tubéro-infundibulaire relie l'hypothalamus à l'éminence médiane.

III.1.1. Anatomie de la voie dopaminergique nigro-striée

La substance noire est le plus gros noyau du mésencéphale. Elle est divisée en deux parties : la partie compacte (SNc) et la partie réticulée (SNr). La SNr est une des deux structures de sortie des ganglions de la base et est composée principalement de neurones GABAergiques. La SNc est quant à elle composée des neurones DAergiques. Cette structure est composée de neurone fusiformes (forme de triangle) à long dendrites qui sont divisés en deux types : les petits neurones (de 10 à 12 μ m de diamètre) avec des axones courts, considérés comme les interneurons (Parent and Smith, 1987) et qui représentent environ 10% des neurones de la SNc (Carpenter *et al.*, 1981) et les neurones plus larges représentant 90% de la population (15 à 20 μ m de diamètre). Les dendrites des neurones de la SNc projettent profondément dans la SNr alors que les axones projettent majoritairement sur le striatum (Juraska *et al.*, 1977). La DA libérée va alors permettre de moduler l'activité des structures

cibles via des récepteurs DAergiques. Le striatum pourra ensuite moduler ses structures cibles mais aussi exercer un rétrocontrôle inhibiteur sur la SNc.

III.1.2. Récepteurs dopaminergiques

Les récepteurs DAergiques appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et se répartissent en deux classes, nommées D1 (RD1 et RD5) et D2 (RD2, RD3, et RD4).

La classe D1 est définie comme étant capable d'activer l'adénylate cyclase et permettre l'accumulation d'AMPc. Ceci permet 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, la classe D2 entraîne l'inactivation de la PKA par la signalisation D2-like dépendante ce qui 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 *et al.*, 2003).

III.2. Dopamine : rôles physiologiques et implications pathologiques

III.2.1. Rôles physiologiques et dérégulation de la SNc

La DA libérée par la SNc tient un rôle très important dans la modulation de l'activité neuronale au sein des ganglions de la base et par conséquent participe au contrôle de l'acte moteur. Cependant, la SNc est aussi largement impliquée dans les processus de réponse à des stimuli (Ljungberg *et al.*, 1992), de récompense mais aussi dans la perception sensorielle

(rétine et bulbe olfactif), la régulation de certaines hormones de l'hypophyse, la thermorégulation, la mémoire et le plaisir (Schultz, 1997). A l'état physiologique, la DA permet de réguler l'acte moteur mais aussi les cycles veille/sommeil et les dimensions temporelles (Matell and Meck, 2000). Ainsi une dérégulation de la SNc entraîne, en plus des complications motrices, des insomnies, des déficits de représentations spatiales et temporelles, des pathologies compulsives et d'addiction, ... (Smith and Kieval, 2000; Smith and Villalba, 2008)

III.2.2. SNc et maladie de Parkinson

La dégénérescence des neurones DAergique de la SNc est communément admise comme la cause principale de la maladie de Parkinson. Les symptômes moteurs apparaissent après 70% à 80% de dégénérescence DAergique (McNamara and Durso, 2006). Les neurones DAergiques 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) (Agid, 1991), mais les autres structures des ganglions de la base sont aussi affectées (Hornykiewicz, 1973 ; Smith and Villalba, 2008). Les traitements pharmacologiques de la maladie de Parkinson visent surtout à rétablir cette transmission DAergique altérée. En effet, des traitements médicamenteux de la classe des agonistes DAergiques ont été utilisés. Ces substances agissent directement sur les récepteurs DAergiques mais peuvent entraîner des effets secondaires indésirables. Elles sont moins efficaces sur les symptômes moteurs que le traitement de référence : la L-Dopa. Cette molécule est le précurseur de la synthèse de DA. La L-Dopa, couplé à un inhibiteur de la décarboxylase périphérique ou de la catéchol-O-méthyl transférase (COMT) permet de compenser la diminution de la libération DAergique. Cependant, la L-Dopa est aussi le précurseur de la NA et peut donc être métabolisée en NA par les neurones issus du LC (cf. figure 5).

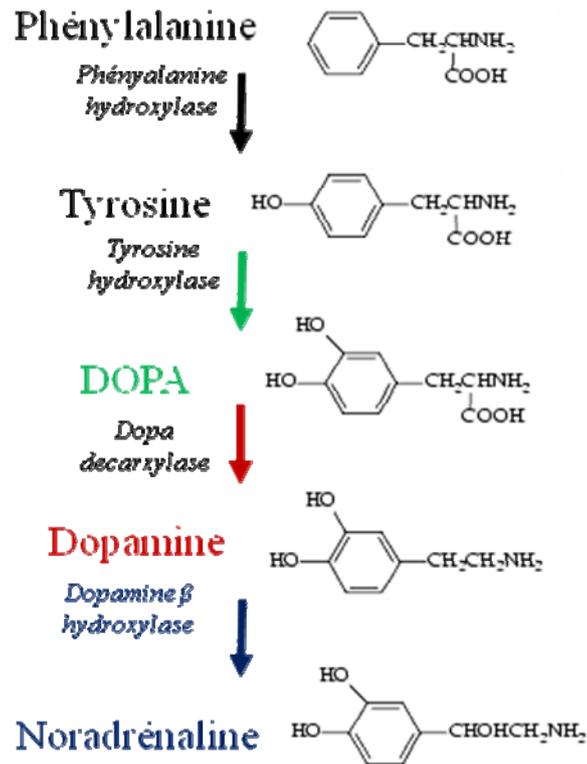


Figure 5 : Voie de synthèse de la dopamine et de la noradrénaline. La L-Dopa exogène remplace la dopa manquante et est transformée en dopamine par la dopa decarboxylase des neurones dopaminergiques restants et en noradrénaline dans les neurones noradrénergiques.

IV. Système noradrénergique et Locus Cœruleus

(cf. publications annexes, Delaville et al., 2011, Noradrenaline and Parkinson's disease)

IV.1. Généralités

Deux systèmes noradrénergiques principaux peuvent être distingués : un composé de neurones appartenant à la medulla oblongata (noyaux A1/C1) et un plus rostral, composé de neurones localisés dans le pons, les noyaux A2/C2 (Gaspar, 1994). Le système noradrénergique caudal est représenté par des groupes de cellules dispersées dans le tronc cérébral est innervé majoritairement les structures descendantes et la moelle épinière. Le système le plus rostral est principalement représenté par le locus cœruleus (LC, A6) et innervé majoritairement les structures ascendantes du cerveau (Aston-Jones, 2004). Dans la suite de cette partie, nous nous intéresserons donc plus particulièrement à ce dernier groupe.

IV.1.1. Anatomie du Locus Cœruleus

Le LC est présent dans toutes les espèces de mammifères et est la principale source de NA du système nerveux central (Aston-Jones, 2004; Mann, 1983). Son activité est influencée par de nombreuses afférences synaptiques. En raison de sa petite taille, les études biochimiques ne peuvent pas différencier le LC des structures avoisinantes. Cependant les études de traçage antérograde et rétrograde ont permis de déterminer les nombreuses afférences et efférences de cette structure (cf. figure 6) (Aston-Jones, 2004; Benarroch, 2009). Les cortex orbitofrontal et cingulaire antérieur pourvoient la source glutamatergique principale, le raphé dorsal (RD), module l'activité du LC en libérant de la 5-HT et l'aire préoptique inhibe l'activité de cette structure via la libération de GABA. *Via* ces projections dispersées, le LC module l'activité corticale, sous-corticale mais aussi du tronc cérébral. Cependant, le striatum et la moelle épinière sont peu innervés par le LC. La figure 6 résume les afférences et les éfferences majoritaires de cette structure.

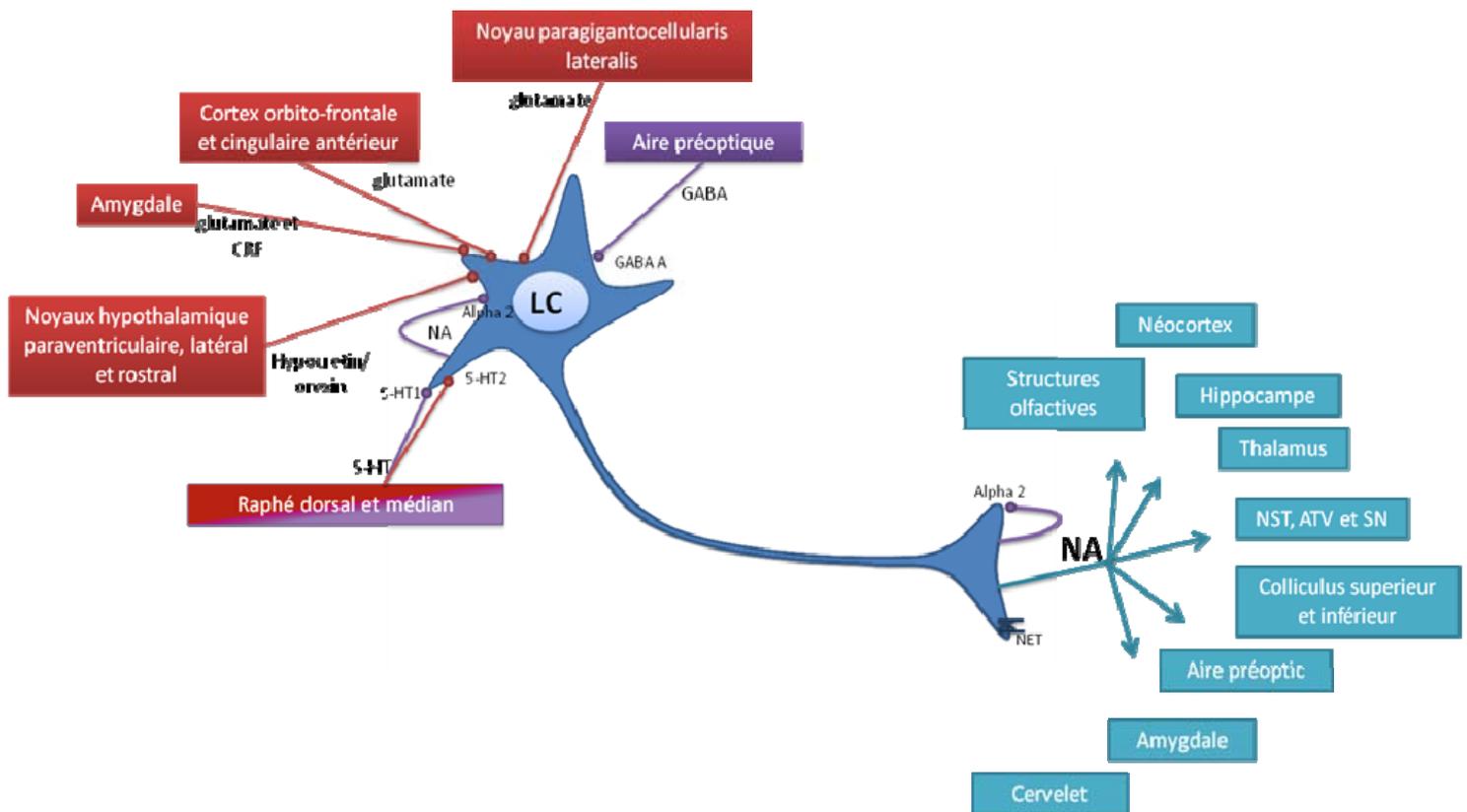


Figure 6 : Afférences (rouge et violet) et efférences principales du LC (bleu). LC : Locus coeruleus ; NA : noradrénaline ; Alpha2 : récepteurs noradrénergiques de type alpha 2 ; GABA : acide γ aminobutyrique ; GABA A et GABA B : récepteurs GABA de type A et B ; 5-HT : sérotonine ; 5-HT1 et 5-HT2: récepteur sérotonine de type 1 et 2; CRF: facteur de libération de la corticotrophine ; NST : noyau sous-thalamique ; ATV: aire tegmentale ventrale ; SN: substance noire ; NET: transporteur noradrénergique ; Rouge : afférences excitatrices ; Violet : afférences inhibitrices.

IV.1.2. Récepteurs noradrenergiques

La libération de NA affecte la transmission synaptique, le potentiel de membrane et l'excitabilité des neurones *via* des récepteurs adrénergiques (ARs) (Jenner *et al.*, 1983). Deux sous-types de ARs ont été décrits : les récepteurs alpha ($\alpha 1$ et $\alpha 2$) et les récepteurs beta ($\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 3$). Ces ARs sont localisés dans tout le cerveau y compris au niveau du striatum et de la SN (McCormick and Wang, 1991). Ils appartiennent à la famille des RCPG. Les effets excitateurs sont dus à la stimulation des ARs post-synaptiques $\alpha 1$ et β (Arcos *et al.*, 2003; McCormick *et al.*, 1991; McCormick and Wang, 1991). Bien que peu étudiés dans le système

nerveux central, les ARs $\alpha 2$ sont localisés au niveau pré-synaptique et leur stimulation se traduit par un effet inhibiteur (Belujon *et al.*, 2007; Benarroch, 2009) (cf tableau 1).

| Sous-type des ARs | Protéine G | Distribution | Effets |
|-------------------|------------|---|---|
| Alpha 1 | Gq | Post-synaptique dans tout le cerveau (cortex, thalamus, NST, striatum...) | ↑ excitabilité |
| Alpha 2 | Gi/o | Pré-synaptique sur les fibres noradrénergiques et non-noradrénergiques | ↓ la fréquence de décharge spontanée et l'excitabilité ; ↓ la libération de neurotransmetteur |
| Beta 1 | Gs | Post-synaptique dans le cortex, mais principalement exprimé dans le cœur et le foie | Active l'adénylate cyclase ; réponse cellulaire diffuse |
| Beta 2 | Gs/Gi | Post-synaptique dans le cervelet, le cortex, l'hippocampe, le mésencéphale mais principalement exprimé dans le système nerveux périphérique | Active l'adénylate cyclase ; facilite la LTP |
| Beta 3 | Gs | Tissu adipeux | Active l'adénylate cyclase, régule le poids corporel |

Tableau 1 : Caractéristiques des récepteurs adrénérgiques. NST : noyau sous-thalamique ; LTP : potentialisation à long terme ;

IV.2. Noradrénaline : rôles physiologiques et implications pathologiques

IV.2.1. Rôles physiologiques et dérégulation du Locus Coeruleus

Le système NAergique issu du LC contribue au fonctionnement de plusieurs fonctions physiologiques en modulant la plasticité synaptique. Il permet entre autres une modulation de la douleur, de l'homéostasie et du flux sanguin local (McCormick, 1992). Cette modulation dépend du mode de décharge des neurones du LC. Ils déchargent suivant deux modes : tonique ou phasique (Aston-Jones and Cohen, 2005, 2005). L'activité tonique est caractérisée par une décharge très régulière et à haute fréquence. Cette décharge augmente durant l'éveil et diminue pendant le sommeil à ondes lentes. Elle joue un rôle central dans la régulation du cycle veille-sommeil, la réponse aux stimuli environnementaux et accentue l'état de vigilance. Ainsi la stimulation des ARs centraux entraîne un changement dans l'état de vigilance des animaux. Pendant des tests de performance ou d'attention, les neurones du LC réduisent leur fréquence de décharge élevée à une fréquence modérée et répondent de façon phasique aux stimuli. L'activité phasique en bouffées du LC est associée aux réponses comportementales spécifiques. Ainsi, le LC joue un rôle clé dans l'éveil, l'attention et les réponses aux stress (Aston-Jones and Cohen, 2005; Berridge and Waterhouse, 2003).

La dérégulation du LC est impliquée dans beaucoup de pathologies telles que les maladies du sommeil et de l'éveil, les déficits attentionnels, l'hyperactivité, le stress post-traumatique et les maladies psychiatriques comme l'anxiété, la dépression, la schizophrénie et l'addiction aux opioïdes (Benarroch, 2009). Le LC est donc une cible privilégiée des traitements pharmacologiques de ces pathologies (Aston-Jones, 2004; Rommelfanger and Weinshenker, 2007; Benarroch, 2009).

IV.2.2. Locus Coeruleus et maladie de Parkinson

Le LC est souvent sévèrement affecté dans les maladies neurodégénératives (Saper et al., 1991) et un nombre croissant d'études anatomiques et biochimiques ont prouvé la dégénérescence de ses neurones dans la maladie de Parkinson et ceci d'autant plus si la maladie de Parkinson s'accompagne de démences. En plus d'une perte drastique des corps cellulaires NAergiques du LC (Chan-Palay and Asan, 1989 ; Bertrand *et al.*, 1997 ; Gaspar et al., 1991), une diminution sévère des taux de NA (>80%) a été montrée dans les cerveaux de patients parkinsoniens (Taquet et al., 1982; Jenner et al., 1983; Ehringer and Hornykiewicz, 1960, 1998; German *et al.*, 1992; Greenfield and Bosanquet, 1953; Tohgi *et al.*, 1997). Cette forte déplétion NAergique serait en accord avec la théorie de Braak (Braak et Del Tredici, 2008) qui postule une altération caudo-rostral des centres monoaminergiques dans la maladie de Parkinson avec une dégénérescence des neurones du LC avant la dégénérescence des neurones DAergiques de la SNc. De plus, des études de tomographie par émission de positron (TEP) ont mis en évidence que le [¹¹C]RTI-32, un marqueur *in vivo* des transporteurs DAergique et NAergique, est réduit dans plusieurs régions cérébrale des patients parkinsoniens y compris des structures pauvrement innervées en DA mais riche en NA (Marie et al., 1995; Remy et al., 2005; Pavese et al., 2011). Il a aussi été montré un changement dans la forme et la taille des synapses noradrénergiques, aussi bien au niveau pré-synaptique que post-synaptique. Ainsi, un polymorphisme des vésicules synaptiques et une altération des mitochondries ont pu être mis en évidence (Chan-Palay and Asan, 1989; Baloyannis et al., 2006). De plus, Cash et al. (1984; 1986) ont montré une augmentation des ARs de type $\alpha 1$ et $\beta 1$ dans les fractions synaptosomales et microsomales du cortex préfrontal aussi bien dans le modèle du rat 6-OHDA que chez le patient parkinsonien.

Enfin, la biochimie des neurones NAergiques est un point important à considérer dans le cas de la maladie de Parkinson. En effet, la L-Dopa exogène donnée aux patients

parkinsoniens est le précurseur de la synthèse des catécholamines. Elle augmente donc la synthèse DAergique grâce à la décarboxylase des acides aminés aromatiques (DCAA) présente dans les neurones catécholaminergiques. Cependant, dans les neurones NAergiques, la DA est ensuite prise en charge par la DA beta-hydroxylase (DBH) et est transformée en NA. Ainsi, la L-Dopa va être métabolisée en DA et en NA et il est possible que les neurones NAergiques co-libèrent la DA et la NA.

Au vu de ces données, il semble donc évident que la dégénérescence des neurones NAergiques du LC joue un rôle important dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson et pourrait être impliquée aussi bien dans la manifestation des symptômes moteurs et non-moteurs que dans la réponse thérapeutique à la L-Dopa.

V. Système sérotoninergique et Raphé Dorsal

V.1. Généralités

La 5-HT est impliquée dans la plupart des fonctions cérébrales. Elle provient des neurones du raphé. Il s'agit de 9 groupes de neurones situés dans le tronc cérébral. Ils projettent très largement dans tout le système nerveux central. Les noyaux les plus rostraux innervent le cortex et le thalamus, les plus caudaux, le cervelet et la moelle épinière (cf. figure 7).

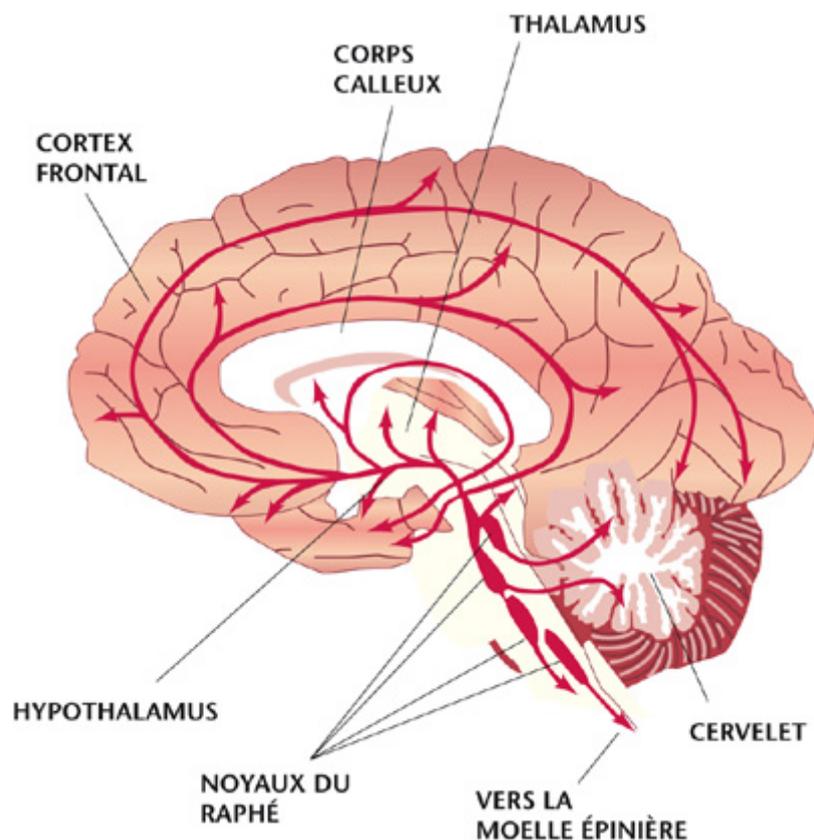


Figure 7 : Représentation schématique des voies 5-HTergiques centrales. Les noyaux rostraux sont constitués entre autres du raphé dorsal et médian alors que les noyaux caudaux sont constitués du raphé caudal. Les noyaux rostraux innervent tout le système nerveux central alors que les noyaux caudaux innervent la moelle épinière.

Bien que surtout étudiée pour son implication dans des pathologies psychiatriques tel la dépression et la schizophrénie, la 5-HT est aussi impliquée dans les pathologies motrices notamment en raison de son innervation importante des ganglions de la base. Celle-ci est issue

plus particulièrement des noyaux du raphé dorsal (RD) et médian (RM) (Dray, 1981). Six faisceaux de fibres proviennent de ces noyaux, les fibres innervant les ganglions de la base empruntant majoritairement le faisceau médian du télencéphale. Un faisceau de fibres distinct et provenant du RD est responsable d'une innervation spécifique du cortex et des ganglions de la base (Azmitia et Segal, 1978). Toutefois, dans le cas du RM, il semble que les projections vers les ganglions de la base ne soient pas de nature 5-HTergique (Azmitia et Segal, 1978 ; Vertes et Martin, 1991 ; Wirtshafter et coll., 1987).

V.1.1. Anatomie du Raphé Dorsal

Le RD est le plus volumineux des noyaux 5-HTergiques du raphé et contient la moitié des neurones 5-HTergiques du raphé (De Deurwaedère, 2011). Seulement 50% des neurones du RD sont 5-HT (Descarries et al., 1982 ; De Deurwaedère, 2011; Jacobs et Azmitia, 1992). Ce noyau est responsable d'une innervation diffuse et non homogène de toutes les structures des ganglions de la base (Descarries *et al.*, 1990; Parent *et al.*, 2011; Steinbusch, 1981). L'innervation 5-HTergique est plus dense dans les structures caudales des ganglions de la base, notamment dans la SN, et dans les parties médianes et ventrales du striatum (noyau accumbens versus striatum) (Steinbusch, 1981 ; De Deurwaedère, 2011). Certains neurones issus de la partie dorsale du RD et projetant dans le striatum envoient des collatérales dans la SN (Van der Kooy et Hattori, 1980a). Les corps cellulaires DAergiques reçoivent des afférences importantes du RD et du RM (Dray, 1981; Loughflin et Fallon, 1982; Vertes et Martin, 1988). Au niveau du GP, les différentes parties (internes et externes) reçoivent une innervation massive du RD (Azmitia et Segal, 1978 ; Lavoie et Parent, 1990).

V.1.2. Récepteurs sérotoninergiques

A ce jour sept familles de récepteurs 5-HT sont distinguées sur des critères pharmacologiques et structuraux. Le nombre approximatif de récepteurs 5-HTergiques distincts est porté à 16 mais ce dénombrement ne tient pas compte de modifications pré- (épissage alternatif) et post- (édition de l'ARNm) transcriptionnelles voire traductionnelles (Saudou et Hen, 1994 ; Hoyer et al., 1994 ; Barnes et Sharp, 1999). Les techniques d'autoradiographie quantitative, d'immunohistochimie, couplées à l'hybridation in situ ont été les outils de choix pour étudier la localisation des récepteurs 5-HTergiques dans le SNC.

Beaucoup de ces récepteurs ont été décrits dans le système nerveux central et dans les ganglions de la base (cf. figure 8, De Deurwaerdère, 2010). On peut différencier les récepteurs largement exprimés dans les ganglions de la base et pouvant influencer directement l'activité cellulaire dans ces régions (5-HT1B, 5-HT2A, 5-HT2C, 5-HT3, 5-HT4 et 5-HT6), des récepteurs agissant indirectement sur les niveaux extracellulaires de 5-HT dans les ganglions de la base (5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT2B, 5-HT4). Les récepteurs 5-HT1A et 5-HT1B sont surtout présynaptiques et modulent la libération de 5-HT. Les récepteurs 5-HTergiques sont liés aux protéines G selon diverses modalités, sauf le récepteur 5-HT3 qui est un récepteur canal qui, à l'état ouvert, est perméable aux cations sodium et potassium.

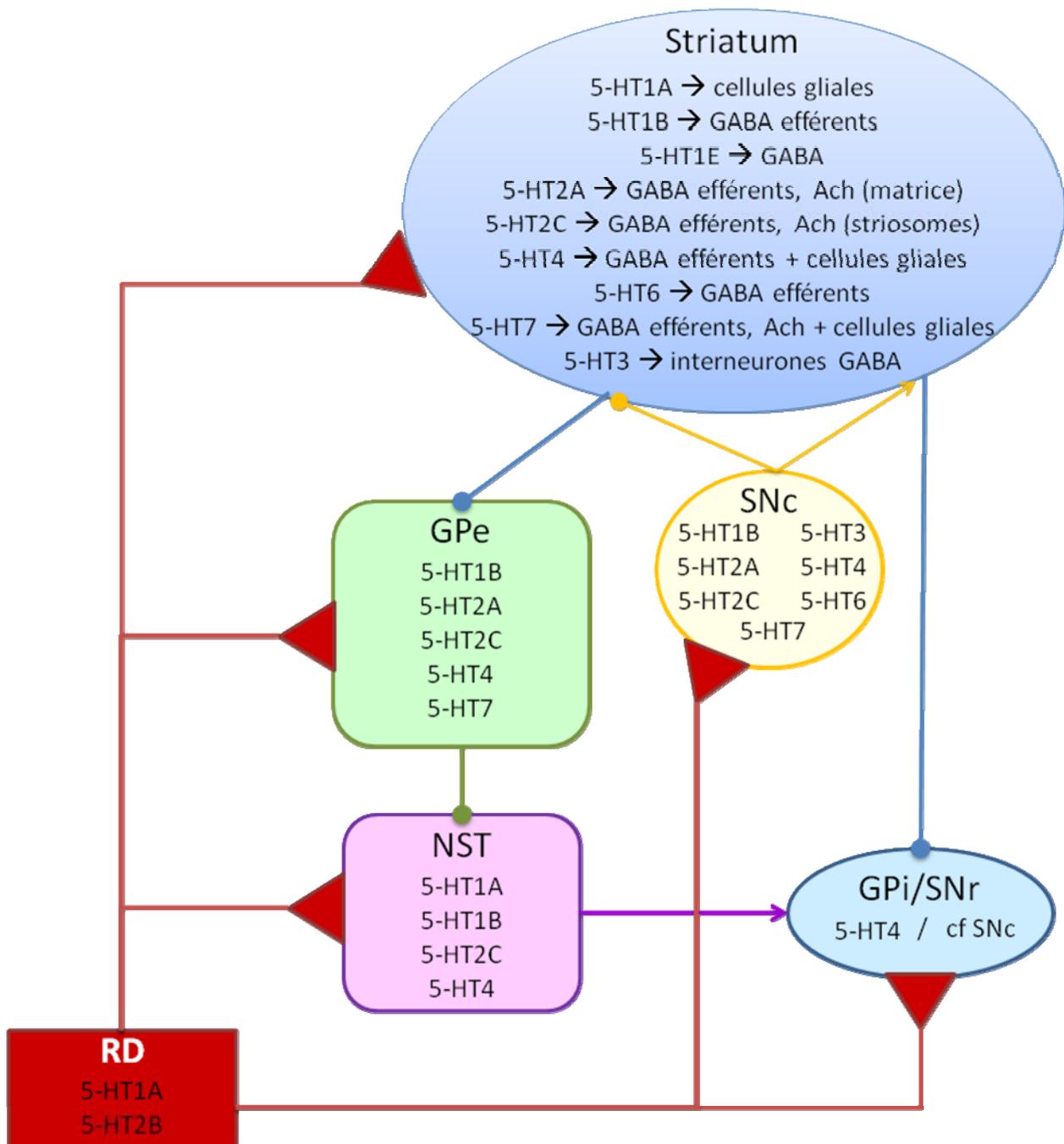


Figure 8 : Distribution des récepteurs 5-HTergiques au sein des ganglions de la base.

Les différentes structures des ganglions de la base sont représentées avec les récepteurs 5-HTergiques qu'ils expriment. Dans le cas du striatum, il est précisé la localisation cellulaire présumée correspondant à l'expression des sous-types de récepteur. cf SNc : présence des mêmes récepteurs que dans la SNc ; GPe et GPi : globus pallidus externe et interne, NST : noyau sous-thalamique, SNc et SNr : substance noire *pars compacta* et *reticulata*, 5-HT : sérotonine ; RD : raphé dorsal.

V.2. Sérotonine : rôles physiologiques et implications pathologiques

V.2.1. Rôles physiologiques et dérégulation du Raphé Dorsal

La 5-HT est impliquée dans la régulation de fonctions telles que la thermorégulation, les comportements alimentaires et sexuels, le cycle veille-sommeil, la nociception, l'anxiété ou le contrôle moteur. L'activité des neurones du raphé est liée au cycle veille-sommeil. De plus, la fréquence des influx nerveux en provenance du RD est corrélée à l'activité motrice, ce qui suggère que la quantité de 5-HT libérée dans le système nerveux central est augmentée avec l'activité motrice (Mignon and Wolf, 2002 ; Di Matteo et al., 2008).

La désorganisation de l'activité du RD est impliquée dans diverses pathologies cognitives allant de la dépression aux troubles du comportement au sens large en évoquant la schizophrénie (Iqbal et van Praag, 1995 ; Meltzer et Huang, 2008), la maladie de Parkinson (Fox et al., 2008 ; Nicholson et Brotchie, 2002), les addictions aux drogues d'abus (Bubar et Cunningham, 2008 ; Fletcher et al., 2008), les chorées (Cross *et al.*, 1988), la maladie de Gilles de la Tourette (Steeves et Fox, 2008), les troubles obsessionnels compulsifs ou les dyskinésies iatrogènes conséquentes à l'utilisation de médicaments antiparkinsoniens ou des antipsychotiques (Carta et al., 2008 ; Fox et al., 2008 ; Meltzer et Huang, 2008 ; Kapur et Remington, 1996; Nash et Melzer, 1991).

V.2.2. Raphé Dorsal et maladie de Parkinson

L'implication de la 5-HT dans la maladie de Parkinson a été évoquée depuis longtemps (Jenner et al., 1983 ; Scatton et al., 1983; Miyawaki et al., 1997), mais la littérature existante n'offre pas une idée claire sur le devenir des neurones 5-HTergiques du raphé dans cette pathologie. En effet, certains auteurs ont rapporté des faibles baisses ou aucune modification dans le nombre des neurones 5-HTergiques du RD (Jellinger, 1987; Halliday et al., 1990;

Paulus and Jellinger, 1991; Kim et al., 2003; Sawada et al., 1985). Des auteurs ont toutefois montré qu'il existait des altérations des fibres ascendantes limitées aux terminaisons 5-HTergiques dans différentes régions cérébrales de patients parkinsoniens (Chase et Ng, 1972; Chase, 1974; Chinaglia et al., 1993) pouvant se traduire par 60% de baisse tissulaire en 5-HT au niveau du cortex et dans les ganglions de la base (Scatton et al., 1983; Birkmayer et Riederer, 1986 ; Birkmayer and Birkmayer, 1987). Contrairement à la baisse marquée des taux de DA dans le putamen, c'est le noyau caudé qui présente la plus forte baisse des marqueurs 5-HTergiques : 5-HT (-66%), 5-HIAA, le métabolite principal de la 5-HT (-42%), le transporteur 5-HT (-56%) et la tryptophane hydroxylase (-59%) (Kish et al., 2008). Beaucoup d'études se sont focalisées sur le striatum, mais il semble que la baisse puisse être plus diffuse, comme le suggèrent des données obtenues par imagerie cérébrale décrivant des baisses du transporteur 5-HTergique non seulement dans le noyau caudé et le putamen mais également dans le thalamus et les aires corticales frontales (Haapaniemi et al., 2001; Kerényi et al., 2003; Kim et al., 2003). Ainsi, l'altération des neurones 5-HTergiques serait présente dans la maladie de Parkinson et pourrait dépendre de l'état d'évolution de la maladie (Scholtissen et al., 2006). Cette altération serait à prendre en compte toutefois pour ajuster une approche thérapeutique efficace, non seulement pour la pathologie motrice, mais aussi pour les pathologies associées telles que la dépression.

VI. Interactions des trois systèmes monoaminergiques

Plusieurs études anatomiques ont montré des projections réciproques entre les neurones 5-HTergiques, DAergiques et NAergiques (Aston-Jones *et al.*, 1991; Kaehler *et al.*, 1999). D'un point de vue fonctionnel, il a été mis en évidence que, lorsque les neurones 5-HT du RD étaient lésés, la fréquence de décharge des neurones NAergique du LC augmentait d'environ 70% (Dremencov *et al.*, 2007; Haddjeri *et al.*, 1997; Reader *et al.*, 1986). De la même façon,

la lésion des neurones NAergiques du LC induit une décharge irrégulière des neurones du RD (Svensson *et al.*, 1975). Le LC et le RD reçoivent une forte innervation DAergique (Beckstead *et al.*, 1979; Kalen *et al.*, 1988). L'administration d'agonistes DAergiques augmente la fréquence de décharge des neurones du RD (Aman *et al.*, 2007; Haj-Dahmane, 2001) et inhibe les neurones du LC (Elam *et al.*, 1986). A l'inverse, les neurones du LC et du RD modulent l'activité des neurones DAergiques (Di Mascio *et al.*, 1998; Grenhoff *et al.*, 1993; Grenhoff and Svensson, 1993; Linner *et al.*, 2001). Au niveau des ganglions de la base, tant les inhibiteurs de la recapture de la 5-HT que la stimulation électrique du RD augmente la libération striatale de DA *in vivo* ou le métabolisme DAergique *ex vivo* induit par l'halopéridol, un antagoniste non sélectif des récepteurs DAergiques (Bubar *et al.*, 2003; De Simoni *et al.*, 1987; Lucas *et al.*, 2000; Lucas and Spampinato, 2000; Waldmeier, 1979; Waldmeier and Delini-Stula, 1979). De la même façon, la stimulation du LC excite l'activité des neurones DAergiques innervant le striatum (Ponzio *et al.*, 1981). Ainsi, les trois systèmes monoaminergiques sont en interactions constantes et modulent réciproquement leurs activités.

VII. Objectifs généraux du projet de recherche

La maladie de Parkinson semble donc être une pathologie dans laquelle les trois systèmes monoaminergiques sont affectés et non une pathologie purement dopamino-dépendante. Cependant, l'impact de chaque déplétion monoaminergique sur les comportements moteurs et non moteurs ainsi que sur l'activité des neurones des différentes structures des ganglions de la base reste à élucider. L'efficacité ainsi que les effets secondaires induits par les traitements pharmacologiques et chirurgicaux utilisés chez les patients parkinsoniens dépendent-ils de ces différentes déplétions ?

L'objectif de notre travail de thèse s'inscrit dans ce champ de recherche visant à mieux comprendre la physiopathologie de la maladie de Parkinson, ce qui permettra d'améliorer les thérapeutiques existantes et de développer de nouvelles approches. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au rôle respectif des trois monoamines (DA, NA et 5-HT) dans la physiopathologie de la maladie. Pour cela, nous avons étudié les effets des déplétions monoaminergiques, une à une ou combinées, sur les comportements moteurs et non moteurs chez le rat. Ensuite, nous avons étudié l'impact des différentes déplétions monoaminergiques sur l'activité électrique des neurones de trois structures majeures des ganglions de la base, le NST, la SNr et le GPe. Dans un second temps, nous avons évalué l'impact de ces mêmes déplétions monoaminergiques sur l'efficacité ainsi que sur les effets secondaires des traitements existants de la maladie de Parkinson à savoir la SHF du NST et la L-Dopa. Enfin, comme peu d'études se sont intéressées au rôle de la NA dans la modulation de l'activité neuronale au sein des ganglions de la base (Arcos *et al.*, 2003; Belujon *et al.*, 2007), nous avons étudié les effets d'agents NAergiques (agonistes/antagonistes des récepteurs NAergiques $\alpha 1$ et $\alpha 2$) injectés localement dans le NST sur le comportement moteur et sur

l'activité électrique des neurones du NST chez le rat normal ainsi que chez le rat porteur d'une lésion unilatérale des neurones DAergiques de la SNc. La déplétion DAergique a été réalisée par injection stéréotaxique de la 6-OHDA dans le faisceau médian du télencéphale (MFB), celle de la NA par injection i.p. de DSP-4 et celle de la 5-HT par injection i.p. de pCPA.

MATERIEL &
METHODES

MATERIEL ET METHODES

Toutes les expériences ont été réalisées sur des rats adultes mâles de souche Wistar ou Sprague-Dawley pesant entre 280 et 400g. Les rats ont été conditionnés en cage collective (4 par cage) sous conditions de lumière artificielle (cycle 12h jour/12h nuit), à 24°C avec libre accès à l'eau et à la nourriture. 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.

I. Substances Pharmacologiques

Au cours de cette étude, différentes substances pharmacologiques ont été utilisées. Leur nom usuel, leur propriété, la concentration à laquelle elles ont été utilisées (en injection intra-péritonéale (i.p.) ou locale au niveau du NST) ainsi que le fournisseur de chacune d'entre elles sont indiqués dans le tableau 2.

| Nom usuel | Propriété | Concentrations utilisées | Volume injecté | | Bibliographie |
|---------------|---------------------|-----------------------------|----------------|--------------------|------------------------------|
| | | | Comportement | Electrophysiologie | |
| Phenylephrine | Agoniste alpha 1 | 20mg/ml | 200nl | 20nl | Arcos et al., 2003 |
| Benoxathian | Antagoniste alpha 1 | 10mg/ml | 200nl | 20nl | Déterminée au laboratoire |
| Clonidine | Agoniste alpha 2 | 20mg/ml | 200nl | 20nl | Arcos et al., 2003 |
| Idazoxan | Antagoniste alpha 2 | 20mg/ml | 200nl | 20nl | Belujon et al., 2007 |
| 6-OHDA | Neurotoxine | 12,5µg ou | | | Belujon et al., |

MATÉRIEL ET MÉTHODES

| | | | | |
|-------------|--|----------------------|--|------------------------------|
| | DAergique | 4,2µg | | 2007 |
| Désipramine | Neuroprotecteur NAergique | 25mg/kg | | Belujon et al., 2007 |
| DSP-4 | Neurotoxine NAergique | 50mg/kg | | Fritschy et Grzanna |
| pCPA | Inhibiteur de la Tryptophane Hydroxylase | 2x50mg/kg | | Déterminée au laboratoire |
| L-Dopa | Précurseur catécholaminergique | 12mg/kg ou 6mg/kg | | Navailles et al., 2010 |
| Benserazide | Inhibiteur périphérique des DCAA | 15mg/kg | | Navailles et al., 2010 |

Tableau 2 : Agents pharmacologiques utilisés pour les différentes expériences. DCAA : decarboxylase d'acide aminé aromatique. DAergique : dopaminergique ; NAergique : noradrénergique ; 5-HTergique : sérotoninergique.

II. Modèle d'étude

II.1. Nomination des différents groupes d'animaux utilisés et chronologie

II.1.1. Déplétions DAergiques, noradrénergiques et 5-HTergiques :

Huit groupes ont été réalisés dans ces études : le groupe sham ne recevant que du NaCl (0.9%), le groupe 6-OHDA, recevant une injection de 6-OHDA dans le faisceau médian du télencéphale (MFB, medial forebrain bundle) puis des injections de NaCl (0.9%) i.p., le groupe pCPA recevant du NaCl (0.9%) dans le MFB puis des injections i.p de pCPA, le groupe DSP-4 recevant du NaCl (0.9%) dans le MFB puis l'injection i.p. de DSP-4 et les groupes recevant deux des trois injections ou les trois injections. La figure 9 schématise l'ensemble de ces groupes.

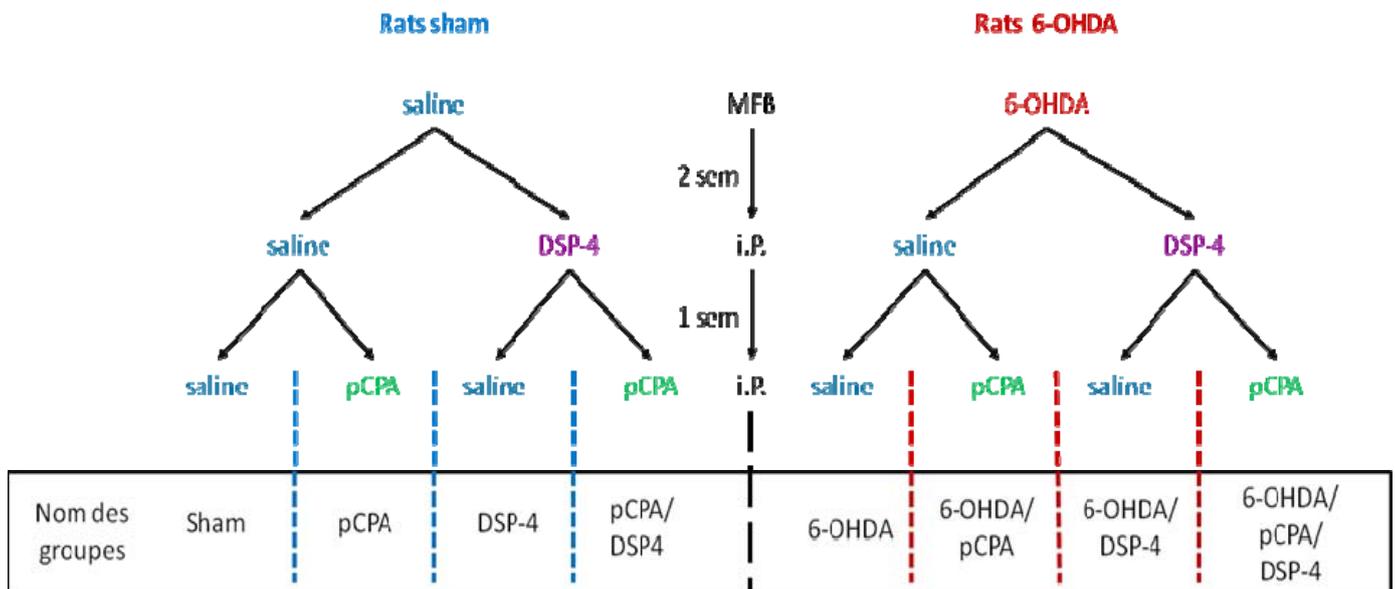


Figure 9 : Récapitulatif des groupes utilisés suites aux déplétions dopaminergiques, noradrénergiques et 5-HTergiques et chronologie des déplétions. sem : semaine ; MFB : injection intra faisceau médian du télencéphale. i.p.: injection intra-péritonéale ; saline : injection de NaCl (0.9%).

L'efficacité des traitements anti-parkinsoniens ne sera étudiée que chez des animaux ayant subi une déplétion bilatérale en DA (Rats 6-OHDA, colonne de droite sur la figure 9).

La chronologie des déplétions est la suivante :

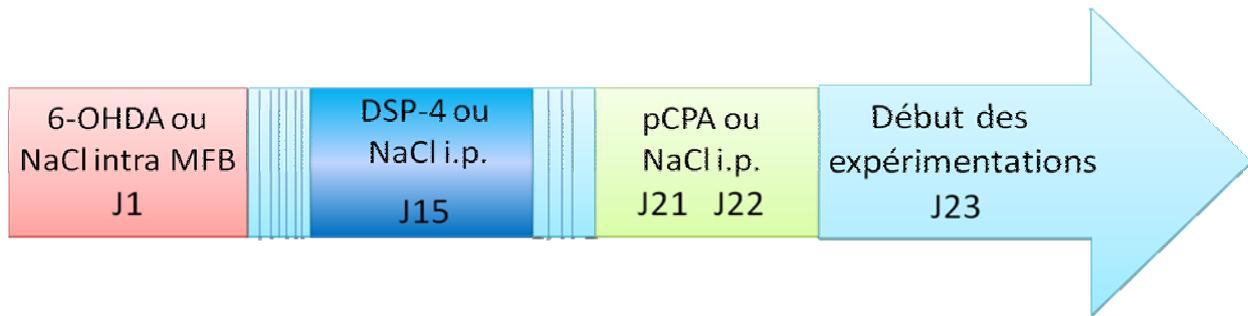


Figure 10 : Frise chronologique des déplétions monoaminergiques. J1 : Jour 1 ; intra MFB : injection dans le faisceau médian du télencéphale ; i.p. : injection intra péritonéale

II.1.2. Modulation noradrénergique locale au niveau du NST:

Seules des animaux Sham, recevant du NaCl (0.9%) dans le MFB droit et le groupe 6-OHDA, recevant une injection de 6-OHDA dans le MFB droit ont été utilisés pour ces expériences. Les expériences d'électrophysiologie et de comportement ont été réalisées trois semaines après la lésion 6-OHDA. Afin d'injecter localement les agents noradrénergiques sur des rats vigiles pendant le comportement, un guide canule a été implanté une semaine avant le début des expériences de comportement (cf. figure 11).

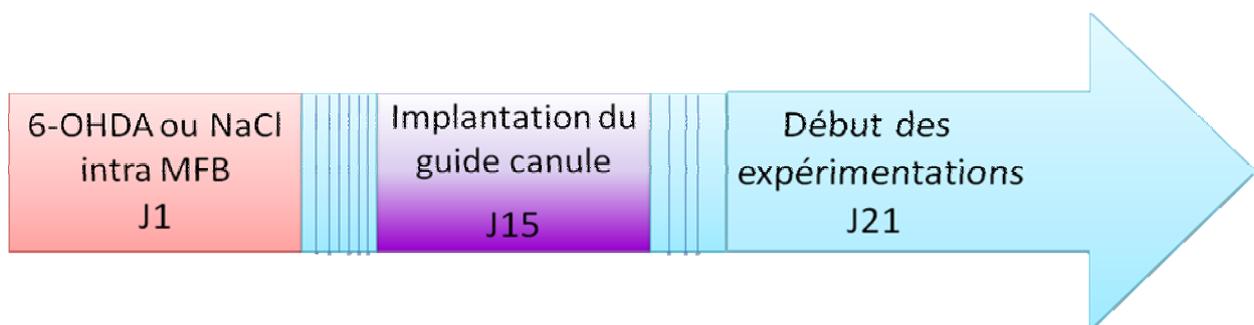


Figure 11 : Frise chronologique de la modulation noradrénergique locale du NST. J1 : Jour 1 ; intra MFB : injection dans le faisceau médian du télencéphale.

II.2. Lésion du système DAergique :

II.2.1. Lésion DAergique unilatérale

Les animaux sont rendus hémiparkinsoniens par une injection stéréotaxique unilatérale de 6-hydroxydopamine (6-OHDA) dans le MFB selon les coordonnées stéréotaxiques de

l'atlas du cerveau de rat (Paxinos et Watson, 1996). Au niveau du MFB se trouvent les fibres DAergiques issues de la SNc qui projettent sur le striatum ; en y injectant la 6-OHDA, toxine spécifique des neurones catécholaminergiques, les corps cellulaires des neurones DAergiques nigriques sont lésés de façon rétrograde.

Avant l'anesthésie par injection i.p. d'hydrate de chloral à 8 % (5 ml/kg), les rats ont été traités à la désipramine 0,4 % (5 ml/kg) qui permet d'inhiber la recapture de la NA et ainsi de protéger les neurones noradrénergiques de la lésion à la 6-OHDA. Les rats traités et anesthésiés ont ensuite été placés sur un cadre stéréotaxique (Unimecanique, France). Le crâne a été mis à nu puis séché afin de distinguer les repères anatomiques à la surface du crâne : bregma et lambda. Après la craniectomie, et à l'aide de l'atlas stéréotaxique de Paxinos et Watson (1996), le MFB a été atteint en déplaçant la canule d'injection aux 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 du cerveau (cf. figure 12). La 6-OHDA (12,5 µg ; sigma) a été dissoute dans un volume de 2,5 µl de NaCl 0,9 % et injectée dans le MFB. Après suture, les rats ont été gardés sous lampe chauffante jusqu'à leur réveil. Les animaux sont ensuite remis à l'animalerie pendant trois semaines avant le début des expérimentations.

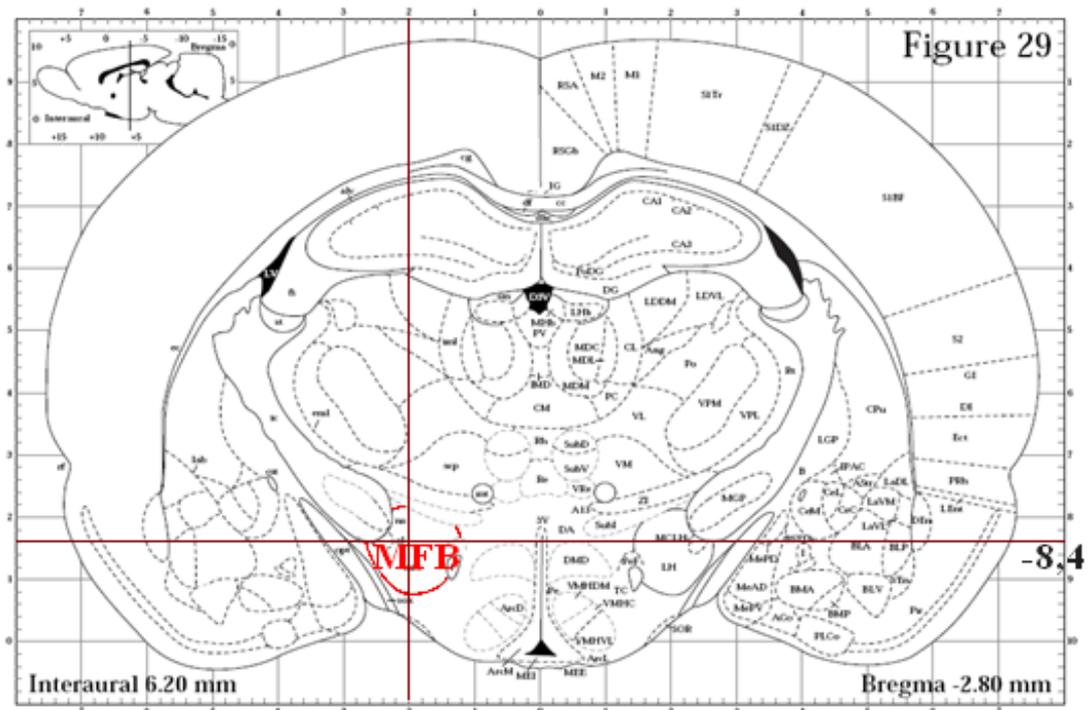


Figure 12 : Localisation du MFB par ses coordonnées stéréotaxiques sur une coupe frontale de cerveau de rat (D'après Paxinos et Watson, 1996).

II.2.2. Lésion DAergique bilatérale :

Tout comme pour la déplétion DAergique unilatérale, les animaux sont rendus parkinsoniens par une injection stéréotaxique bilatérale de 6-OHDA dans le MFB selon les mêmes coordonnées stéréotaxiques (Paxinos et Watson, 1996). La 6-OHDA ($4,2 \mu\text{g}$; sigma) a été dissoute dans un volume de $2,5 \mu\text{l}$ de NaCl 0,9 % et injectée dans le MFB. Après suture, les rats ont été gardés sous lampe chauffante jusqu'à leur réveil. Les animaux sont ensuite nourris au lait premier âge, aux pommes et aux chocapic (Nestlé®) pendant 2 à 3 jours. Ils sont ensuite remis à l'animalerie durant trois semaines avant le début des expérimentations.

II.3. Lésion du système noradrénergique

La dénervation sélective des afférences NAergiques issues du LC a été réalisée par une injection i.p. de N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP-4) deux semaine après

l'injection de NaCl (0,9%) ou de 6-OHDA dans le MFB. Les fibres terminales du LC sont sélectivement dégradées par cette neurotoxine (50 mg/kg i.p., Sigma, Fritschy et Grzanna, 1989). Le DSP-4 a été dissout dans une solution saline (NaCl 0,9%) et immédiatement administré aux animaux. Ils sont ensuite remis à l'animalerie pendant une semaine avant le début des expérimentations. Le DSP-4 à 50mg/kg permet d'obtenir entre 70 et 80% de déplétion NAergique (Fritschy et Grzanna, 1989).

II.4. Déplétion du système 5-HTergique

La déplétion en 5-HT a été réalisée par une injection i.p. de p-chlorophényl-alanine (pCPA), un inhibiteur sélectif de la tryptophane hydroxylase (enzyme limitante de la synthèse 5-HT). Il s'agit d'une déplétion aigüe et réversible. La pCPA (50 mg/kg) a été dissoute dans du NaCl (0,9 %) et immédiatement administrée de façon répétée sur 2 jours consécutifs aux animaux. La pCPA étant un inhibiteur enzymatique et non une toxine, les expérimentations se sont déroulées dans les 3 jours qui suivent ces injections. Ce protocole d'injection permet d'obtenir entre 60 et 70% de déplétion 5-HTergique (résultats du laboratoire non publiés).

II.5. Implantation de guides canules et d'électrodes de stimulation

II.5.1. Modulation noradrénergique locale au niveau du NST:

Une semaine avant les expériences comportementales, un guide canule a été implanté dans la structure cible. L'implantation consiste à positionner ce guide canule 1mm au dessus du NST afin de pouvoir réaliser des injections locales de substances pharmacologiques sur des animaux éveillés. Les implantations ont été réalisées sur des rats sham ou des rats préalablement lésés à la 6-OHDA. La préparation de l'animal se fait de la même façon que pour la lésion. Une fois le guide canule positionné 1mm au dessus des coordonnées stéréotaxique du NST (AP : - 3,8 mm ; L : 2,5 mm ; P : - 7 mm), 6 vis sont fixées sur le crâne

de l'animal et un casque en ciment dentaire est coulé sur le crâne afin de maintenir le guide canule en place. Pour les expériences de comportement, une canule, 1mm plus longue que le guide canule, a été descendue dans le guide canule de façon à injecter la substance pharmacologique localement au niveau du NST chez l'animal vigile, dans un volume de l'ordre du nanolitres.

II.5.2. Stimulation à Haute Fréquence chez l'animal vigile

Afin de réaliser la SHF du NST, des électrodes bipolaires concentriques de stimulation (Phymep, Paris, France) ont été implantées bilatéralement au niveau médian du NST (cf. figure 13) une semaine avant les expériences comportementales. Les implantations stéréotaxiques ont été réalisées sur des rats préalablement lésés bilatéralement à la 6-OHDA. La préparation de l'animal se fait de la même façon que pour la lésion. Une fois les macroélectrodes positionnées bilatéralement aux coordonnées stéréotaxique du NST (AP : - 3,8 mm ; L : +/- 2,5 mm ; P : - 8 mm), 6 vis sont fixées sur le crâne de l'animal et un casque en ciment dentaire est coulé. Ces électrodes concentriques bipolaires ont ensuite été reliées au système de stimulation via un câble fixé sur un support rotatoire. Les paramètres de stimulation utilisés sont les mêmes que ceux appliqués chez les patients parkinsoniens stimulés (Limousin et al., 1998) : fréquence de 130 Hz et largeur d'impulsion de 60 μ s. Seule l'intensité de la stimulation est déterminée pour chaque rat en se plaçant à une intensité inférieure à celle déclenchant des effets secondaires permanent (100-200 μ A).

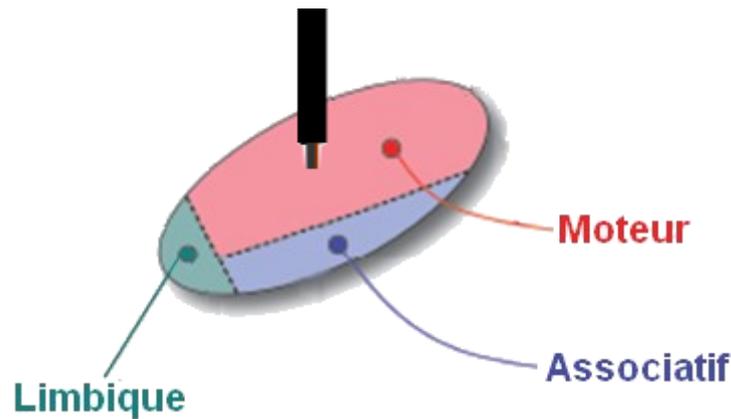


Figure 13 : Schéma du site d'implantation de l'électrode de stimulation à haute fréquence. Le NST est subdivisé en trois parties chez l'homme (Benarroch, 2008) : partie motrice, limbique et associative. Chez le rat, cette subdivision n'est pas claire. Cependant, nous avons implanté l'électrode de stimulation dans la partie centrale du NST correspondant à la partie sensorimotrice.

III. Electrophysiologie in vivo chez le rat anesthésié

III.1. Enregistrement extracellulaire unitaire :

III.1.1. Chirurgie :

Les animaux sont préalablement anesthésiés à l'uréthane 20% dissout dans du NaCl 0,9 % (1,3 g/kg). Les rats sont 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 :

- Globus Pallidus : AP : -1mm ; L : -3 mm ; P : 5,0 – 7,5 mm
- Noyau sous-thalamique : AP : -3,8mm ; L : -2,5 mm ; P : 6,8 – 8,5 mm
- Substance noire *pars reticulata* : AP : -5,3 mm ; L : -2,5 mm ; P : 7,2 – 8,6 mm

Une craniectomie est réalisée afin de placer 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.

III.1.2. Caractéristique des électrodes d'enregistrement :

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 de la pointe à un diamètre interne inférieur ou égal à $1\mu\text{m}$. L'impédance est mesurée et comprise entre 6 et $14\text{M}\Omega$. Elles sont remplies d'une solution de NaCl 0,9% contenant 4% de bleu de Pontamine.

Pour les enregistrements électrophysiologiques des neurones du NST réalisés de façon simultanée avec une injection locale de drogues au niveau du site d'enregistrement, des doubles et triples électrodes ont été confectionnées. Les mêmes électrodes d'enregistrement sont préparées 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 pipettes est d'environ $200\mu\text{m}$. La figure 14 schématise une « triple pipette » et une « double pipette ».

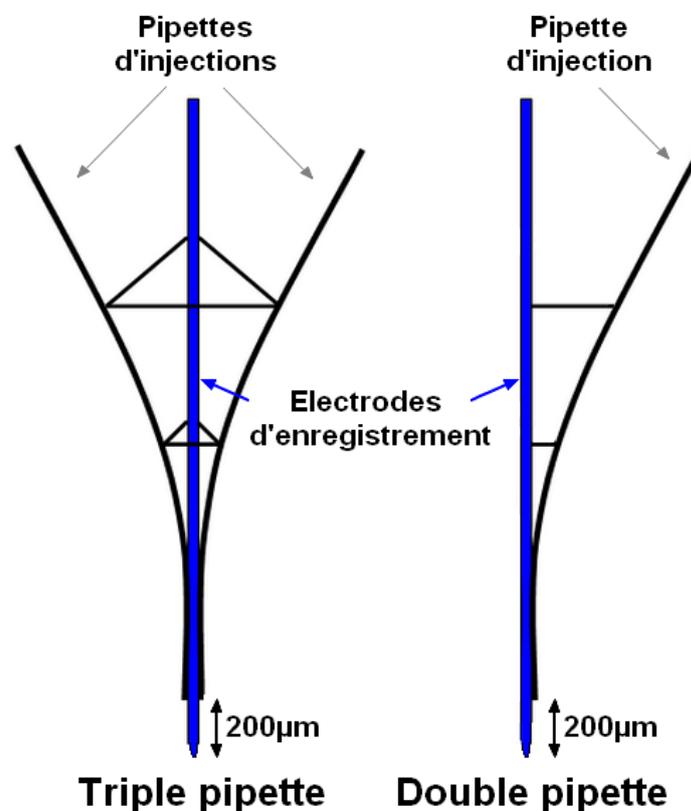


Figure 14 : Schéma d'une triple pipette et d'une double pipette.

Les pipettes d'enregistrement et d'injections sont étirées, cassées respectivement à moins d' $1\mu\text{m}$ et $20\mu\text{m}$, et assemblées sous loupe binoculaire en espaçant les pointes de 100 à $200\mu\text{m}$. Des barreaux de verre sont ajoutés pour solidifier la pipette.

Pour les enregistrements électrophysiologiques de la SNr et du GP suite à l'injection locale de drogues au niveau du NST, une pipette d'injection avec une ouverture de 20 μ m a été préparée. Cette pipette est descendue au niveau du NST suivant un angle de 10° afin d'éviter l'encombrement stérique avec l'électrode d'enregistrement descendue de façon verticale. Dans ce cas, les coordonnées utilisées ont été les suivantes : AP : -2,4mm ; L : -2,5 mm ; P : 8,12 mm.

III.2. Acquisition des signaux

III.2.1. Caractérisation de l'activité spontanée des neurones :

Afin de caractériser l'activité neuronale des structures des ganglions de la base (GPe, NST et SNr) enregistrées, suite aux déplétions DAergique, NAnergique et/ou 5-HTergique, des enregistrements extracellulaires unitaires des neurones ont été réalisés chez les rats anesthésiés à l'uréthane 20%. 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). Après vérification de la stabilité de l'activité du neurone, l'activité spontanée du neurone est enregistrée de façon continue pendant dix minutes.

III.2.2. Modulation noradrénergique locale au niveau du NST :

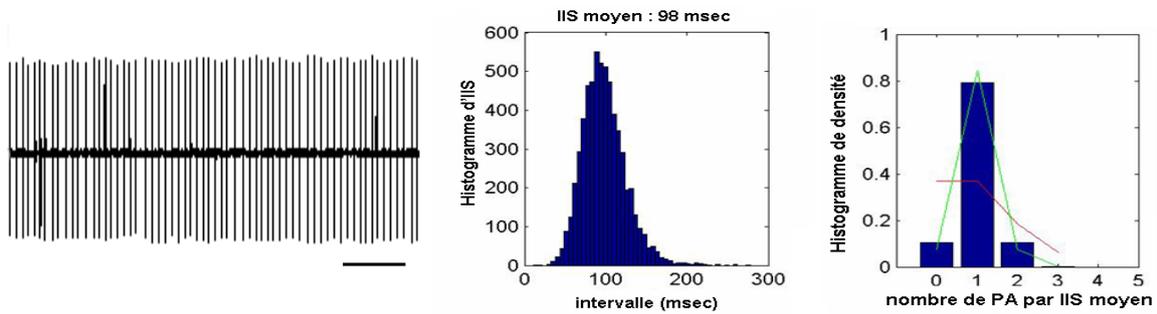
De la même façon, l'activité spontanée des neurones est filtrée (bande passante entre 300 Hz et 3 KHz) et amplifiée grâce au système « Neurolog » (Digitimer, USA). L'acquisition du signal est réalisée à l'aide du système « PowerLab » (AD Instruments, USA). Les 20 premières minutes sont utilisées pour s'assurer de la stabilité de l'activité du neurone. Ensuite, la drogue est injectée localement au niveau du site d'enregistrement par pression

d'air (Picospritzer, Intracel LTD, USA). L'activité neuronale est enregistrée jusqu'à l'obtention d'un éventuel retour au niveau de base.

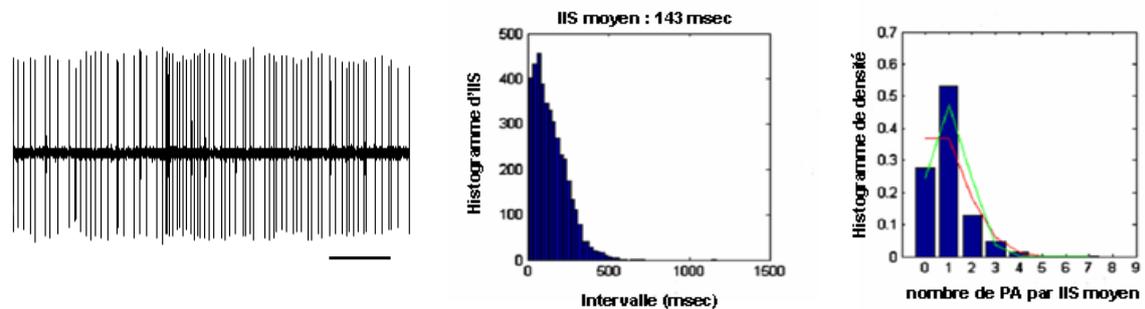
III.3. Analyse de l'activité neuronale enregistrée :

Les enregistrements sont analysés en « off-line » en utilisant trois logiciels de traitement du signal. Le logiciel Chart « Spike histogram » (ADInstruments, USA) permet dans un premier temps de discriminer les potentiels d'action du bruit de fond. Le logiciel « 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 (Interspike interval ou ISI), ou encore le coefficient de variation de l'ISI, défini comme le rapport de la déviation standard sur l'ISI moyen, ici utilisé comme indice de régularité du mode de décharge. Ensuite, nous avons utilisé un algorithme « pattern », mis au point au Laboratoire 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 (cf. figure 15).

A- Régulier



B- Irrégulier



C- Bouffées

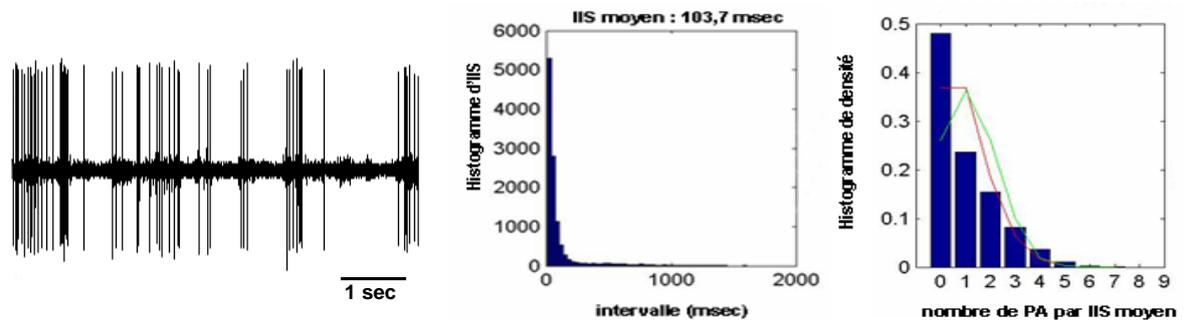


Figure 15 : Les trois types de mode de décharge des neurones du noyau sous-thalamique. **A.** régulier, **B.** irrégulier, **C.** en bouffées. A gauche, un exemple d'enregistrement brut. Au milieu, l'histogramme d'intervalles inter-spikes (ISI). A droite, l'histogramme de densité.

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 prélevé, congelé dans de l'isopentane à - 45°C et stocké à -80°C.

III.4. Analyses statistiques :

III.4.1. Caractérisation de l'activité spontanée des neurones :

Pour l'analyse de la fréquence de décharge à la suite des différentes déplétions les analyses statistiques ont été effectuées suivant une analyse de variances à une voie (one-way ANOVA), suivit d'un test post-hoc de Newman-Keuls.

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.

III.4.2. Modulation noradrénergique locale au niveau du NST :

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

IV. Etude comportementale

IV.1. Mesure de l'activité locomotrice

IV.1.1. Evaluation de l'activité motrice globale : Actimétrie

L'activité locomotrice a été mesurée à l'aide d'un actimètre (« *Open field* », Bioseb, USA). L'actimètre mesure 45x45 cm², et est équipé de deux barres contenant des faisceaux infrarouges situés à deux hauteurs différentes. Il permet de quantifier 3 types de mouvements : horizontaux, stéréotypés et redressements (Belujon et al., 2007). Chaque fois que l'animal interrompt l'un des faisceaux infrarouges de la barre la plus basse, ceci est comptabilisé comme un mouvement horizontal. Lorsqu'il interrompt le faisceau infrarouge de la barre la plus haute, ceci est comptabilisé comme redressement (ou rearing). Enfin, des mouvements plus fins, stéréotypés correspondant au grattage et au toilettage peuvent également être détectés par le faisceau du bas. Cependant, seuls les mouvements horizontaux sont représentés dans les figures des résultats car ce paramètre est le plus représentatif de l'activité locomotrice globale de l'animal. 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.

Effets des déplétions monoaminergiques

Afin de déterminer l'effet des déplétions DAergiques, NAergiques et/ou 5-HTergiques sur le comportement moteur, chaque rat effectue une séance de 20 min par jour dans l'actimètre jusqu'à stabilisation du nombre de mouvements, à partir du 3^{ème} jour dans notre cas. Les animaux sont alors remis dans l'actimètre le 4^{ème} jour et la valeur de l'activité locomotrice de ce jour est considérée comme la valeur de référence de base de l'animal. Les

données des différentes déplétions sont comparées entre elles et avec les animaux sham à l'aide d'une ANOVA une voie suivie d'un test post Hoc de Dunn's.

Effet des traitements antiparkinsoniens

Afin de déterminer l'effet de la L-Dopa et de la SHF du NST, chaque rat effectue une séance de 20 min par jour dans l'actimètre jusqu'à stabilisation du nombre de mouvements. A partir du 4^{ème} jour, les animaux sont ensuite remis dans l'actimètre suite à l'injection de L-Dopa puis un jour dit contrôle au niveau basal est réalisé où les animaux sont remis dans l'actimètre sans traitement. Ces jours « contrôle » sont alternés avec les jours de traitements : L-Dopa (12mg/kg), SHF seule et SHF combinée à la L-Dopa (6mg/kg). Lors de la combinaison des deux traitements, la dose de L-Dopa est divisée par deux comme cela se passe pour la majorité des patients (Vingerhoets et al., 2002). Le déroulement des expériences est décrit dans la figure 16. Les données des différents traitements en fonction des différentes déplétions sont comparées entre elles à l'aide d'une ANOVA deux voies. Dans chaque groupe, afin d'analyser l'effet des traitements nous avons réalisé une ANOVA une voie suivie d'un test post Hoc de Dunn's.

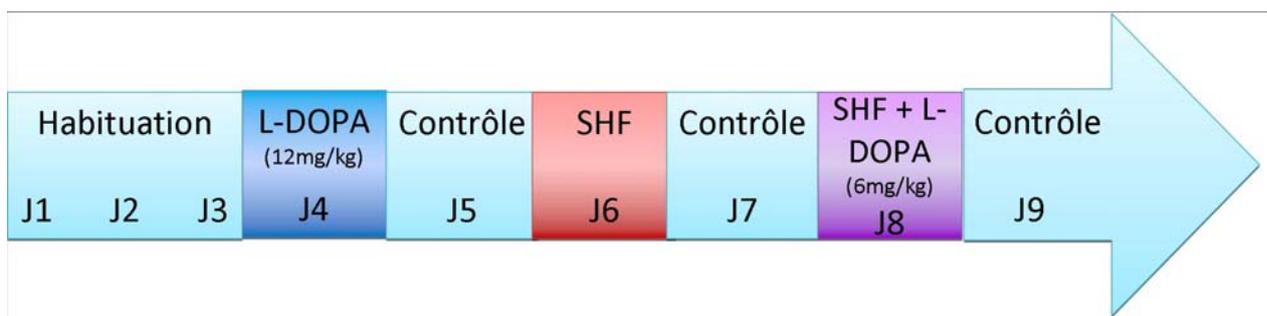


Figure 16 : Frise chronologique de l'évaluation des effets des traitements antiparkinsoniens sur l'activité locomotrice des animaux. J1 : Jour ; retour : jour sans manipulation thérapeutique; L-Dopa (12mg/kg) : traitement à la L-DOPA à une concentration de 12 mg/kg ; SHF : Stimulation à Haute Fréquence du NST ; SHF + L-Dopa : traitements simultanés à la L-Dopa à 6mg/kg et la stimulation à haute fréquence du NST.

Modulation noradrénergique locale au niveau du NST

Afin de déterminer l'effet de l'injection locale d'agents NAergiques sur le comportement moteur, trois injections de sérum physiologique (NaCl 0,9%) ont été pratiquées pendant trois sessions consécutives d'habituation. A partir du 4^{ème} jour, les injections de NaCl sont alternées avec l'injection d'agoniste et d'antagoniste alpha1 et alpha2. Les comparaisons sont effectuées grâce au test statistique de Friedman suivi d'un test post Hoc de Dunn's.

IV.1.2. Evaluation de l'asymétrie motrice : *Stepping test*

La lésion unilatérale du système DAergique de la voie nigro-striée a pour conséquence d'induire une asymétrie chez l'animal qui sera évaluée par le « stepping test ». 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 secondes, en comparaison avec le côté ipsilatéral (côté de la lésion).

Ces expériences ont été réalisées chez des animaux ayant subi une lésion DAergique unilatérale mais aussi bilatérale afin de déterminer la présence ou l'absence d'une asymétrie sur le plan moteur. Les analyses statistiques ont été réalisées selon le test *t de student*, apparié, non paramétrique (Wilcoxon) pour les comparaisons du côté ipsilatéral *versus* côté controlatéral.

IV.1.3. 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 une, deux ou trois déplétions monoaminergiques. Les deux pattes avant des animaux sont placées sur une barre placée à 9cm de hauteur de la paillasse et le temps entre le placement de l'animal sur le barre et le moment où il ôte complètement une patte de la barre est mesuré. Les données des différentes déplétions sont comparées entre elles

et avec celles des animaux sham à l'aide d'une ANOVA une voie suivie d'un test post Hoc de Dunn's.

De plus ce test a été aussi réalisé afin d'étudier l'effet des agents noradrénergiques injectés localement au niveau du NST. Dans ce cas, l'animal est placé avant l'injection, 1 minute et 20 minutes après l'injection de l'agent NAergique. Afin d'éviter tout désagrément à l'animal, nous n'avons pas fait durer l'expérience plus de deux minutes. Les comparaisons sont effectuées grâce au test statistique de Friedman suivi d'un test post Hoc de Dunn's.

IV.2. Mesure de l'anxiété et de la peur : *Elevated plus maze*

L'anxiété et les comportements de peur ont été mesurés à l'aide d'un labyrinthe en croix surelevé (*Elevated Plus Maze*, EPM). Ce test permet d'évaluer l'état anxieux de l'animal face à un environnement nouveau. Il s'agit d'un labyrinthe en forme de croix, constitué de deux bras ouverts face à face et de deux bras fermés face à face reliés par une plateforme centrale de 10x10 cm. Chaque bras mesure 50cm de longueur et 10 cm de largeur, les parois des bras fermés ont une hauteur de 30cm (l'intérêt est de donner aux rats une sensation de sécurité). Ce labyrinthe est soulevé d'une hauteur de 75cm par rapport au sol. Chaque rat a été placé face à un bras ouvert sur la plateforme centrale afin de pouvoir explorer librement le labyrinthe pendant 5 minutes. Ce test a été réalisé dans une pièce faiblement éclairée. L'anxiété est mesurée selon trois paramètres : le nombre d'entrées dans les bras ouverts et fermés en fonction du nombre totale d'entrée (une entrée n'est prise en compte que si les quatre pattes de l'animal sont dans le bras) ; le temps passé dans ces bras en fonction du temps total passé dans les bras, et le nombre de fois où l'animal a exploré l'extrémité des bras ouverts. Un rat dit « anxieux » entre et reste plus souvent dans les bras fermés. Les effets des différentes déplétions monoaminergiques ont été statistiquement analysés à l'aide d'une ANOVA une voie, suivie d'un test post Hoc de Dunn's. Les effets des différents traitements

antiparkinsoniens dans les différentes situations de déplétions monoaminergiques sont comparées entre elles à l'aide d'une ANOVA deux voies suivie d'une ANOVA une voie et enfin d'un test post Hoc de Dunn's.

IV.3. Mesure des comportements dits « d'anhédonie et de dépression » :

IV.3.1. Test de la préférence au sucrose (anhédonie) :

Ce test permet d'évaluer l'anhédonie de l'animal c'est-à-dire la perte de la sensation du plaisir, un des symptômes de dépression chez l'homme. Il consiste à comparer la consommation d'une solution de sucrose (choisie préférentiellement par un rat contrôle) par rapport à celle d'eau sur une durée déterminée. Pendant trois jours, les rats sont placés dans des cages individuelles avec libre accès à deux biberons d'eau et à la nourriture afin de les habituer à la présence de deux biberons et à la cage individuelle. Pendant les deux jours suivants (pré-test et test) les rats ont accès pendant deux heures, à un biberon contenant une solution de sucrose à 1 % et à un autre rempli d'eau, ceci 30 min après le début du cycle nocturne. Durant les 5 jours du test, les deux biberons de chaque cage sont inversés aléatoirement dans le temps afin d'empêcher les préférences de place des animaux. Le pré-test sert à habituer l'animal au sucrose. Durant toute l'expérience, les rats n'ont pas été privés ni d'eau ni de nourriture. Afin de déterminer la consommation d'eau et de sucrose, le poids des biberons a été mesuré au début et à la fin du test.

La préférence au sucrose (PS) est calculée grâce à l'équation suivante :

$$PS = \frac{\text{Consommation de sucrose (g)}}{\text{Consommation de sucrose (g)} + \text{consommation d'eau (g)}} \times 100$$

Les effets des différentes déplétions ont été statistiquement analysés à l'aide d'une ANOVA une voie suivie d'un test post Hoc de Dunn's. Les effets des différents traitements

antiparkinsoniens dans les différents groupes d'animaux avec les différentes déplétions sont comparées entre eux à l'aide d'une ANOVA deux voies suivie d'une ANOVA une voie et enfin d'un test post Hoc de Dunn's.

IV.3.2. Test dit « de dépression » : Test de la nage forcée (FST) :

Ce test se déroule sur deux jours consécutifs. Il consiste à placer l'animal dans un cylindre en plexiglass transparent (50cm de haut, 20cm de diamètre) rempli de 30cm d'eau à une température de 25 ± 2 °C. La profondeur de l'eau est délibérément choisie à 30cm (Borsini & Meli, 1988) contrairement aux 15cm utilisés à l'origine par Porsolt et al. (1978) afin d'empêcher le rat de toucher le fond du cylindre. Les animaux sont filmés afin d'analyser visuellement les différents paramètres suivants : le temps de la nage, la durée de l'immobilité et de l'escalade des parois. Le premier jour, considéré comme le « pré-test » dure 15 min pour chaque rat et correspond à l'habituation de l'animal au milieu. Le jour « test », l'évaluation dure 5 min. Les effets des différentes déplétions ont été statistiquement analysés à l'aide d'une ANOVA une voie suivie d'un test post Hoc de Dunn's. Les effets des différents traitements antiparkinsoniens dans les différentes situations de déplétions sont comparés entre eux à l'aide d'une ANOVA deux voies suivie d'une ANOVA une voie et enfin d'un test post Hoc de Dunn's.

V. Histologie et immunohistochimie

V.1. Vérification des sites d'implantations et d'enregistrements

Afin de localiser les sites d'implantations des guides-canules et des électrodes de stimulation, la partie du cerveau contenant le NST a été coupée au cryostat et une coloration histochemique à l'acétylcholinestérase a été pratiquée. Cette coloration permet de distinguer les différentes structures sur les coupes, et le contraste qu'elle produit facilite la visualisation

de la trace des électrodes de stimulation et du guide-canule. Seuls les rats présentant une trace au niveau du NST ont été sélectionnés pour les analyses statistiques des données comportementales et électrophysiologiques.

Afin de déterminer le site d'enregistrement, le bleu de pontamine a été injecté à la fin de chaque session d'enregistrement électrophysiologique *in vivo*. Pour mieux visualiser le point de bleu de pontamine, une coloration à l'acétylcholinestérase a aussi été réalisée. La localisation du point bleu de pontamine a été réalisée grâce à l'observation au microscope optique et seuls les animaux présentant ce point bleu dans le NST ont été retenus pour l'analyse des données (cf. figure 17).

Les coupes, d'une épaisseur de 25 μm (obtenues à l'aide d'un cryostat), ont été 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 0,2 M, 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 0,2 M, les coupes ont été révélées au sulfure d'ammonium (dilué au 1/100^e en tampon acétate 0,2 M), puis rincées trois fois avant d'être montées entre lame et lamelle.

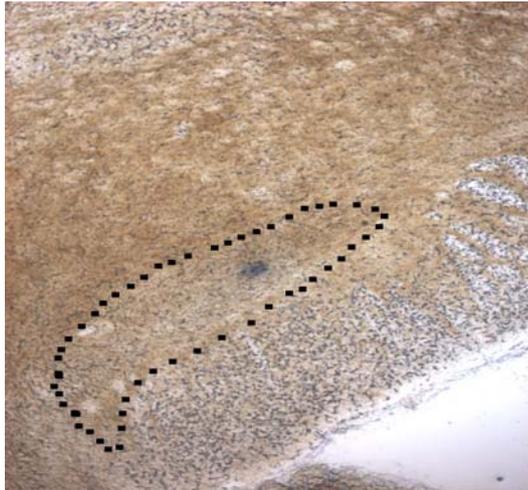


Figure 17 : Contrôle du site d'enregistrement électrophysiologique. Coupes histologiques montrant le marquage au bleu de pontamine dans le NST (délimité en point noir).

VI.2. Vérification de la lésion des neurones dopaminergiques de la SNc et des fibres dans le striatum

Un marquage de la tyrosine hydroxylase (TH) a été réalisé chez les animaux 6-OHDA afin de vérifier l'étendue de la lésion du système DAergique. Les animaux présentant une perte sévère de la coloration de la TH mesurée par densité optique en comparaison des animaux sham sont considérés comme lésés en DA. Brièvement, les coupes de 20 μm sont fixées dix minutes dans du paraformaldéhyde (PAF) à 4 %, les peroxydases endogènes sont ensuite inhibées trente minutes par de l' H_2O_2 à 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 dans le 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 au PBS, puis révélées avec de la DAB (Kit DAB Vector). La réaction est arrêtée par de l'eau distillée, les lames sont déshydratées puis éclaircies au xylène avant d'être montées entre lames et lamelles. La figure 18 montre d'une part la perte unilatérale de

l'innervation DAergique striatale (A) et d'autre part la diminution considérable des neurones TH immunoractifs au niveau de la SNc (B), suite à l'injection unilatérale de 6-OHDA au niveau du MFB.

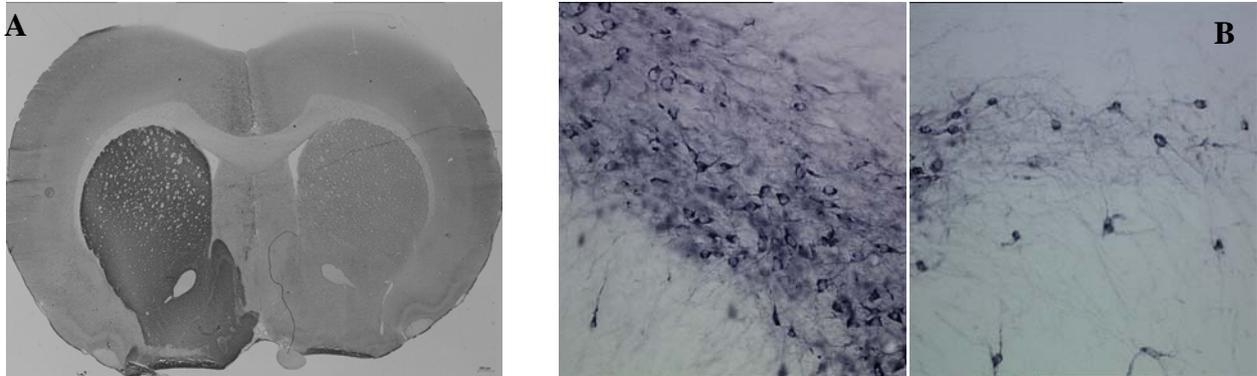


Figure 18 : Vérification de la lésion du système dopaminergique. Coupe du striatum (A) et de la SNc (B) montrant un marquage de la tyrosine hydroxylase. Le côté gauche étant normal et le côté droit étant le côté lésé.

VI. Détermination biochimique des contenus tissulaires en monoamines

VI.1. Traitement du tissu :

Les structures cérébrales (cortex droit et gauche et striatum droit et gauche) ont été rapidement retirées de -80°C par série de 4 et de manière aléatoire et ont été directement placées dans la glace pour la pesée. Dès que le poids de la structure est déterminé, 100 ou 200 μl d' HClO_4 (0,1N, 4°C) sont ajoutés suivant le poids de la structure. Les structures sont alors dissociées pendant 5 secondes environ par sonication à 4°C et l'homogénat est centrifugé à 13000 tours/min pendant 30 min à 4°C .

VI.2. Analyse par HPLC des surnageants :

La séparation des catécholamines et des indolamines a été réalisée par HPLC en phase inversée. Une pompe isocratique (modèle 116, système Gold, Beckman, Paris) délivre la phase mobile à un débit de 1,2 ml/min à travers le système (pression ~ 1500 psi).

La phase mobile utilisée dans ces conditions a la composition suivante : NaH₂PO₄ (60mM), Na₂EDTA (0,1mM), acide octylsulphonique (0,2mM), 7 % méthanol et ajustée à un pH de 3.9 avec de l'acide orthophosphorique. La colonne (Cromasyl C8, 4.6 x 150mm, 5µm, Touzard et Matignon, Paris) est précédée d'une précolonne (Browlee-Newgard, RP-8, 15 X 3.2 mm, 7µM). 20 µl de surnageant ont été injectés (après dilution adaptée dans la phase mobile) dans un injecteur manuel (vanne rhéodyne 7725) équipé d'une boucle de 200 µl (injection en boucle partielle). Le système HPLC est piloté soit par le logiciel GOLD, le logiciel ChromaNav ou le logiciel Spike 2.

VI.3. Détection électrochimique :

Les catécholamines ainsi que les indolamines ont été détectées par électrochimie de type coulométrique. Ce système se compose d'une cellule de garde (modèle 5021, ESA) dont le potentiel est fixé à 0,1 V, une cellule analytique (modèle 5011, ESA) et un détecteur Coulochem I ou II (ESA). Des potentiels de + 350 mV et - 270 mV ont été appliqués pour oxyder et réduire les composés, respectivement. Le traitement du signal ampérométrique se fait par le logiciel CED. Le seuil de détection pour les différentes molécules (rapport signal/bruit=3) est d'environ 15 pg/20µl injectés.

VI.4. Analyses statistiques :

Les effets des différentes neurotoxines ou drogues utilisées (la 6-OHDA, le DSP-4 et la pCPA) sur les quantités tissulaires en DA, NA et 5-HT ont été comparées à l'aide d'une ANOVA une voie suivie d'un test post Hoc de Dunn's.

RESULTATS &

DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

I-Impact des déplétions monoaminergiques sur les comportements moteurs et non-moteurs ainsi que sur l'activité des neurones du NST, du GP et de la SNr dans le contexte de la maladie de Parkinson

I.1. Résumé

La maladie de Parkinson est considérée comme une conséquence de la perte des neurones DAergiques de la SNc. Cependant la déplétion DAergique seule chez les modèles animaux ne permet pas de reproduire tous les déficits moteurs et non-moteurs de la maladie, et ceci aussi bien sur le plan comportemental que électrophysiologique. De plus en plus de travaux suggèrent que la perte additionnelle des systèmes NAergiques et 5-HTergiques serait impliquée dans certains symptômes non-moteurs observés. Nous avons donc voulu savoir quel était l'impact des déplétions NAergiques et/ou 5-HTergiques dans le modèle du rat hémiparkinsonien mais aussi de par eux même. Ceci nous a donc amené à réaliser 4 groupes sham c'est-à-dire sans lésion DAergique mais présentant les lésions NAergiques et/ou 5-HTergiques et 4 groupes 6-OHDA présentant les lésions NAergiques et/ou 5-HTergiques. Afin d'évaluer les symptômes moteurs, nous avons réalisé un test d'actimétrie et un test de catalepsie. Nous avons aussi pu évaluer certains troubles non-moteurs, l'anxiété à l'aide du labyrinthe en croix surélevée, la « dépression » grâce au test de la nage forcée de Porsolt modifié, et l'anhédonie grâce au test de la préférence de consommation de sucrose (article 1).

Dans ces conditions, nous avons pu mettre en évidence que la déplétion noradrénergique aussi bien que la déplétion DAergique, seules ou combinées, entraînent des déficits moteurs.

La déplétion DAergique unilatérale est nécessaire mais pas suffisante seule pour induire de l'anxiété. En effet, seule la combinaison de la déplétion DAergique avec la déplétion noradrénergique et/ou 5-HTergique induit un état anxieux chez le rat. Enfin, nous avons montré que la déplétion des trois monoamines était nécessaire pour induire des comportements dits dépressifs et d'anhédonie chez le rat (article 1).

En parallèle de ces expériences de comportements, nous avons enregistré l'activité électrique des neurones du NST (article 1), du GP et de la SNr (article 2) dans les différentes situations de déplétions monoaminergiques.

Les résultats montrent que la déplétion NAergique tout comme la déplétion DAergique, seules ou combinées, augmentent le pourcentage de neurones déchargeant de façon irrégulière et en bouffées au niveau du NST. La déplétion noradrénergique seule diminue aussi la fréquence de décharge des neurones du NST. La déplétion 5-HTergique, quant à elle seule ou combinée avec la déplétion DAergique n'a aucun impact sur l'activité des neurones du NST. Enfin, tout comme pour les comportements dits dépressifs, seule la déplétion des trois systèmes monoaminergiques entraîne une augmentation de la fréquence de décharge associée à une augmentation du pourcentage des neurones déchargeant de façon irrégulière et en bouffées.

Ces résultats nous ont conduit à étudier les conséquences des déplétions monoaminergiques sur l'activité des neurones de deux structures efférentes majeures du NST, le GP et la SNr. Contrairement au NST, la déplétion NAergique seule n'induit pas de modification ni de la fréquence ni du mode de décharge des neurones du GP et de la SNr. Cependant, la déplétion DAergique augmente la proportion des neurones déchargeant de façon irrégulière et en bouffées des neurones de ces deux structures comme précédemment décrit dans la littérature. Ces changements n'ont pas été modifiés par la déplétion

additionnelle en NA. En ce qui concerne la fréquence de décharge, la déplétion en DA, mais pas celle en NA, induit une diminution de ce paramètre au niveau des neurones de la SNr.

Inversement, la déplétion 5-HTergique qui n'avait aucun effet sur l'activité des neurones du NST, induit une augmentation de la proportion des neurones déchargeant de façon irrégulière et en bouffées au niveau du GP et de la SNr. Ces effets sont similaires à ceux induits par la déplétion DAergique seule. La déplétion combinée en DA et en 5-HT tend à cumuler les effets des deux déplétions. En ce qui concerne la fréquence de décharge, la déplétion en 5-HT induit une diminution de ce paramètre au niveau des neurones du GP et de la SNr.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats montre que la perturbation des trois systèmes monoaminergiques joue un rôle important à la fois dans la manifestation des troubles des comportements moteurs et non moteurs et aussi dans l'induction de l'activité électrique pathologique des neurones au sein des ganglions de la base.

I.2. Article 1: Emerging dysfunctions consequent to combined monoaminergic depletions in parkinsonism

Emerging dysfunctions consequent to combined monoaminergic depletions in parkinsonism

Running title: Monoamine depletion in parkinsonism

Claire Delaville¹, Jonathan Chetrit¹, Khaled Abdallah¹, Stéphanie Morin¹, Laura Cardoit¹, Philippe De Deurwaerdère¹ and Abdelhamid Benazzouz^{1,2*}

1. Université Bordeaux Segalen, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS UMR 5293), Neurodegenerative Diseases Institute, Group Monoamines, DBS and Parkinson's disease, 146 rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France.

2. Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Place Amélie Raba-Léon, 33000 Bordeaux, France.

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

Telephone: +33 557 57 46 25; Fax: +33 556901421

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

Abstract

The loss of dopamine (DA) neurons has been the pathophysiological focus of the devastating conditions of Parkinson's disease, but depletion of DA alone in animal models has failed to simultaneously elicit both the motor and non-motor deficits of PD. The present study aimed to investigate, in rats, the respective role of dopamine (DA), noradrenaline (NA) and serotonin (5-HT) depletions on motor and non-motor behaviors and on subthalamic (STN) neuronal activity. We show that NA or DA depletion significantly decreased locomotor activity and enhanced the proportion of bursty and irregular STN neurons. Anxiety-like states required DA depletion plus the depletion of 5-HT or NA. Anhedonia and "depressive-like" behavior emerged only from the combined depletion of all three monoamines, an effect paralleled by an increase in the firing rate and the proportion of bursty and irregular STN neurons. Here, we provide evidence for the exacerbation of behavioral deficits when NA and/or 5-HT depletions are combined with DA depletion, bringing new insight into the combined roles of the three monoamines in PD.

Key words: Parkinson's disease, Dopamine, Noradrenaline, Serotonin, Monoamine depletion, Motor and non-motor symptoms, single unit microrecording, Subthalamic nucleus.

1. Introduction

Parkinson's disease is a neurological disorder characterized by the manifestation of motor symptoms, attributed to the degeneration of dopamine (DA) neurons of the substantia nigra pars compacta (SNc) (Ehringer & Hornykiewicz 1960). Although the motor symptoms of PD are well defined, the non-motor features, such as depression, anhedonia and anxiety, are under-studied and, consequently, under-treated.

Despite the focus on DA, PD is a multi-system disorder characterized also by the loss of noradrenaline (NA) neurons of the locus coeruleus (Bertrand *et al.* 1997, Fornai *et al.* 2007) and serotonin (5-HT) cells of the dorsal raphe (Kish 2003). Although NA and 5-HT depletions have been suggested as other landmarks of the disease, a specific role for each neurotransmitter in the pathophysiology of PD is still not clearly determined. NA and 5-HT are widely recognized in the development of depression and anxiety both of which have been reported in PD patients (Halliday *et al.* 1990, Murai *et al.* 2001). On the other hand, total inhibition or destruction of the 5-HTergic system alone in the rat does not induce any “depressive-like” behavior or anxiety (Cervo *et al.* 1991, Wieland *et al.* 1990). Considering these findings together, we hypothesized that these symptoms could be a consequence of dysfunction of some combination of DAergic, NAergic and 5-HTergic pathways.

Many studies have identified the subthalamic nucleus (STN) as a basal ganglia nucleus playing a key role in the pathophysiology of PD. After DA depletion, STN neurons, which normally exhibit a tonic discharge pattern, become bursty in animal models of PD (Bergman *et al.* 1994, Ni *et al.* 2001). This pathological bursty pattern has also been reported in PD patients (Benazzouz *et al.* 2002, Hutchison *et al.* 1998). Moreover, the motor symptoms of PD are alleviated by either STN ablation (Bergman *et al.* 1990, Guridi & Obeso 2001) or high frequency stimulation (Benazzouz *et al.* 1993, Benabid *et al.* 2000). In addition to its role in

motor regulation, the STN plays a pivotal role in associative and limbic functions (Temel *et al.* 2005). Furthermore, within the basal ganglia, the STN is one of the structures most heavily innervated by NAergic (Boyajian *et al.* 1987, Canteras *et al.* 1990) and 5-HTergic (Steinbusch 1981) terminals. Functionally, NAergic as well as 5-HTergic agents, can modulate STN neuronal activity with an impact on motor behavior in the rat (Belujon *et al.* 2007, De Deurwaerdere & Chesselet 2000). From these studies, and in view of its important role in the basal ganglia and in PD, we hypothesized that defective NAergic and/or 5-HTergic transmission could influence the electrical activity of STN neurons in the context of PD.

Thus the present study aimed to investigate the effects of DA, NA and 5-HT depletions one by one or combined upon (i) motor and non-motor functions including locomotor activity, depressive-like behavior and anxiety, and (ii) on the electrical activity of STN neurons in the rat.

2. Material and methods

2.1. Animals

Adult male Wistar rats, weighing 280-380 g were used for behavioral and *in vivo* electrophysiological experiments. 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).

2.2. Monoamine depletion procedures

The present study was carried out on a total of 151 rats distributed in eight groups as summarized in figure 1. Each group was subdivided into subgroups to perform one or two behavioral tests. The number of animals per group appears in the figure legends.

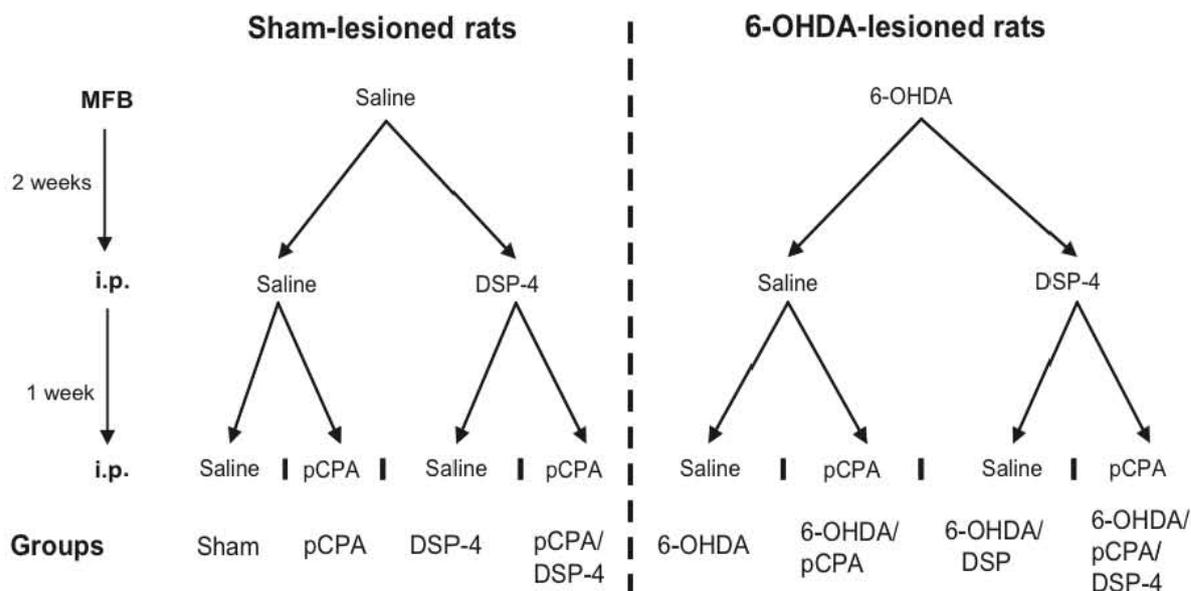


Figure 1. Schematic presentation of different groups of drug-treated animals and their respective controls. MFB: medial forebrain bundle; i.p.: intra-peritoneal injection. Sham: rats treated with 0.9% NaCl (n=17); pCPA: rats treated with 4-Chloro-L-phenylalanine (n=19); DSP-4: rats treated with N-(2-Chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine hydrochloride (n=10), pCPA/DSP-4: n =21; 6-OHDA: rats treated with stereotactic injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) into the MFB (n=8), 6-OHDA/pCPA: n=23, 6-OHDA/DSP-4: n=13, 6-OHDA/pCPA/DSP-4: n=19.

Each rat received either 6-hydroxydopamine (6-OHDA-lesioned rats) or NaCl (0.9%; sham-lesioned rats) into the right medial forebrain bundle (MFB). Two weeks later, 6-OHDA-lesioned rats and sham-lesioned rats received intraperitoneal (i.p.) injection of N-(2-Chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine hydrochloride (DSP-4) or NaCl (0.9%) followed, one week later, by two i.p. injections of 4-Chloro-L-phenylalanine (pCPA) or NaCl (0.9%) on

two consecutive days. The rationale for waiting 2 weeks after 6-OHDA injection to deliver the NA- and 3 weeks for 5-HT-depleting drugs was based on the fact that the stable stage of behavioral deficits, as well as the pathological activity in basal ganglia nuclei, appears at least 2 weeks after the injection of 6-OHDA (Neve *et al.* 1982, Ni *et al.* 2001, Orioux *et al.* 2000). Furthermore, as shown in figure 1, behavioral or electrophysiological experiments were then performed 4 weeks after 6-OHDA, 1 week after DSP-4 and/or the day following the last pCPA injection. Animals exposed to 2 or 3 depletions did not develop any weight loss and had a good general welfare.

6-OHDA, DSP-4 and pCPA were purchased from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France). NA depletion has been performed using DSP-4, a neurotoxin highly selective for NAergic fibers arising from the LC that does not affect other NAergic systems, such as the sympathetic nervous system (Fornai *et al.* 2001, Fritschy & Grzanna 1989, Fritschy & Grzanna 1991). DSP-4 was used at a dose of 50 mg/kg according to the work of Grzanna *et al.* (1989). It was dissolved in NaCl 0.9% immediately before use. pCPA, a selective inhibitor of 5-HT synthesis, was also used at a dose of 50 mg/kg during two successive days as previously determined in the laboratory (data not shown). 6-OHDA was stereotaxically injected into the MFB as previously described (Belujon *et al.* 2007). Thirty minutes prior to surgery, animals were given an i.p. injection of desipramine (25 mg/kg, Sigma) dissolved in 0.9% NaCl and injected in a volume of 5 ml/kg body weight. Desipramine was used in order to protect the NAergic system. Rats were then 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 2.5 µl 6-OHDA (Sigma, 5 mg/ml in sterile NaCl, 0.9%) with 0.1% ascorbic acid into the right MFB at coordinates 2.8 mm posterior to bregma, 2 mm lateral to the midline and 8.4 mm below the skull according to the brain atlas of Paxinos and Watson (1996). 6-OHDA injection was made over a 5 minutes period using a 10 µl

Hamilton microsyringe. At the end of each injection, the syringe needle was left in place for an additional 5 minutes and then withdrawn slowly to prevent reflux of the solution.

2.3. Evaluation of motor activity

2.3.1. Spontaneous motor activity (Open-field)

Spontaneous horizontal motor activity was measured in an isolated room between 8:00 a.m. and 1:00 p.m. using a photoelectric actimeter (Actitrack, Panlab, S.L., Barcelona, Spain), as previously described (Chetrit et al. 2009).

2.3.2. Evaluation of catalepsy scores (bar test)

The degree of catalepsy resulting from monoamine depletions was assessed using the bar tests as previously reported (Chetrit et al. 2009). It consisted of positioning the rat's forepaws on a horizontal bar (0.7 cm diameter) placed at 9 cm above the ground and measuring the latency for the forepaw contralateral to the 6-OHDA-lesioned hemisphere to be withdrawn from the bar and touch the floor (descent latency). The rats that did not maintain their position on the bar received a score of 0 s and were considered non-cataleptic. The latency cut-off time was set at 120 s.

2.4. Evaluation of “depression-like behavior”

2.4.1. Sucrose preference

Published procedures were used (Sclafani & Ackroff 2003, Tordoff & Bachmanov 2003). Rats were placed in individual cages with food and water *ad libitum*. Over the course of three days, rats were housed in the presence of two bottles of water and the position of the water bottles was randomly changed. When the lights went out at 7:00 P.M., pre-weighed water and 1% sucrose bottles were placed on the home cage and rats were allowed to drink for

2 hours. During these 2 hours the position of the bottles was changed. The 2 h intake was measured by weighing the bottles before and after the test. Sucrose preference was calculated as follow: $100 \times [\text{sucrose intake (g)} / (\text{sucrose intake (g)} + \text{water intake (g)})]$

2.4.2. Forced Swim Test (FST).

The FST was conducted as previously described (Porsolt *et al.* 1978). Off line analyses were performed as previously reported (Detke *et al.* 1995). A rat was judged to be immobile when it remained floating in the water without struggling and was making only those movements necessary to keep its head above water.

2.5. Evaluation of anxiety

Animals were tested in the elevated plus maze (EPM) to assess the anxiety-related behavior. The EPM consisted of two open arms (50 cm long \times 10 cm wide) and two walled arms (50 cm long \times 10 cm wide \times 38.5 cm high) with an open roof, arranged around a central platform (10 cm \times 10 cm), with the two arms of each type placed opposite to each other. A camera was mounted 1.5 m above the EPM. Animals were placed onto the central platform, facing one of the open arms. The animal was allowed to explore the maze for 5 min. The following variables were measured: time (s) spent in the open and closed arms and number of entries into the open and closed arms (an entry was counted when the animal entered an arm with all four paws).

2.6. Extracellular single unit recordings

Extracellular single-unit recordings were made in rats anesthetized with urethane (1.2 g/kg, i.p.) as previously reported (Belujon *et al.* 2007, Ni *et al.* 2001). A single glass micropipette electrode (impedance: 8-12 M Ω ; aperture 0.5 μ m) was filled with 4% Pontamine

sky blue in 3 M NaCl. The electrode was lowered into the STN according to the coordinates given in the brain atlas (Paxinos & Watson 1996) (AP: -3.8 mm, L: -2.5 mm, D: 6.8-8.2 mm). Extracellular neuronal activity was amplified, bandpass-filtered (300-3000 Hz) using a preamplifier (Neurolog, Digitimer, UK) and 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 to ascertain the stability of the discharge activity. 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 μ A for 7 minutes. The location of the Pontamine sky blue dots was histologically verified as previously reported (Belujon et al. 2007) and only brains in which the dot was clearly visible in the STN 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 (interspike interval (5 msec bin) were calculated using Neuroexplorer program (AlphaOmega, Nazareth, Israel). Firing patterns were analyzed using the method developed by Kaneoke and Vitek (1996) as previously described (Labarre *et al.* 2008).

2.7. Validation of the experimental model

Selected animals for final analysis went through a series of validation steps that were all mandatory for final inclusion. The displayed n refers to this final inclusion.

2.7.1. Validation of DA lesion

DA cell loss in the SNc was verified by immunohistochemistry of tyrosine hydroxylase (TH) as previously described (Ni et al. 2001). TH-immunohistochemistry was performed for all rats submitted to 6-OHDA-lesion with or without additional NA and/or 5-HT depletion. It was used as an inclusion criterion and only rats with almost total loss of TH-immunoreactivity were considered for the analysis of behavioral and electrophysiological data.

2.7.2. Biochemical assessment of monoamine depletion

In order to quantify the level of DA depletion, a part of 6-OHDA animals, validated by immunohistochemistry, were used for quantitative HPLC analysis. In addition, this technique was used to quantify also the extent of NA and 5-HT depletions in all the tested groups, as it was not possible to use immunohistochemistry for these two monoamines. There were no criteria for NA and 5-HT depletions, as the injections were done intraperitoneally with a relative homogeneity in the depletion of these two monoamines. In all our animals used in the present study NA depletion was $\geq 70\%$ and 5-HT $\geq 60\%$. Only a few animals were excluded from the study because they did not show NA and/or 5-HT depletions.

Tissue content of DA was measured in the anterior striatum and that of NA and 5-HT in the rostral part of the frontal cortex as previously reported (Hoyer *et al.* 1994, Loughlin *et al.* 1982). The choice of these brain structures was based on their extensive monoaminergic innervations (De Deurwaerdere *et al.* 1995, Navailles *et al.* 2010). Tissue concentrations were measured by HPLC with electrochemical detection in these brain areas of control and treated rats as previously described (De Deurwaerdere *et al.* 1995). Rats were decapitated and their brains were removed rapidly and frozen in cold isopentane. Both right and left portions of the anterior striatum and the frontal cortex were dissected and stored at -80°C until their use in biochemical assays. The tissues were homogenized in 200 μl of 0.1 N HClO_4 and centrifuged

at 13,000 rpm for 30 min at 4°C. Aliquots of the supernatants were diluted in the mobile phase (1/2 for the cortex and 1/4 for the striatum) and injected into the HPLC column (Chromasyl C8, 150 x 4.6 mm, 5 µm) protected by a Brownlee-Newgard precolumn (RP-8, 15 x 3.2 mm, 7 µm). The mobile phase, delivered at 1.2 ml/min flow rate, was as follows (in mM): 60 NaH₂PO₄, 0.1 disodium EDTA, and 2 octane sulfonic acid plus 7% methanol, adjusted to pH 3.9 with orthophosphoric acid and filtered through a 0.22 µm Millipore filter. Detection of compounds was performed with a coulometric detector (CoulchemI, ESA) coupled to a dual-electrode analytic cell (model 5011). The potential of the electrodes was set at +350 and -270 mV. Results are expressed as ng/g of tissue, and each value is the mean ± SEM. The percentage of monoamine depletions in drug-treated animals was calculated with regard to sham-lesioned animals.

2.8. Statistical analysis

Statistical analyses were done using Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Biochemical data were compared using a Student's *t*-test in rats receiving 6-OHDA versus NaCl to determine the impact of DA lesion alone compared to its control. Then, sham-lesioned and 6-OHDA-lesioned groups were separated and the effects of DSP-4 and pCPA on monoamine tissue contents were analyzed using a one-way ANOVA followed, when significant, by the Tukey's test for adequate multiple comparisons. Behavioral data in sham and 6-OHDA rats were first compared using the Mann-Whitney test. Then, the effect of DSP-4 and pCPA were compared separately in sham-lesioned or 6-OHDA-lesioned groups (see fig. 1) using a Kruskal-Wallis test followed, when significant, by Dunn's multiple comparison test. For electrophysiological analysis, changes in the proportion of different firing patterns were analyzed using a Chi² test. Firing rates from sham and 6-OHDA rats were compared using a Student's *t*-test. The effects of DSP-4 and pCPA on firing rates were separately

analyzed from the sham and 6-OHDA groups using a one way ANOVA followed, when significant, by the post-hoc Newmann-Keuls test. A P value < 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Monoamine tissue content is reduced by selective drugs in specific brain regions

The Table 1 summarizes the tissue content of DA in the anterior striatum and NA as well as 5-HT in the frontal cortex. 6-OHDA, DSP-4 and pCPA selectively depleted their respective monoamine system. The n of animals in the table 1 corresponds to the number of rats per group used in the study and in which monoamine (DA, NA and 5-HT) tissue contents were quantified by post-mortem HPLC.

3.1.1. Dopamine level

As expected, 6-OHDA injection into the right MFB dramatically decreased by almost 95% tissue level of DA in the ipsilateral striatum compared to sham-lesioned animals ($p < 0.001$, Student's t-test). DSP-4 and/or pCPA treatments did not modify by themselves striatal DA tissue content either in sham-lesioned rats (one-way ANOVA $F(3,55)=1.32$, ns) or in 6-OHDA-lesioned rats ($F(3,57)=0.44$, ns). Notably, the dramatic decrease in striatal DA content observed in 6-OHDA rats was similar in 6-OHDA/pCPA group (84% compared to their respective control), in 6-OHDA/DSP-4 group (93%) and in 6-OHDA/DSP-4/pCPA group (97%). It is noteworthy that DA levels in the unlesioned-side were not significantly modified in sham (one-way ANOVA $F(3,55)=1.98$, ns) and 6-OHDA groups (one-way ANOVA $F(3,56)=2.51$, ns) (Table 1).

3.1.2. Noradrenaline level

6-OHDA administration into the right MFB did not affect NA tissue content in the frontal cortex (Student's t-test, $p > 0.05$). As expected, DSP-4 induced a dramatic decrease in NA tissue content in both sham-lesioned (one-way ANOVA; $F(3,67)=27.19$, $p < 0.001$,] and 6-OHDA-lesioned ($F(3,58)=65.61$, $p < 0.001$) rats. The magnitude of the depletion provoked by DSP-4 was similar in both sham (-81.6%) and 6-OHDA rats (-79.4%) compared to their respective controls. Similarly, pCPA did not modify the NA depleting action of DSP-4 in both sham-lesioned (-84.6%) and 6-OHDA-lesioned rats (-92.2%). DSP-4 had a similar efficacy in the left side (unlesioned for DA) in both sham-lesioned ($F(3,58)=41.11$, $p < 0.001$,] and 6-OHDA-lesioned ($F(3,55)=2.51$, $p < 0.001$) rats (Table 1).

3.1.3. Serotonin level

The administration of 6-OHDA into the right MFB did not modify 5-HT tissue content in the frontal cortex when compared to its respective sham group (Student's t-test, $p > 0.05$). As expected, pCPA induced moderate to severe depletion (73-82%) of 5-HT tissue content in the frontal cortex that was comparable in both sham-lesioned (one-way ANOVA; $F(3,63)=39.94$, $p < 0.001$,] and 6-OHDA-lesioned ($F(3,55)=40.68$, $p < 0.001$) groups. The addition of DSP-4 to pCPA did not change the depleting action of pCPA on 5-HT tissue content in both sham-lesioned (-82.8%) and 6-OHDA-lesioned rats (-89.2%). The decrease in 5-HT tissue content was similar in the left side (unlesioned for DA) in both sham-lesioned ($F(3,60)=31.10$, $p < 0.001$] and 6-OHDA-lesioned rats ($F(3,56)=32.31$, $p < 0.001$) (Table 1).

Table 1. : Neurochemical analysis of 6-OHDA, DSP-4 and pCPA treatment induced selective depletion of DA, NA and 5-HT respectively.

| Treatment | DA Anterior striatum | | NA Frontal cortex | | 5-HT Frontal cortex | |
|-------------------------------|-------------------------|---------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Left | Right | Left | Right | Left | Right |
| Sham-lesioned groups | | | | | | |
| Sham (n=17) | 5738.2±566.6 | 5995.4±577.7 | 147.2±17.3 | 151.7±14.3 | 160.3±18.8 | 166.3±10.6 |
| pCPA (n=19) | 5133.4±317.0 | 6193.4±561.6 | 150.1±9.3 | 142.7±8.8 | 24.2±6.7*** | 33.6±9.6*** |
| DSP-4 (n=10) | 6674.0±1043.2 | 6350.8±1017.1 | 31.3±10.5*** | 23.5±5.0*** | 146.6±31.0 | 163.6±27.9 |
| DSP-4/pCPA (n=21) | 4835.0±369.3 | 5030.0±464.3 | 20.0±4.0*** | 25.0±5.6*** | 31.0±6.9*** | 25.0±4.5*** |
| 6-OHDA-lesioned groups | | | | | | |
| 6-OHDA (n=8) | 7340.8±1339.7 | 307.9±132.2 | 146.9±14.2 | 139.1±15.4 | 155.1±20.9 | 144.5±14.2 |
| 6-OHDA/pCPA (n=23) | 7349.5±656.7 | 976.0±253.7 | 194.7±14.0 | 161.4±11.9 | 33.8±8.3 ^{†††} | 53.3±8.5 ^{†††} |
| 6-OHDA/DSP-4 (n=13) | 6518.8±935.2 | 436.1±75.3 | 40.4±15.6 ^{†††} | 20.8±6.0 ^{†††} | 144.0±14.4 | 132.3±16.8 |
| 6-OHDA/DSP-4/pCPA (n=19) | 4957.1±558.9 | 185.1±48.2 | 17.1±5.0 ^{†††} | 6.1±2.0 ^{†††} | 20.9±7.3 ^{†††} | 14.0±4.9 ^{†††} |

Tissue contents of striatal DA and frontal cortex NA and 5-HT measured by HPLC in different groups of animals. Values are concentrations in ng/g of wet tissue presented as the mean ± SEM. (n): number of rats; Statistical analysis using one way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test was performed; ***: $p < 0.001$ in comparison with sham group; ^{†††}: $p < 0.001$ in comparison with 6-OHDA group.

3.2. NA depletion as well as DA depletion reduced locomotor activity

In agreement with previous data (Belujon et al. 2007) 6-OHDA-lesion significantly decreased the score of spontaneous movements by 56.4% compared to sham-lesioned animals (Mann-Whitney test, $p < 0.001$, Fig. 2A).

The impact of additional depletions of NA and 5-HT differed between 6-OHDA-lesioned and sham-lesioned rats. In 6-OHDA-lesioned rats, even if they were still able to move, additional 5-HT and/or NA depletions did not induce any potentiation of the motor impairment induced by DA depletion (Kruskal-Wallis test, $F=4.52$, $p=0.20$; Fig. 2B). Nevertheless, in sham-lesioned rats NA depletion by itself dramatically decreased locomotor activity (Kruskal-Wallis test, $F=20.87$, followed by Dunn's post-hoc test, $p < 0.001$; Fig. 2C). Additional 5-HT depletion did not affect the decrease in locomotor activity induced by DSP-4 ($p > 0.05$). 5-HT depletion alone had no locomotor effect ($p > 0.05$).

In addition to the locomotor activity, we determined whether monoaminergic depletions could promote catalepsy using the bar test. 6-OHDA-lesion did not induce catalepsy compared to sham-lesioned animals (0.6 ± 0.3 sec vs 1.6 ± 0.7 sec descent latency; Mann-Whitney test, $p=0.44$). NAergic and/or 5-HTergic depletions did not trigger catalepsy in either 6-OHDA-lesioned rats (0.6 ± 0.2 sec for 6-OHDA/DSP-4 group, 1.8 ± 0.6 sec for 6-OHDA/pCPA group and 0.7 ± 0.3 sec for 6-OHDA/pCPA/DSP-4 group, Kruskal-Wallis, $F=2.96$, $p=0.40$) or sham-lesioned rats (0.7 ± 0.3 sec for DSP-4 group, 0.9 ± 0.5 sec for pCPA group and 1.2 ± 0.5 sec for pCPA/DSP-4 group vs 1.6 ± 0.7 sec for sham group, Kruskal-Wallis, $F=0.72$, $p=0.87$).

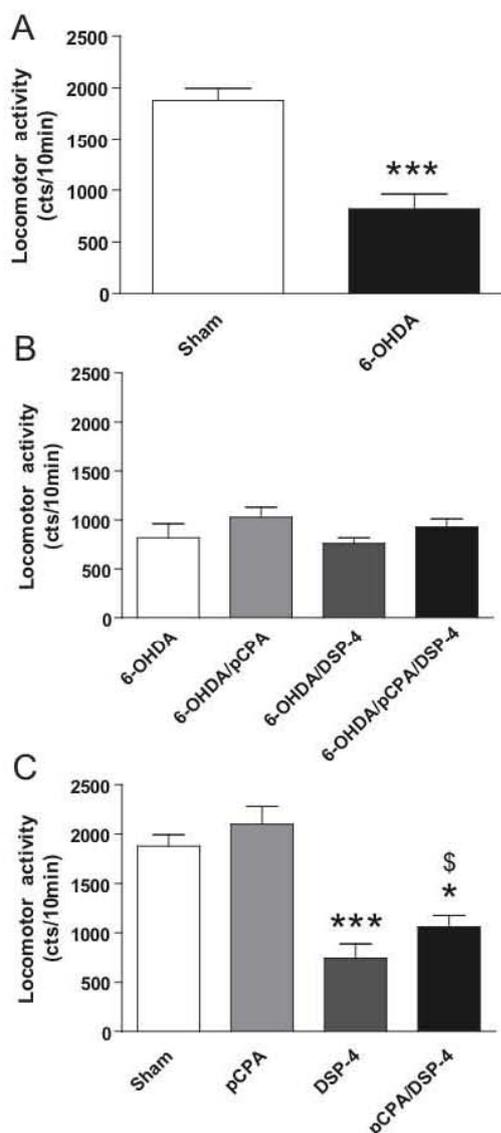


Figure 2. DA depletion as well as NA depletion, but not that of 5-HT, reduced locomotor activity measured by the “open field” actimeter. Histograms represent the number of horizontal movements recorded during 10 minutes on day 4 after habituation. Values are the mean \pm SEM in sham and 6-OHDA rats (A); in 6-OHDA-lesioned groups (B) and in sham-lesioned groups (C). *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$ in comparison with sham. \$: $p < 0.05$ in comparison with pCPA group (Dunn’s multiple comparison test). $n=11$ rats in sham group, $n=9$ rats in 6-OHDA group, $n=5$ rats in pCPA group, $n=9$ rats in DSP-4 group, $n=5$ rats in pCPA/DSP-4 group, $n=6$ rats in 6-OHDA/pCPA group, $n=8$ rats in 6-OHDA/DSP-4 group and $n=6$ rats in 6-OHDA/pCPA/DSP-4 group.

3.3. DA depletion is necessary, but not sufficient alone, to reduce the number of entries and time spent in open arms

Anxiety behavior was assessed using the elevated plus maze. DA depletion did not induce any anxiety behavior as the number of entries, as well as the time spent in open arms, did not change compared to sham-lesioned animals (Mann-Whitney test, $p > 0.05$ for the two parameters, Fig. 3A and 3D). In 6-OHDA-lesioned rats, additional depletion of 5-HT or NA alone or combined dramatically decreased the number of entries and time spent in open arms (Fig. 3B and 3E, Kruskal-Wallis test, $F=18.15$, $p=0.0004$ for entries in open arms and $F=20.69$, $p=0.0004$ for time spent in open arms, followed by Dunn's post-hoc test, $p < 0.05$ for 5-HT depletion and $p < 0.01$ for NA depletion). In contrast, anxiety behavior was not affected by 5-HT or NA depletion alone or combined in sham-lesioned rats (Fig. 3C and 3F, Kruskal-Wallis test, $F=0.42$, $p=0.94$ for entries in open arms and $F=3.28$, $p=0.35$ for time spent in open arms).

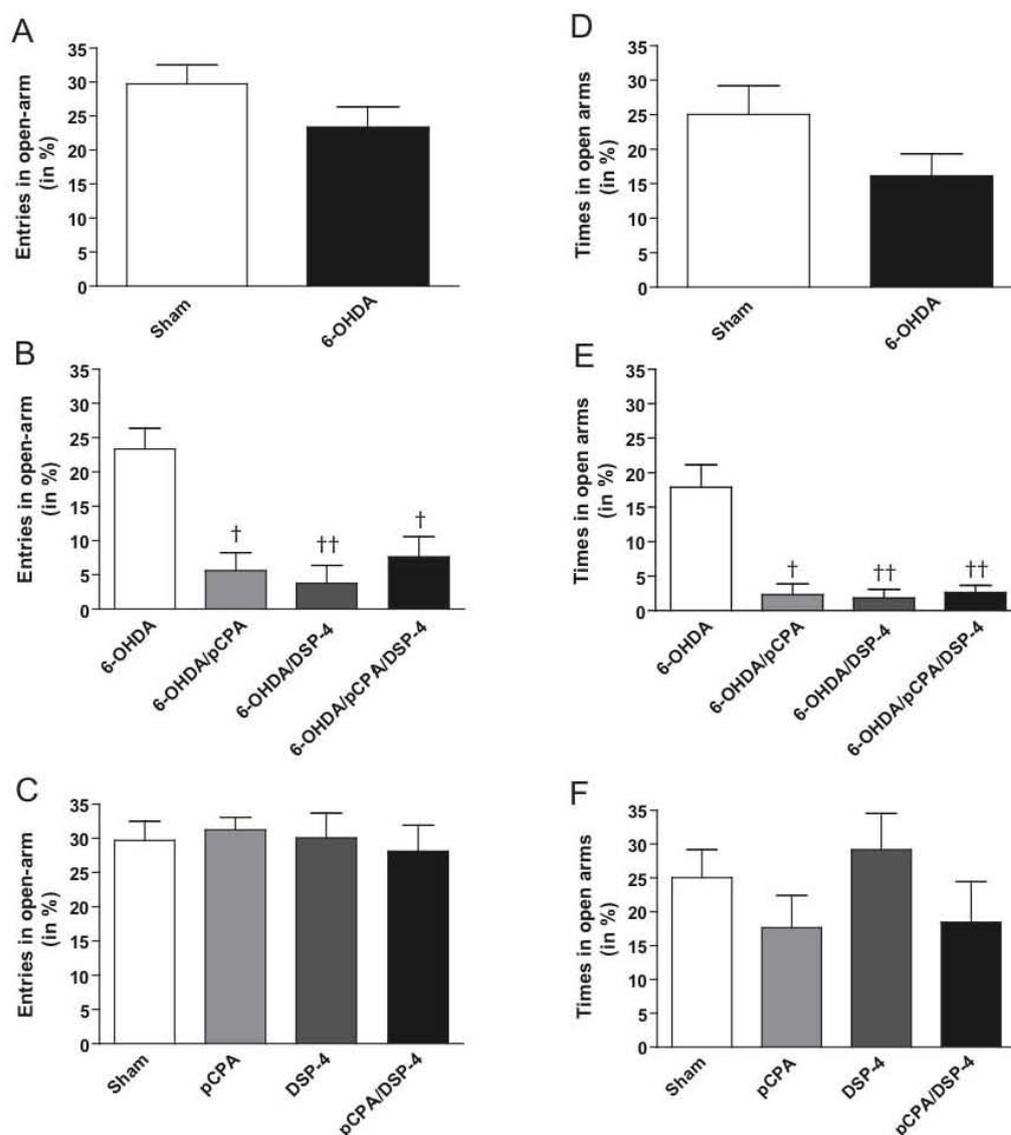


Figure 3. DA depletion is necessary to induce anxiety behavior but only when it is combined with NA depletion and/or that of 5-HT. Histograms showing the percentage of entries into the open arms of elevated plus maze relative to the total entries into the four arms (A-C). D-F: time spent in the open arms is in percentage of total time spent in the four arms. Values are the mean \pm SEM in sham and 6-OHDA rats (A); in 6-OHDA-lesioned groups (B) and in sham-lesioned groups (C). †: $p < 0.05$, ††: $p < 0.01$ in comparison with 6-OHDA group (Dunn's multiple comparison test).. $n=9$ rats in sham group, $n=21$ rats in 6-OHDA group, $n=6$ rats in pCPA group, $n=7$ rats in DSP-4 group, $n=8$ rats in pCPA/DSP-4 group, $n=6$ rats in 6-OHDA/pCPA group, $n=7$ rats in 6-OHDA/DSP-4 group and $n=8$ rats in 6-OHDA/pCPA/DSP-4 group.

3.4. Only combined depletion of the three monoamines decreased sucrose consumption and increased immobility time in the forced swim test

To evaluate mood behavioral disabilities we used two validated tests. The sucrose consumption is a widely used test for anhedonia and the forced swim test for depressive-like behavior.

3.4.1. Sucrose consumption

6-OHDA-lesioned rats did not show any change in sucrose consumption compared to sham-lesioned animals (Mann-Whitney test, $p > 0.05$, Fig. 4A). Interestingly, when NA and 5-HT depletions were combined with DA depletion, a significant decrease in sucrose consumption was observed (Kruskall-Wallis test, $F=13.48$, $p=0.004$ followed by Dunn's post-hoc test, $p < 0.01$, Fig. 4B). NA and 5-HT depletion did not induce any anhedonia behavior by themselves in 6-OHDA-lesioned animals (Dunn's post-hoc test, $p > 0.05$, Fig. 4B). However, 5-HT depletion and NA depletion, alone or combined together did not affect anhedonia behavior as the sucrose consumption was not significantly different from that of sham-lesioned animals (Kruskall-Wallis test, $F=2.41$, $p=0.49$, Fig. 4C).

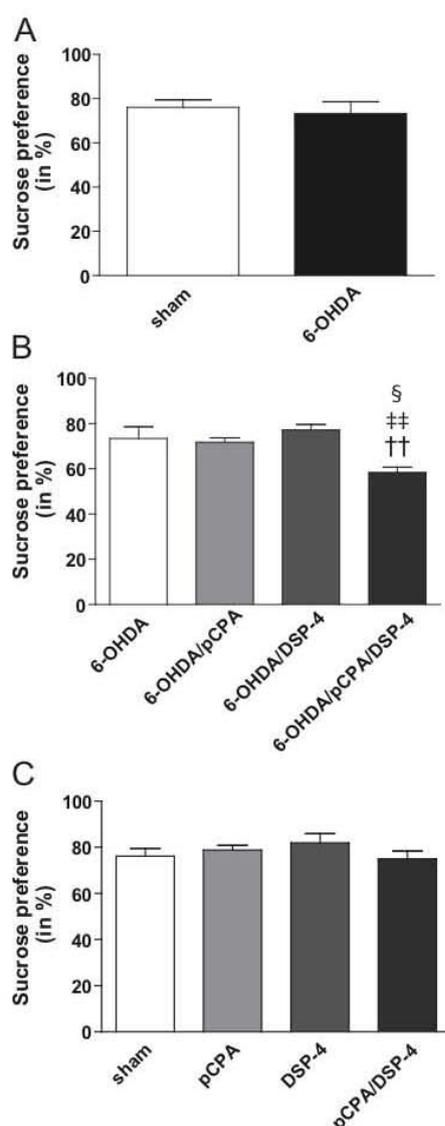


Figure 4. Only combined depletion of the three monoamines induces anhedonia behavior. Histograms represent the percentage of sucrose consumption relative to the total consumption. Values are the mean \pm SEM in sham and 6-OHDA rats (A); in 6-OHDA-lesioned groups (B) and (C) in sham-lesioned groups (B). $\dagger\dagger$: $p < 0.01$ in comparison with 6-OHDA group; $\ddagger\dagger$: $p < 0.01$ in comparison with 6-OHDA/pCPA group; \S : $p < 0.05$ in comparison with 6-OHDA/DSP-4 group (Dunn's multiple comparison test). $n=11$ rats in sham group, $n=10$ rats in 6-OHDA group, $n=8$ rats in pCPA group, $n=9$ rats in DSP-4 group, $n=6$ rats in pCPA/DSP-4 group, $n=12$ rats in 6-OHDA/pCPA group, $n=6$ rats in 6-OHDA/DSP-4 group and $n=10$ rats in 6-OHDA/pCPA/DSP-4 group.

3.4.2. *Forced swim test*

6-OHDA depletion alone did not produce any change in “depressive-like” behavior compared to sham-lesioned animals (Mann-Whitney test, $p>0.05$, Fig. 5A). However, as for sucrose consumption, combining 5-HT and NA depletions with DA depletion induced a significant increase in immobility time (Kruskal-Wallis test, $F=15.30$, followed by Dunn’s post-hoc test, $p=0.016$, Fig. 5B), whereas 5-HT depletion or NA depletion in 6-OHDA-lesioned animals did not induced by themselves any “depressive-like” behavior (Dunn’s post-hoc test, $p>0.05$, Fig. 5B). In the same manner, pCPA and DSP-4 depletions alone or combined together in sham-lesioned animals did not induce “depressive-like” behavior ($p>0.05$, Fig. 5C).

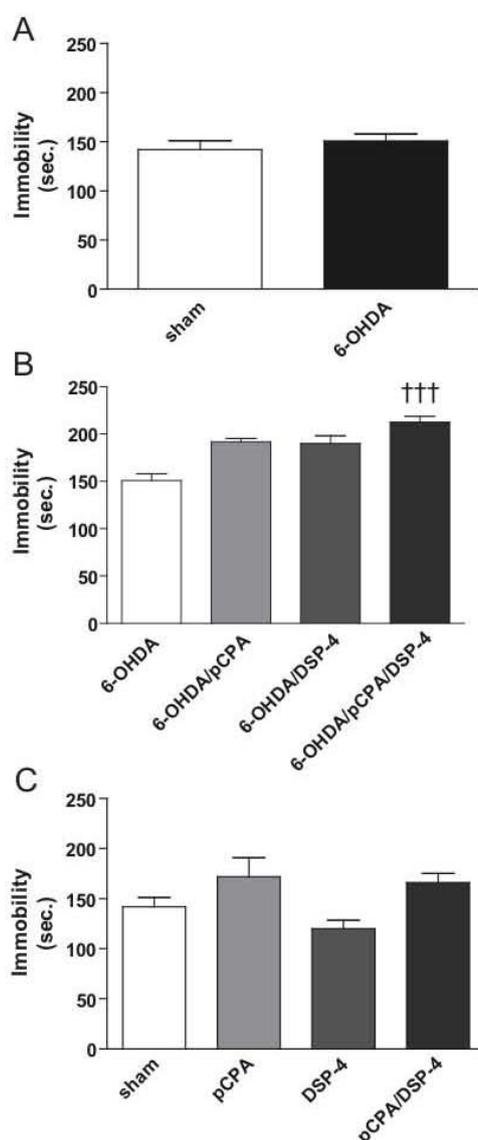


Figure 5. Only lesion of all three monoaminergic system induces “depressive-like” behavior. Histograms show the duration of immobility during the five minutes test. Values are the mean \pm SEM in sham and 6-OHDA rats (A); in 6-OHDA-lesioned groups (B) and in sham-lesioned groups (C). ^{†††}: $p < 0.001$ in comparison with 6-OHDA group (Dunn’s multiple comparison test). $n = 10$ rats in sham group, $n = 8$ rats in 6-OHDA group, $n = 8$ rats in pCPA group, $n = 8$ rats in DSP-4 group, $n = 9$ rats in pCPA/DSP-4 group, $n = 6$ rats in 6-OHDA/pCPA group, $n = 6$ rats in 6-OHDA/DSP-4 group and $n = 8$ rats in 6-OHDA/pCPA/DSP-4 group.

3.5. Effects of monoamine depletions on the firing activity of STN neurons

We investigated whether NA, DA and 5-HT depletion alone or combined induced changes in the firing rate and patterns of STN neurons

As previously reported (Belujon et al. 2007, Ni et al. 2001), 6-OHDA-lesion did not change the spontaneous firing rate of STN neurons compared to the sham-lesioned animals (Student *t*-test, $p=0.12$, Fig. 6A). Interestingly, when 6-OHDA-lesion was combined with both NA and 5-HT depletions, the firing rate of STN neurons was markedly and significantly increased (one-way ANOVA, $F=13.14$, $p<0.0001$, followed by Newman-Keuls multiple comparison post-hoc test, $p<0.001$; Fig. 6B). However, in 6-OHDA-lesioned rats, additional 5-HT or NA depletion singly did not induce any change in the firing rate (Newman-Keuls test, $p>0.05$; Fig. 6B).

In sham-lesioned animals, NA depletion alone or combined with 5-HT depletion significantly decreased the firing rate of STN neurons (Newman-Keuls test, $p<0.001$ after significant one way ANOVA, $F=5.63$, $p=0.001$, Fig. 6C). However, 5-HT depletion alone did not induce any effect by itself (Newman-Keuls post-hoc test, $p>0.05$; Fig. 6C).

Concerning the firing pattern, 6-OHDA-lesion significantly increased the proportion of STN neurons discharging with bursts compared to sham-lesioned animals (Chi² test, $X^2 = 15.7$, $df = 2$, $p<0.001$, Fig. 6D). The impact of additional depletions of NA and 5-HT differed between 6-OHDA-lesioned and sham-lesioned animals. In 6-OHDA-lesioned rats, the increase in the population of STN bursty neurons was not affected by 5-HT depletion alone or combined with NA depletion ($X^2 = 34.4$, $df = 6$, $p<0.001$ followed by $X^2 = 0.4$, $df = 2$ for 6-OHDA/pCPA group, $p>0.05$ and $X^2 = 0.3$, $df = 2$ for 6-OHDA/pCPA/DSP-4 group, $p>0.05$). However, NA depletion, when combined with 6-OHDA-lesion increased the proportion of irregular neurons ($X^2 = 19.1$, $df = 2$, $p<0.001$; Fig. 6E). Furthermore, NA depletion alone increased the proportion of bursty and irregular neurons compared to sham-lesioned rats ($X^2 =$

7.9, $df = 2$, $p < 0.01$; Fig. 2F). 5-HT depletion, which did not induce any effect by itself ($X^2 = 4.4$, $df = 2$, $p > 0.05$; Fig. 2F), when added to NA depletion did not affect the increase in the proportion of bursty and irregular neurons observed in DSP-4 group of animals ($X^2 = 11.49$, $df = 6$, $p > 0.05$ followed by $X^2 = 2$, $df = 2$, $p > 0.05$; Fig. 2F).

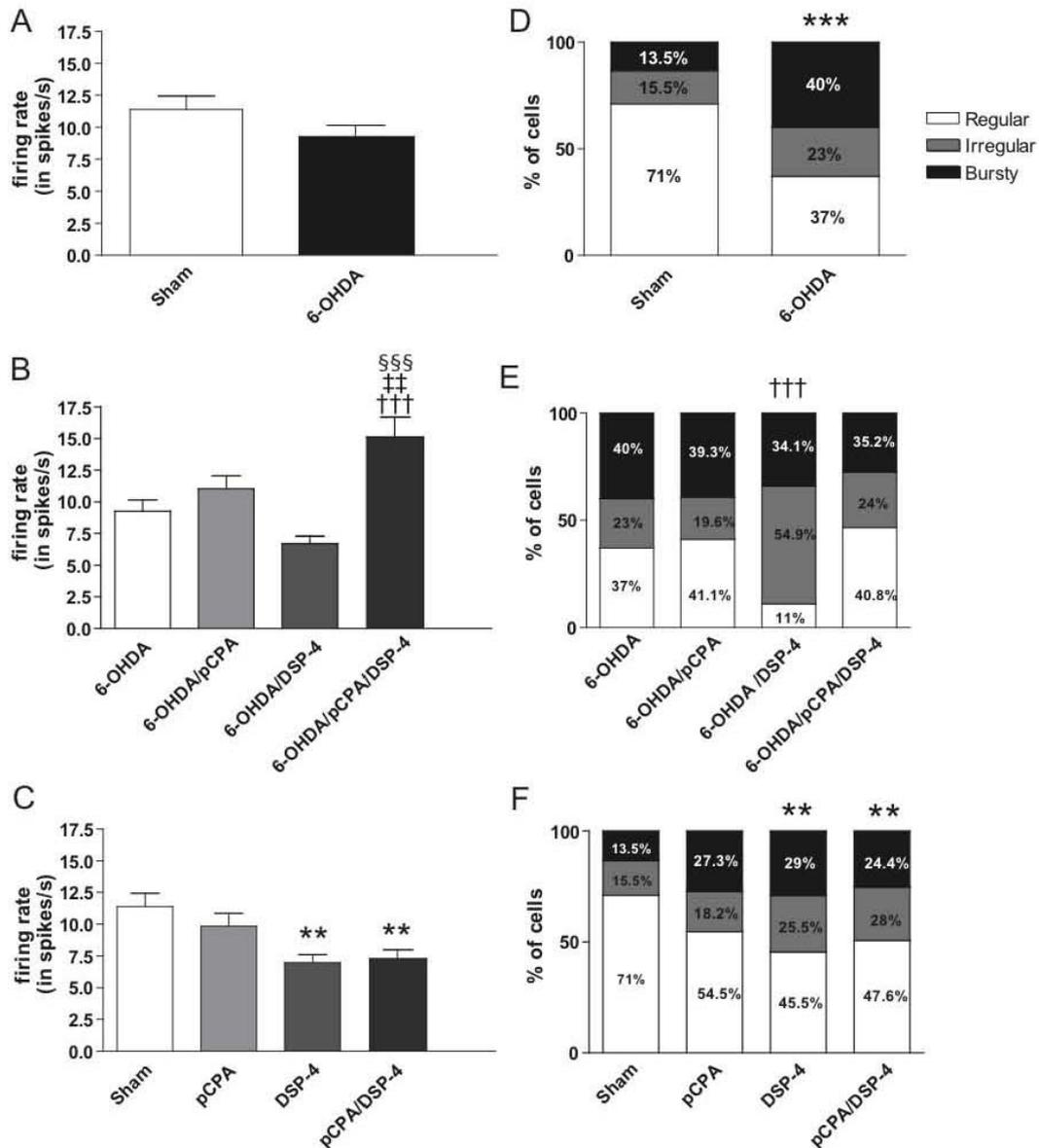


Figure 6. DSP-4 lesion alone, or combined with that of 6-OHDA or pCPA, decreases the firing rate and increases the proportion of bursty and irregular neurons. Combined depletion of the three monoamines increases the proportion of bursty and irregular neurons as well as the firing rate of STN neurons. A-C: Firing rate histograms, values are

the mean \pm SEM. D-F: Firing pattern histograms showing the proportion (in percent) of STN cells discharging regularly, irregularly or with bursts. Values are the mean \pm SEM in sham and 6-OHDA rats (A and D); in 6-OHDA-lesioned groups (B and E) and in sham-lesioned groups (C and F). **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, in comparison with sham. †††: $p < 0.001$ in comparison with 6-OHDA group. ‡‡: $p < 0.01$ in comparison with 6-OHDA/pCPA group; §§§: $p < 0.001$ in comparison with 6-OHDA/DSP-4 group (Newmann-Keuls test for firing rate (A-C) and χ^2 test for firing pattern(D-E)). n=59 neurons in sham group (n=12 rats), n=63 neurons in 6-OHDA group (n=10 rats), n=68 neurons in pCPA group (n=13 rats), n=55 neurons in DSP-4 group (n=5 rats), n=67 neurons in pCPA/DSP-4 group (n=6 rats), n=56 neurons in 6-OHDA/pCPA group (n=5 rats), n=82 neurons in 6-OHDA/DSP-4 group (n=5 rats) and n=58 neurons in 6-OHDA/pCPA/DSP-4 group (n=5 rats).

4. Discussion

The identification of specific neurochemical substrates that mediate the motor and non-motor disorders is important because it provides insight into strategies for developing more effective treatments of different symptoms of PD. The results of the present study provide evidence that (1) NA, like DA, is essential in the control of motor behavior and that its depletion results in hypokinesia, (2) the manifestation of anhedonia and “depressive-like” behavior is due to the combined depletion of the three monoamines DA, NA and 5-HT, (3) anxiety behavior is a consequence of DA depletion, only when combined with that of NA and/or 5-HT.

4.1. NA depletion, like DA depletion, reduced locomotor activity

One of the main finding showed that NA depletion induced severe motor deficits that resemble to those reported after 6-OHDA-lesion. The extent of NA depletion we obtained

after DSP-4 treatment corresponds closely to that reported in advanced stages of Parkinson's disease ($\geq 80\%$, Taquet et al., 1982; Gaspar et al., 1991; Jenner et al., 1983; Chan-Palay and Asan, 1989). In contrast to 6-OHDA lesion (Deumens *et al.* 2002), the motor impairments consequent to NA depletion were not related to DA depletion. Indeed, as previously reported (Dailly *et al.* 2006, Fritschy & Grzanna 1991), DSP-4 provoked a specific degeneration of NA terminals from the LC in mice and rats without affecting 5-HT or DA systems. Furthermore, the hypolocomotor activity observed after NA depletion is not due to a lack of motivation as we show that this depletion alone or combined with that of DA did not induce any “depressive-like” behavior and anhedonia (see below).

The motor deficits noticed in 6-OHDA-lesioned animals were not aggravated by the additional NA depletion, as evidenced by hypolocomotor activity and the lack of catalepsy. This fits with the study of Srinivasan and Schmidt (2003), which reported that denervation of LC NAergic terminals potentiated the 6-OHDA-induced partial DAergic neurodegeneration and akinesia only in rats treated with a D2 receptor antagonist, haloperidol. However, other studies carried out in MPTP-treated mice have reported that NA depletion by DSP-4 increased parkinsonism (Archer & Fredriksson 2006). These discrepancies can be explained by the fact that, although MPTP effectively mimics the DAergic neuropathology of PD, NA loss produces more profound motor deficits than MPTP treatment in mice (Rommelfanger *et al.* 2007).

From a pathophysiological point of view, the lack of additional deficits in motor behavior produced by DA or NA depletion suggests a convergence of these monoamines on the same circuit involved in motor behavior. This hypothesis is compatible with our electrophysiological data showing that both DA and NA depletions induced similar increases in the number of STN neurons discharging with burst and irregular patterns compared to control animals. Additionally, we cannot totally exclude that the decrease in STN neuronal

firing rate may participate in alterations of motor behavior in the case of NA depletion alone. Nevertheless, it should be noted that the firing rate has been reported as an unstable parameter in animal models of parkinsonism (Belujon et al. 2007, Bergman et al. 1994, Hassani *et al.* 1996, Meissner *et al.* 2005, Ni et al. 2001, Tai *et al.* 2003). Indeed, the same studies reported that the most relevant pathological parameter is the firing pattern. Indeed, the same studies have reported that the most relevant pathological parameter is the firing pattern. The reasons for the profound behavioral and electrophysiological alterations induced by NA depletion are unclear presently. It could result from the removal of a direct action of NA in the STN (Belujon et al. 2007) as this nucleus receives NAergic innervations from the LC and expresses alpha 1 and 2 receptors (for review, Delaville et al., 2011). Alternatively, it could be related to the loss of a NA control on the firing activity of SNc DA neurons and striatal DA release. Indeed, it has been shown that central NA facilitates nigro-striatal dopamine transmission *in vivo* (Lategan *et al.* 1992, Schank *et al.* 2006). These authors have shown that selective reduction in the level of NA decreased the concentration of endogenous DA in the striatum. NA depletion decreased the neuronal activity of SNc DA neurons, which mimicked the consequences of DA depletion (for review, Delaville et al., 2011).

4.2. Only combined depletion of the three monoamines induced anhedonia and “depressive-like” behavior

We found that 5-HT, NA or DA depletion alone did not induce anhedonia or “depressive-like” behavior, evaluated by the sucrose preference test and the forced swim test, respectively (Tadaiesky *et al.* 2008, Detke et al. 1995). These findings fit with a study using 5-HT or NA depletions with various neurotoxins that showed no difference in baseline immobility in the forced swim test (Lucki & O’Leary 2004). The lack of effect of DA

depletion alone on anhedonia and “depressive-like” behavior could be due to the DA depletion being only unilateral. We did not perform bilateral injection of 6-OHDA because it is known to induce severe aphagia and high death rate, which would bias the outcomes of the study. For this reason we have used the classical rat model of PD. This unilateral depletion model is commonly used and it is therefore necessary to characterize its behavioral consequences. In addition, as some behavioral symptoms, such as motor deficits, were found with unilateral DA depletion, this type of lesion could be considered to be sufficient to reveal other symptoms, such as anhedonia and “depressive-like” behavior if they are caused by DA depletion. Our results challenge those of Tadaiesky and colleagues (2008). However, the discrepancy could be related to the different time frame for the experiments in both studies. Tadaiesky and colleagues tested their animals one week after 6-OHDA injection, while our tests were carried out three to four weeks after DA depletion. Previous studies have reported that the stable stage of behavioral deficits, as well as the pathological activity in basal ganglia nuclei, appeared 2 to 3 weeks after the injection of 6-OHDA (Neve *et al.* 1982, Ni *et al.* 2001, Orioux *et al.* 2000).

Together, these observations suggest that NA and 5-HT are not necessary for the tonic regulation of baseline performance in these non-motor tasks, although it is possible that compensatory mechanisms from other neurotransmitters, such as DA, stabilize the behavior. Interestingly, only combined depletion of the three monoamines induced anhedonia and “depressive-like” behavior in rats as revealed by the sucrose preference and forced swim tests. It is unlikely that the decrease in sucrose consumption can be a consequence of olfactory or gustatory dysfunctions observed in PD (Ponsen *et al.* 2004) because the animals still had a preference for sucrose solution rather than water. Previous anatomical and electrophysiological studies have shown the existence of reciprocal and functional relationships between the three monoaminergic systems (Aston-Jones *et al.* 1991, Guiard *et*

al. 2008). In addition, *in vivo* microdialysis studies reported that the improvement of “depressive-like” behavior induced by antidepressants, such as selective serotonin reuptake inhibitors, is accompanied by an increase in the level of all three monoamines, 5-HT, NA and DA (Damsa *et al.* 2004, Hajos-Koresok *et al.* 2000). Consequently, the non-motor abnormalities reported in our study could result from the loss of the interaction of the three monoaminergic systems.

Supporting this possibility, we found that only the combination of all monoamine depletions enhanced the firing rate of STN neurons, in addition to producing burst activity and irregular pattern of discharge due to the loss of DA and/or NA systems. It is possible that this additional alteration in the STN neuronal activity participates in associative and limbic dysfunctions (Gubellini *et al.* 2009, Temel *et al.* 2005). Indeed, implication of the STN in non-motor disorders is argued for by a number of studies in patients reporting that STN high frequency stimulation (HFS), which improves motor disabilities (Limousin *et al.* 1995), may induce behavioral changes such as depression (Gubellini *et al.* 2009, Temel *et al.* 2005). Similar abnormalities were also observed in the 6-OHDA rat model of parkinsonism submitted to STN HFS (Temel *et al.* 2007). “Depressive-like” behavior in this animal model was paralleled by a decrease in the firing activity of 5-HT dorsal raphe neurons (Temel *et al.* 2007) and 5-HT release in several brain regions (Navailles *et al.* 2010).

4.3. DA depletion is necessary, but not sufficient alone, to induce anxiety behavior

A single depletion of DA, NA or 5-HT did not change the time spent in the open-arms or the number of entries into open-arms in the elevated plus maze, whereas NA and/or 5-HT depletions combined with that of DA induced anxiety behavior. The performance in the test is not affected by the motor deficiency because DA or NA depletion, both inducing motor

deficits, did not induce anxiety behavior alone. Thus, our study is the first to show that DA depletion is necessary, but not sufficient alone to induce an anxious phenotype. Little is known about the interaction between the three monoamines in anxiety behavior. Taylor et al. (2009) reported anxiety behavior in a genetic deficient mice for vesicular monoamine transporter (VMAT2)-, a situation associated with the severe depletion of the three monoamines. This model is the equivalent of our group with a depletion of the three monoamines. However, it was not possible with their transgenic model to determine whether DA, NA or 5-HT was predominant in the observed effect. Although STN HFS has been shown to improve anxiety compared with the conventional and best medical treatment in a controlled clinical study (Witt *et al.* 2008), our electrophysiological results did not show any specific change in the firing activity of STN neurons related to anxiety behavior.

4.4. Clinical relevance

Our data offer an interesting echo to the hypothesis of Braak et al. (2003) that proposed a progressive caudo-rostral alteration of monoaminergic centers in the symptomatology of PD. In particular, NA neurons would be the first system altered and we show that NA depletion is as detrimental as DA lesion with regard to motor deficits and the pathological activity of STN neurons. Fundamentally, PD symptomatology does not result solely from lesion of DA neurons and we show that deleterious and non-motor symptoms emerge from the combined and cumulative loss of the other monoaminergic systems. Anxiety and depression frequently occur, and often coexist, in PD patients with a similar prevalence of 40-45% across studies (Menza *et al.* 1993, Walsh & Bennett 2001). Clinically, anxiety can occur as a DA-dependent event and would therefore respond to DAergic treatments. Our results in rats show that anxiety could reflect at least the existence of two depletions including

that of DA. Of note, it can also remain a constant underlying problem that is independent of DAergic state in non-parkinsonian patients (Richard *et al.* 1996). Depression in PD could also bear witness to the cell loss in the NA (Chan-Palay & Asan 1989) and 5-HT (Kish 2003, Kish *et al.* 2008) systems in addition to that of DA system. Additional systematic analyses of all the monoaminergic systems are needed to confirm this hypothesis. Taken together, our data suggest that motor deficits are associated with a loss of DA and/or NA function and non-motor symptoms are a consequence of DA dysfunction concomitant with NA and/or 5-HT depletion.

In conclusion, the present study provides new insights into the respective roles of monoamines in the manifestation of parkinsonian-like motor and non-motor symptoms. We propose that PD should be modeled as a monoaminergic pathology that is the result of more than the loss of the DA system.

Acknowledgments

Claire Delaville was supported by a fellowship from the "Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie" (MENRT). The University Bordeaux Segalen and the "Centre National de la Recherche Scientifique" (CNRS) funded this study. We wish to thank Dr. Martin Guthrie for english reading and Dr. Erwan Bezar for critical reading of the manuscript.

Disclosure statement

All co-authors disclose any actual or potential conflicts of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the work submitted that could inappropriately influence their work. This article has not been submitted elsewhere. All co-authors have seen and agree with the contents of the manuscript.

References

- Archer, T. and Fredriksson, A. (2006) Influence of noradrenaline denervation on MPTP-induced deficits in mice. *J Neural Transm*, **113**, 1119-1129.
- Aston-Jones, G., Akaoka, H., Charlety, P. and Chouvet, G. (1991) Serotonin selectively attenuates glutamate-evoked activation of noradrenergic locus coeruleus neurons. *J Neurosci*, **11**, 760-769.
- Belujon, P., Bezard, E., Taupignon, A., Bioulac, B. and 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, A. L., Krack, P. P., Benazzouz, A., Limousin, P., Koudsie, A. and Pollak, P. (2000) Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus for Parkinson's disease: methodologic aspects and clinical criteria. *Neurology*, **55**, S40-44.
- Benazzouz, A., Breit, S., Koudsie, A., Pollak, P., Krack, P. and Benabid, A. L. (2002) Intraoperative microrecordings of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease. *Mov Disord*, **17 Suppl 3**, S145-149.
- Benazzouz, A., Gross, C., Feger, J., Boraud, T. and 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. and DeLong, M. R. (1990) Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science*, **249**, 1436-1438.
- Bergman, H., Wichmann, T., Karmon, B. and DeLong, M. R. (1994) The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism. *J Neurophysiol*, **72**, 507-520.
- Bertrand, E., Lechowicz, W., Szpak, G. M. and Dymecki, J. (1997) Qualitative and quantitative analysis of locus coeruleus neurons in Parkinson's disease. *Folia Neuropathol*, **35**, 80-86.
- Boyajian, C. L., Loughlin, S. E. and Leslie, F. M. (1987) Anatomical evidence for alpha-2 adrenoceptor heterogeneity: differential autoradiographic distributions of [3H]rauwolscine and [3H]idazoxan in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*, **241**, 1079-1091.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R. A., Jansen Steur, E. N. and Braak, E. (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, **24**, 197-211.
- Canteras, N. S., Shammah-Lagnado, S. J., Silva, B. A. and Ricardo, J. A. (1990) Afferent connections of the subthalamic nucleus: a combined retrograde and anterograde horseradish peroxidase study in the rat. *Brain Res*, **513**, 43-59.
- Cervo, L., Grignaschi, G., Rossi, C. and Samanin, R. (1991) Role of central serotonergic neurons in the effect of sertraline in rats in the forced swimming test. *Eur J Pharmacol*, **196**, 217-222.
- Chan-Palay, V. and Asan, E. (1989) Alterations in catecholamine neurons of the locus coeruleus in senile dementia of the Alzheimer type and in Parkinson's disease with and without dementia and depression. *J Comp Neurol*, **287**, 373-392.
- Chetrit, J., Ballion, B., Laquitaine, S., Belujon, P., Morin, S., Taupignon, A., Bioulac, B., Gross, C. E. and Benazzouz, A. (2009) Involvement of Basal Ganglia network in motor disabilities induced by typical antipsychotics. *PLoS One*, **4**, e6208.
- Dailly, E., Chenu, F., Petit-Demouliere, B. and Bourin, M. (2006) Specificity and efficacy of noradrenaline, serotonin depletion in discrete brain areas of Swiss mice by neurotoxins. *J Neurosci Methods*, **150**, 111-115.

- Damsa, C., Bumb, A., Bianchi-Demicheli, F., Vidailhet, P., Sterck, R., Andreoli, A. and Beyenburg, S. (2004) "Dopamine-dependent" side effects of selective serotonin reuptake inhibitors: a clinical review. *J Clin Psychiatry*, **65**, 1064-1068.
- De Deurwaerdere, P., Bonhomme, N., Le Moal, M. and Spampinato, U. (1995) d-fenfluramine increases striatal extracellular dopamine in vivo independently of serotonergic terminals or dopamine uptake sites. *J Neurochem*, **65**, 1100-1108.
- De Deurwaerdere, P. and Chesselet, M. F. (2000) Nigrostriatal lesions alter oral dyskinesia and c-Fos expression induced by the serotonin agonist 1-(m-chlorophenyl)piperazine in adult rats. *J Neurosci*, **20**, 5170-5178.
- Delaville, C., Deurwaerdère, P.D., Benazzouz, A. (2011) Noradrenaline and Parkinson's disease. *Front Syst Neurosci*. **5**,31. Epub 2011 May 18.
- Detke, M. J., Rickels, M. and Lucki, I. (1995) Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)*, **121**, 66-72.
- Deumens, R., Blokland, A. and Prickaerts, J. (2002) Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol*, **175**, 303-317.
- Ehringer, H. and 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.
- Fornai, F., di Poggio, A. B., Pellegrini, A., Ruggieri, S. and Paparelli, A. (2007) Noradrenaline in Parkinson's disease: from disease progression to current therapeutics. *Curr Med Chem*, **14**, 2330-2334.
- Fornai, F., Giorgi, F. S., Gesi, M., Chen, K., Alessri, M. G. and Shih, J. C. (2001) Biochemical effects of the monoamine neurotoxins DSP-4 and MDMA in specific brain regions of MAO-B-deficient mice. *Synapse*, **39**, 213-221.
- Fritschy, J. M. and Grzanna, R. (1989) Immunohistochemical analysis of the neurotoxic effects of DSP-4 identifies two populations of noradrenergic axon terminals. *Neuroscience*, **30**, 181-197.
- Fritschy, J. M. and Grzanna, R. (1991) Selective effects of DSP-4 on locus coeruleus axons: are there pharmacologically different types of noradrenergic axons in the central nervous system? *Prog Brain Res*, **88**, 257-268.
- Gaspar, P., Duyckaerts, C., Alvarez, C., Javoy-Agid, F., Berger, B. (1991) Alterations of dopaminergic and noradrenergic innervations in motor cortex in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. **30**, 365-374.
- Grzanna, R., Berger, U., Fritschy, J. M. and Geffard, M. (1989) Acute action of DSP-4 on central norepinephrine axons: biochemical and immunohistochemical evidence for differential effects. *J Histochem Cytochem*, **37**, 1435-1442.
- Gubellini, P., Salin, P., Kerkerian-Le Goff, L. and Baunez, C. (2009) Deep brain stimulation in neurological diseases and experimental models: from molecule to complex behavior. *Prog Neurobiol*, **89**, 79-123.
- Guiard, B. P., El Mansari, M., Merali, Z. and Blier, P. (2008) Functional interactions between dopamine, serotonin and norepinephrine neurons: an in-vivo electrophysiological study in rats with monoaminergic lesions. *Int J Neuropsychopharmacol*, **11**, 625-639.
- Guridi, J. and Obeso, J. A. (2001) The subthalamic nucleus, hemiballismus and Parkinson's disease: reappraisal of a neurosurgical dogma. *Brain*, **124**, 5-19.
- Hajos-Korcsok, E., McTavish, S. F. and Sharp, T. (2000) Effect of a selective 5-hydroxytryptamine reuptake inhibitor on brain extracellular noradrenaline: microdialysis studies using paroxetine. *Eur J Pharmacol*, **407**, 101-107.

- Halliday, G. M., Blumbergs, P. C., Cotton, R. G., Blessing, W. W. and Geffen, L. B. (1990) Loss of brainstem serotonin- and substance P-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain Res*, **510**, 104-107.
- Hassani, O. K., Mouroux, M. and Feger, J. (1996) Increased subthalamic neuronal activity after nigral dopaminergic lesion independent of disinhibition via the globus pallidus. *Neuroscience*, **72**, 105-115.
- Hoyer, D., Clarke, D. E., Fozard, J. R., Hartig, P. R., Martin, G. R., Mylecharane, E. J., Saxena, P. R. and Humphrey, P. P. (1994) International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev*, **46**, 157-203.
- Hutchison, W. D., Allan, R. J., Opitz, H., Levy, R., Dostrovsky, J. O., Lang, A. E. and Lozano, A. M. (1998) Neurophysiological identification of the subthalamic nucleus in surgery for Parkinson's disease. *Ann Neurol*, **44**, 622-628.
- Jenner, P., Sheehy, M., Marsden, C.D. (1983) Noradrenaline and 5-hydroxytryptamine modulation of brain dopamine function: implications for the treatment of Parkinson's disease. *Br J Clin Pharmacol*. **15 Suppl 2**, 277S-289S.
- Kaneoke, Y. and Vitek, J. L. (1996) Burst and oscillation as disparate neuronal properties. *J Neurosci Methods*, **68**, 211-223.
- Kish, S. J. (2003) Biochemistry of Parkinson's disease: is a brain serotonergic deficiency a characteristic of idiopathic Parkinson's disease? *Adv Neurol*, **91**, 39-49.
- Kish, S. J., Tong, J., Hornykiewicz, O., Rajput, A., Chang, L. J., Guttman, M. and Furukawa, Y. (2008) Preferential loss of serotonin markers in caudate versus putamen in Parkinson's disease. *Brain*, **131**, 120-131.
- Labarre, D., Meissner, W. and Boraud, T. (2008) Measure of the regularity of events in stochastic point processes, application to neuron activity analysis. In: *33rd IEEE International Conference on Acoustics*, Vol. Speech and Signal Processing, pp. 489-492. Las Vegas, NV.
- Lategan, A. J., Marien, M. R. and Colpaert, F. C. (1992) Suppression of nigrostriatal and mesolimbic dopamine release in vivo following noradrenaline depletion by DSP-4: a microdialysis study. *Life Sci*, **50**, 995-999.
- Limousin, P., Pollak, P., Benazzouz, A., Hoffmann, D., Le Bas, J. F., Broussolle, E., Perret, J. E. and Benabid, A. L. (1995) Effect of parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation. *Lancet*, **345**, 91-95.
- Loughlin, S. E., Foote, S. L. and Fallon, J. H. (1982) Locus coeruleus projections to cortex: topography, morphology and collateralization. *Brain Res Bull*, **9**, 287-294.
- Lucki, I. and O'Leary, O. F. (2004) Distinguishing roles for norepinephrine and serotonin in the behavioral effects of antidepressant drugs. *J Clin Psychiatry*, **65 Suppl 4**, 11-24.
- Meissner, W., Leblois, A., Hansel, D., Bioulac, B., Gross, C. E., Benazzouz, A. and Boraud, T. (2005) Subthalamic high frequency stimulation resets subthalamic firing and reduces abnormal oscillations. *Brain*, **128**, 2372-2382.
- Menza, M. A., Robertson-Hoffman, D. E. and Bonapace, A. S. (1993) Parkinson's disease and anxiety: comorbidity with depression. *Biol Psychiatry*, **34**, 465-470.
- Murai, T., Muller, U., Werheid, K., Sorger, D., Reuter, M., Becker, T., von Cramon, D. Y. and Barthel, H. (2001) In vivo evidence for differential association of striatal dopamine and midbrain serotonin systems with neuropsychiatric symptoms in Parkinson's disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, **13**, 222-228.
- Navailles, S., Benazzouz, A., Bioulac, B., Gross, C. and De Deurwaerdere, P. (2010) High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus and L-3,4-dihydroxyphenylalanine inhibit in vivo serotonin release in the prefrontal cortex and hippocampus in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci*, **30**, 2356-2364.

- Neve, K. A., Kozlowski, M. R. and Marshall, J. F. (1982) Plasticity of neostriatal dopamine receptors after nigrostriatal injury: relationship to recovery of sensorimotor functions and behavioral supersensitivity. *Brain Res*, **244**, 33-44.
- Ni, Z. G., Bouali-Benazzouz, R., Gao, D. M., Benabid, A. L. and 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.
- Orieux, G., Francois, C., Feger, J., Yelnik, J., Vila, M., Ruberg, M., Agid, Y. and Hirsch, E. C. (2000) Metabolic activity of excitatory parafascicular and pedunculopontine inputs to the subthalamic nucleus in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, **97**, 79-88.
- Paxinos, G. and Watson, C. (1996) *The Rat Brain in Stereotatic Coordinates*. Academic Press, San Diego.
- Ponsen, M. M., Stoffers, D., Booij, J., van Eck-Smit, B. L., Wolters, E. and Berendse, H. W. (2004) Idiopathic hyposmia as a preclinical sign of Parkinson's disease. *Ann Neurol*, **56**, 173-181.
- Porsolt, R. D., Anton, G., Blavet, N. and Jalfre, M. (1978) Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol*, **47**, 379-391.
- Richard, I. H., Schiffer, R. B. and Kurlan, R. (1996) Anxiety and Parkinson's disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, **8**, 383-392.
- Rommelfanger, K. S., Edwards, G. L., Freeman, K. G., Liles, L. C., Miller, G. W. and Weinshenker, D. (2007) Norepinephrine loss produces more profound motor deficits than MPTP treatment in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 13804-13809.
- Schank, J. R., Ventura, R., Puglisi-Allegra, S., Alcaro, A., Cole, C. D., Liles, L. C., Seeman, P. and Weinshenker, D. (2006) Dopamine beta-hydroxylase knockout mice have alterations in dopamine signaling and are hypersensitive to cocaine. *Neuropsychopharmacology*, **31**, 2221-2230.
- Sclafani, A. and Ackroff, K. (2003) Reinforcement value of sucrose measured by progressive ratio operant licking in the rat. *Physiol Behav*, **79**, 663-670.
- Srinivasan, J. and Schmidt, W. J. (2003) Potentiation of parkinsonian symptoms by depletion of locus coeruleus noradrenaline in 6-hydroxydopamine-induced partial degeneration of substantia nigra in rats. *Eur J Neurosci*, **17**, 2586-2592.
- Steinbusch, H. W. (1981) Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience*, **6**, 557-618.
- Tadaiesky, M. T., Dombrowski, P. A., Figueiredo, C. P., Cargnin-Ferreira, E., Da Cunha, C. and Takahashi, R. N. (2008) Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, **156**, 830-840.
- Tai, C. H., Boraud, T., Bezard, E., Bioulac, B., Gross, C. and 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.
- Taquet, H., Javoy-Agid, F., Cesselin, F., Hamon, M., Legrand, J.C., Agid Y. (1982) Microtopography of methionine-enkephalin, dopamine and noradrenaline in the ventral mesencephalon of human control and Parkinsonian brains. *Brain Res*. 235, 303-314.
- Taylor, T. N., Caudle, W. M., Shepherd, K. R., Noorian, A., Jackson, C. R., Iuvone, P. M., Weinshenker, D., Greene, J. G. and Miller, G. W. (2009) Nonmotor symptoms of Parkinson's disease revealed in an animal model with reduced monoamine storage capacity. *J Neurosci*, **29**, 8103-8113.

- Temel, Y., Blokland, A., Steinbusch, H. W. and Visser-Vandewalle, V. (2005) The functional role of the subthalamic nucleus in cognitive and limbic circuits. *Prog Neurobiol*, **76**, 393-413.
- Temel, Y., Boothman, L. J., Blokland, A., Magill, P. J., Steinbusch, H. W., Visser-Vandewalle, V. and Sharp, T. (2007) Inhibition of 5-HT neuron activity and induction of depressive-like behavior by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 17087-17092.
- Tordoff, M. G. and Bachmanov, A. A. (2003) Mouse taste preference tests: why only two bottles? *Chem Senses*, **28**, 315-324.
- Walsh, K. and Bennett, G. (2001) Parkinson's disease and anxiety. *Postgrad Med J*, **77**, 89-93.
- Wieland, S., Kreider, M. S., McGonigle, P. and Lucki, I. (1990) Destruction of the nucleus raphe obscurus and potentiation of serotonin-mediated behaviors following administration of the neurotoxin 3-acetylpyridine. *Brain Res*, **520**, 291-302.
- Witt, K., Daniels, C., Reiff, J. et al. (2008) Neuropsychological and psychiatric changes after deep brain stimulation for Parkinson's disease: a randomised, multicentre study. *Lancet Neurol*, **7**, 605-614.

I.3. Article 2: Effects of noradrenaline and serotonin depletions on the electrical activity of globus pallidus and substantia nigra reticulata neurons in experimental parkinsonism

Claire Delaville, Sylvia Navailles and Abdelhamid Benazzouz,

ABSTRACT

Parkinson's disease is characterized by a degeneration of dopaminergic neurons and also by a degradation of noradrenergic neurons from the locus coeruleus and serotonergic neurons from the dorsal raphe. However, the effect of these depletions on the neuronal activity of basal ganglia nuclei is still unknown. We have addressed this question by testing the effects of selective depletions of noradrenaline (NA) and serotonin (5-HT) on the neuronal activity of globus pallidus (GP) and substantia nigra *pars reticulata* (SNr) neurons in sham- and 6-hydroxydopamine-lesioned rats using extracellular single unit recordings. We show that NA depletion alone did not change GP and SNr neuronal activity whereas 5-HT depletion decreased the firing rate and increased the proportion of bursty and irregular neurons in both the GP and SNr. 6-OHDA-induced DA depletion resulted in changes of the firing pattern of GP and SNr neurons confirming the results reported in previous studies. These pattern changes were not significantly influenced by additional NA or 5-HT depletion but tended to accumulate when both 6-OHDA and pCPA treatments were combined. Results of the present study provide evidence that NA depletion does not modulate GP and SNr neuronal activity whereas 5-HT depletion plays a major role in the modulation of both the firing rate and patterns of GP and SNr neurons. Furthermore, we show that the changes in GP and SNr neuronal activity after DA depletion were not modified by additional NA or 5-HT depletion suggesting that, in the context of experimental Parkinsonism, the modulatory role of these monoamines in GP and SNr is more complex than expected.

Keywords: dopamine; noradrenaline; serotonin; globus pallidus; substantia nigra pars reticulata; Parkinson's disease; extracellular recordings.

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is a neurological disorder characterized by the manifestation of motor and non-motor symptoms, attributed to the degeneration of dopamine (DA) neurons of the substantia nigra *pars compacta* (SNc) (Ehringer and Hornykiewicz, 1960). Other neurotransmitter systems are affected as well, such as noradrenaline (NA) (Bertrand et al., 1997; Delaville et al., 2011) and serotonin (5-HT) systems (Kish, 2003; Kish et al., 2008). Indeed, neurodegeneration of the locus cœruleus (LC), the principal source of NAergic projections in the brain (Chan-Palay and Asan, 1989; Chan-Palay, 1991), is another landmark of the disease that plays a role in motor and non-motor symptoms (Donaldson et al., 1976; Rommelfanger et al., 2007; Delaville et al., 2011). Neurodegeneration of 5-HTergic neurons from the dorsal raphe (DR) in animal models of PD has been shown to play a role in non-motor symptoms as anxiety and “depressive-like” behaviour (Temel et al., 2005). Despite the focus on DA depletion effect on basal ganglia disturbances, little is known about 5-HTergic and NAergic depletion effects on basal ganglia neuronal activity in the context of PD.

It has been shown that subthalamic nucleus (STN) neurons, a basal ganglia nucleus playing a key role in the pathophysiology of PD, become irregular and bursty in the 6-OHDA rat model of PD (Ni et al., 2001), in MPTP-treated monkeys (Bergman et al., 1994) and in parkinsonian patients (Hutchison et al., 1998; Benazzouz et al., 2002), but also after NA depletion alone or combined with DA depletion in the rat (Delaville et al., 2011). These pathological irregular and bursty patterns have also been reported in the globus pallidus (GPe) and substantia nigra pars reticulata (SNr) of PD patients (Benazzouz et al., 1993; Sterio et al., 1994; Hutchison et al., 1998; Benazzouz et al., 2002). In rats, it has been shown that DA depletion did not change the firing rate of GP (Ni et al., 2000; Breit et al., 2007) and SNr neurons (Murer et al., 1997; Tai et al., 2003) but modified the firing pattern by increasing the

proportion of bursty and irregular neurons in these two nuclei (Pan and Walters, 1988; Burbaud et al., 1995; Hassani et al., 1996; Ni et al., 2000; Tai et al., 2003).

While a few NA afferents directly innervate GP and SNr neurons (Pifl et al., 1991), these two structures are major targets of 5-HTergic neurons (Pifl et al., 1991). Indeed, local 5-HT injection increased the firing rate of GP and SNr neurons (Rick et al., 1995; Querejeta et al., 2005; Chen et al., 2008). Therefore we could hypothesize that defective NAergic or 5-HTergic neurotransmission in PD could directly or indirectly influence the electrical activity of these two basal ganglia structures as we have already shown in STN (Delaville et al., 2011).

The present study aimed at investigating the effects of NA and 5-HT depletions on the electrical activity of GP and SNr neurons in the context of PD. Single cell electrophysiology recording has been performed in rats bearing NA or 5-HT depletions alone or combined with DA lesion.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Adult male Sprague-Dawley rats, weighing 280-380g were used. 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).

Drugs

6-hydroxydopamine (6-OHDA), N-(2-Chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine hydrochloride (DSP-4), 4-Chloro-L-phenylalanine (pCPA), ascorbic acid, desipramine (DMI) and all anesthesia drug were purchased from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France).

Monoamine depletion procedures

The present study was carried out on six groups of animals (cf. Figure 1). Each rat received either 6-hydroxydopamine (6-OHDA rats) or NaCl 0.9% (sham rats) into the right medial forebrain bundle (MFB). Two weeks later, 6-OHDA and sham rats received either DSP-4 (DSP-4 and 6-OHDA/DSP-4 rats), pCPA (pCPA and 6-OHDA/pCPA rats) or NaCl (Sham and 6-OHDA rats). Animals exposed to DSP-4 or pCPA combined to 6-OHDA lesion did not develop any weight loss and had a good general welfare.

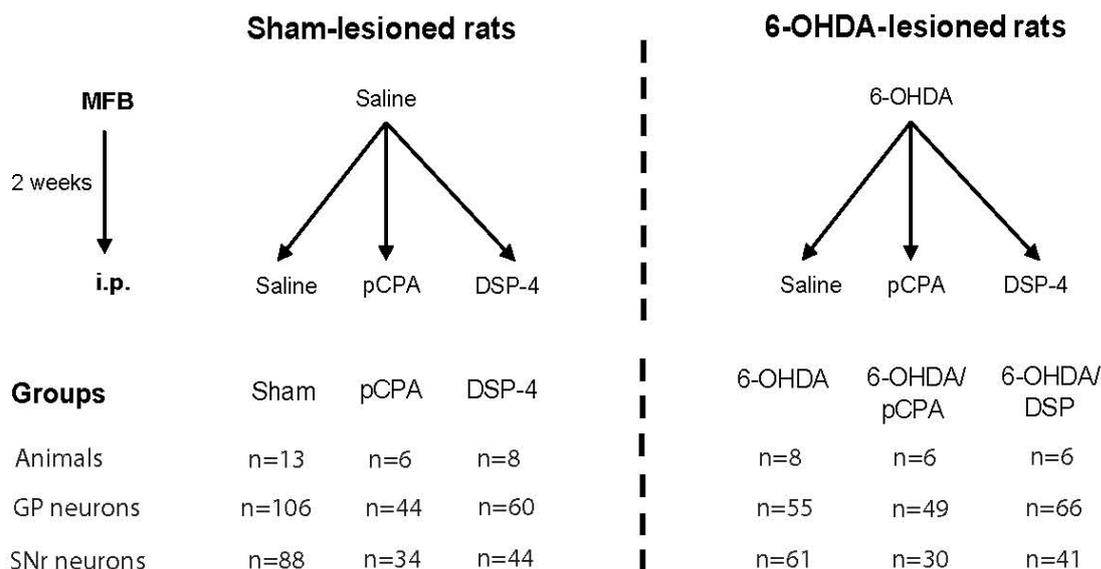


Figure 1. Experimental design. At the beginning of the study, animals were injected into the right medial forebrain bundle (MFB) with 6-OHDA (6-OHDA-lesioned rats) or saline (sham-lesioned rats). Two weeks later, 6-OHDA- and sham-lesioned rats were divided into three groups that received an intraperitoneal injection (i.p.) of either DSP-4, pCPA or saline. Six different groups resulted as follows: sham, DSP-4, pCPA, 6-OHDA, 6-OHDA/DSP-4 and 6-OHDA/pCPA. Each group was processed for electrophysiological recordings into the GP and the SNr (the number of neurons recorded is indicated for each brain region in each group). After histological verification of the recorded sites (see Material and Methods), rat brains were processed for biochemical assessment of the extent of monoamine depletions and only rats that display a percentage of depletion that fits with our inclusion criterion for each monoamine were included in the statistical analysis (see the final number of rats per group). Saline 0.9% NaCl; pCPA: 4-Chloro-L-phenylalanine; DSP-4: N-(2-Chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine hydrochloride; 6-OHDA: 6-hydroxydopamine.

Dopaminergic depletion

6-OHDA was stereotaxically injected into the MFB as previously described (Belujon 2007). After chloral hydrate anesthesia (400 mg/kg, i.p., Sigma), rats were placed in a stereotaxic frame (Kopf, Unimecanique, France). Thirty minutes before the 6-OHDA injection, animals received an i.p. injection of DMI (25 mg/kg, Sigma) to protect NA neurons. DMI was dissolved in 0.9% NaCl and injected in a volume of 5 ml/kg body weight. Each animal received a unilateral injection of 2.5 μ l 6-OHDA (Sigma, 5 mg/ml in sterile NaCl, 0.9%) with 0.1% ascorbic acid into the right MFB over a 5 minutes period using a 10 μ l Hamilton

microsyringe. The coordinates were 2.8 mm posterior to bregma (AP), 2 mm lateral to the midline (L) and 8.4 mm below the skull (D) according to the brain atlas of Paxinos and Watson (1996).

Noradrenergic depletion

DSP-4, a selective drug for lesioning NAergic terminals of the LC, was dissolved in sterile NaCl 0.9 % and used at a dose of 50 mg/kg according to the work of Grzanna *et al.*(1989). This concentration has been shown to induce about 80% bilateral depletion of endogenous NA in the brain (Delaville *et al.*, 2011, under revision).

Serotonergic depletion

pCPA, a selective inhibitor of 5-HT synthesis, was dissolved in sterile NaCl 0.9 % and administered at 50 mg/kg during two successive days. This injection procedure, previously developed in the laboratory, has been shown to produce between 50 to 80% bilateral depletion of 5-HT concentrations. This decrease in endogenous 5-HT is reversible 4 days after the last injection.

Extracellular single unit recordings

Extracellular single-unit recordings were made in rats anesthetized with urethane (1.2 g/kg, i.p.) as previously reported (Ni *et al.*, 2001). A single glass micropipette electrode (impedance: 8-12 M Ω ; aperture 0.5 μ m) was filled with 4% Pontamine sky blue in 3 M NaCl and then lowered into the GP and SNr according to the following stereotaxic coordinates (in mm: AP: -0.9, L: -3, D: 4.5-7.5 and AP: -5.3, L: -2.5, D: 6.5-9, for GP and SNr respectively; Paxinos and Watson, 1996). Both GP and SNr neurons were recorded in each rat. Extracellular neuronal activity was amplified, bandpass-filtered (300-3000 Hz) using a

preamplifier (Neurolog, Digitimer, UK) and 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 to ascertain the stability of the discharge activity. At the end of each session, the recording site was marked by an electrophoretic injection (Iso DAM 80, WPI, Hertfordshire, UK) of Pontamine sky blue through the micropipette at a negative current of 20 μ A for 7 minutes. The location of the Pontamine sky blue dots was histologically verified as previously reported (Belujon et al., 2007) and only brains with clear blue dots in the GP and SNr 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 (interspike interval: 5 msec bin) were calculated using Neuroexplorer program (AlphaOmega, Nazareth, Israel). Firing rates were expressed as the averaged frequency of discharge calculated over the 20 minutes period of stabilization and the value for each group is the mean \pm the standard error mean (SEM). Firing patterns were analyzed as previously described (Labarre et al., 2008). Three patterns were determined: a regular pattern, with a discharge density distribution of spike train that follows a near-normal distribution; an irregular pattern, that follows a Poisson distribution; and a bursty pattern with a discharge density histogram that follows two different distributions (Kaneoke and Vitek, 1996). The number of cells discharging in each pattern was expressed in percentage of the total number of neurons recorded.

Biochemical assessment of monoamine depletion

Selected animals for final analysis went through an additional validation step regarding the extent of monoamines depletion. This biochemical step is mandatory for the final inclusion of animals in each group.

Tissue dosages of monoamines were performed by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with electrochemical detection as previously described (De Deurwaerdere et al., 1998; Navailles et al., 2010) to evaluate the extent and selectivity of each monoamine depletion procedure (6-OHDA, pCPA and DSP-4) and their combination (6-OHDA + DSP-4 and 6-OHDA + pCPA). Tissue concentrations of DA were measured in the anterior striatum and that of NA and 5-HT in the rostral part of the frontal cortex, in line with the innervation density of the respective monoamine terminals in each brain region (Loughlin et al., 1982). At the end of electrophysiological recordings, rats were decapitated and their brains were removed rapidly and frozen in cold isopentane. Both right and left portions of the anterior striatum and the frontal cortex were dissected and stored at -80°C until their use in biochemical assays. The tissues were homogenized in 200 µl of 0.1 N HClO₄ and centrifuged at 13,000 rpm for 30 min at 4°C. Aliquots of the supernatants were diluted in the mobile phase (1/2 for the cortex and 1/4 for the striatum) and injected into the HPLC column (Chromasyl C8, 150 x 4.6 mm, 5 µm) protected by a Brownlee-Newgard precolumn (RP-8, 15 x 3.2 mm, 7 µm). The mobile phase, delivered at 1.2 ml/min flow rate, was as follows (in mM): 60 NaH₂PO₄, 0.1 disodium EDTA, and 2 octane sulfonic acid plus 7% methanol, adjusted to pH 3.9 with orthophosphoric acid and filtered through a 0.22 µm Millipore filter. Detection of monoamines was performed with a coulometric detector (CoulochemI, ESA) coupled to a dual-electrode analytic cell (model 5011). The potential of the electrodes was set at +350 and -270 mV.

Data analysis

Results are expressed in ng/mg of tissue, and each value is the mean \pm SEM. The percentage of monoamine depletions in drug-treated animals was calculated with respect to sham-lesioned animals. Each rat was included in its respective group according to an inclusion criterion for each monoamine depletion procedure: >90% decrease in DA concentrations in the lesioned-striatum; >80% and >50% reduction of NA and 5-HT concentrations respectively in both sides of the frontal cortex.

Statistical analyses

Statistical analyses were done using SPSS (SPSS statistics 17.0, New-York, NY). Biochemical and electrophysiological data were studied by a two-way ANOVA (pretreatment X treatment) to determine the ability of DSP-4 or pCPA (pretreatment) to modify monoamine levels and firing rates induced by the 6-OHDA lesion (treatment). Then, a one way ANOVA (using group as the main factor) was used to determine statistical differences between groups. When significant ($p < 0.05$), the ANOVA was followed by the Fisher's protected least significance test (PLSD) to allow adequate multiple comparisons between groups. Changes in the proportion of neuronal firing patterns between groups were analyzed using a Chi² test.

RESULTS

Effect of 6-OHDA, DSP-4 and pCPA on monoamine tissue concentrations in the rat brain

The Table 1 summarizes the tissue concentration values of DA in the anterior striatum and NA and 5-HT in the frontal cortex in the six experimental groups (see Fig. 1). The 6-OHDA, DSP-4 and pCPA administrations applied alone or combined (6-OHDA/DSP-4 and 6-OHDA/pCPA) induced a selective depletion of endogenous DA, NA and 5-HT respectively, without modifying other monoamines.

Table 1. Effect of the unilateral 6-OHDA lesion, the DSP-4 and pCPA administrations on tissue concentrations of DA in the anterior striatum, 5-HT and NA in the frontal cortex of the rat brain.

| Treatment | DA | | NA | | 5-HT | |
|--------------------|-------------------|----------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| | Anterior striatum | | Frontal cortex | | Frontal cortex | |
| | Left | Right | Left | Right | Left | Right |
| Sham (n=13) | 5738.2±566.6 | 5995.4±577.7 | 147.2±17.3 | 151.7±14.3 | 160.3±18.8 | 166.3±10.6 |
| 6-OHDA (n=8) | 7340.8±1339.7 | 307.9±132.2*** | 146.9±14.2 | 139.1±15.4 | 155.1±20.9 | 144.5±14.2 |
| DSP-4 (n=8) | 6656.0±942.0 | 7930.0±1662.8 | 19.5±14.4*** | 29.3±3.4*** | 227.5±22.8 | 138.5±19.4 |
| 6-OHDA/DSP-4 (n=6) | 6518.8±935.2 | 438.3±148.9 | 40.9±23.6 ^{££} | 18.3±5.7 ^{££} | 205.2±26.0 | 127.9±11.3 |
| pCPA (n=6) | 6716.5±993.9 | 6578.2±1207.9 | 153.1±6.4 | 114.8±16.9 | 46.7±21.4*** | 47.3±9.7*** |
| 6-OHDA/pCPA (n=6) | 7804.0±722.1 | 901.9±526.0 | 155.6±18.6 | 109.1±13.6 | 77.4±18.3 [£] | 57.8±14.6 ^{££} |

Each value, expressed in ng/mg of tissue, represents the mean ± SEM of 6 to 13 rats (see the number of rats for each group in parentheses). *** $p < 0.001$ versus the corresponding side of the sham group; [£] $p < 0.05$, ^{££} $p < 0.01$ versus the corresponding side of the 6-OHDA group (Fisher's PLSD test).

Table 1. Effect of the unilateral 6-OHDA lesion, the DSP-4 and pCPA administrations on tissue concentrations of DA in the anterior striatum, 5-HT and NA in the frontal cortex of the rat brain. Each value, expressed in ng/mg of tissue, represents the mean ± SEM of 6 to 13 rats (see the number of rats for each group in parentheses). *** $p < 0.001$ versus the corresponding side of the sham group; [£] $p < 0.05$, ^{££} $p < 0.01$, versus the corresponding side of the 6-OHDA group (Fisher's PLSD test).

Dopamine concentrations

The 6-OHDA injection into the right MFB dramatically decreased by almost 95% DA concentrations in the ipsilateral striatum compared to sham animals [$p < 0.001$, Fisher's PLSD test after a significant one-way ANOVA, $F_{(5,45)} = 16.7$, $p < 0.001$]. DA levels in the non-lesioned striatum were not significantly modified with respect to sham rats [Not Significant (NS), Fisher's PLSD test]. DSP-4 or pCPA treatments did not modify by themselves striatal DA concentrations in sham rats [NS, Fisher's PLSD test]. In 6-OHDA-lesioned rats, pCPA and DSP-4 did not change DA concentrations in the lesioned striatum [two-way ANOVA, $F_{(3,42)} = 0.14$ and $F_{(3,42)} = 0.12$ respectively, NS].

Noradrenaline concentrations

The systemic administration of DSP-4 induced a dramatic decrease in NA concentrations in both the right (-81%) and left (-87%) frontal cortex [$p < 0.001$, Fisher's PLSD test after a significant one-way ANOVA, $F_{(5,49)} = 7.39$ and $F_{(5,47)} = 8.11$, $p < 0.001$, respectively]. pCPA and 6-OHDA procedures did not alter NA tissue concentrations by themselves [NS, Fisher's PLSD test]. The statistical analysis did not reveal any significant interaction between DSP-4 and 6-OHDA treatment on NA concentrations [two-way ANOVA, $F_{(3,46)} = 0.63$ and $F_{(3,44)} = 0.24$ for the right and left frontal cortices respectively, NS]. Indeed, the averaged (left and right) NA depletion induced by DSP-4 was similar in the DSP-4 (-83.7%) and 6-OHDA/DSP-4 groups (-79.5%) [NS, Fisher's PLSD test].

Serotonin concentrations

The pCPA administration induced a partial though substantial depletion of 5-HT concentrations in the right and left sides of the frontal cortex (both about 71%) [$p < 0.001$, Fisher's PLSD test after a significant one-way ANOVA, $F_{(5,48)} = 7.46$ and $F_{(5,47)} = 6.1$,

$p < 0.001$, respectively]. DSP-4 and 6-OHDA administration alone did not modify 5-HT levels [NS, Fisher's PLSD test]. The statistical analysis did not reveal any significant interaction between pCPA and 6-OHDA treatments on 5-HT concentrations [two-way ANOVA, $F_{(3,45)} = 0.37$ and $F_{(3,44)} = 0.61$ for the right and left frontal cortices respectively, NS]. Indeed, the averaged (right and left) 5-HT depletion induced by pCPA (-71.2%) was not significantly different from that induced in the 6-OHDA/pCPA group (-55%) [NS, Fisher's PLSD test].

Effects of NA and 5-HT depletions on GP and SNr neuronal activity in 6-OHDA-lesioned rats

Effects of DSP-4 on GP and SNr neuronal activity

The NA depletion in 6-OHDA-lesioned rats did not modify the spontaneous firing rate [two-way ANOVA, $F_{(3,282)} < 10^{-4}$, NS; Fig. 2A] of GP neurons ($n = 66$). Neither the 6-OHDA lesion ($n = 55$) nor the DSP-4 administration ($n = 60$) alone changed the spontaneous firing rate of GP neurons compared to sham animals ($n = 106$) [one-way ANOVA, $F_{(3,285)} = 2.6$, NS; Fig. 2A].

The firing pattern of GP neurons in 6-OHDA-lesioned rats was not significantly modified by DSP-4 [NS, $X^2 = 4.67$, $df = 2$ for 6-OHDA/DSP-4 *versus* 6-OHDA; Fig. 2B]. Nevertheless, NA depletion, without effect *per se* [NS, $X^2 = 1.89$, $df = 2$, DSP-4 *versus* sham rats; Fig. 2B] tended to dampen the increase in the number of irregular (+4%) and bursty neurons (+21%) induced by the 6-OHDA lesion itself [$p < 0.01$, $X^2 = 11.42$, $df = 2$, 6-OHDA *versus* sham rats; Fig. 2B]. Indeed, the number of irregular (36.4%) and bursty (14.5%) neurons in the 6-OHDA group was reduced to 24.2% and 7.7% respectively in the presence of DSP-4.

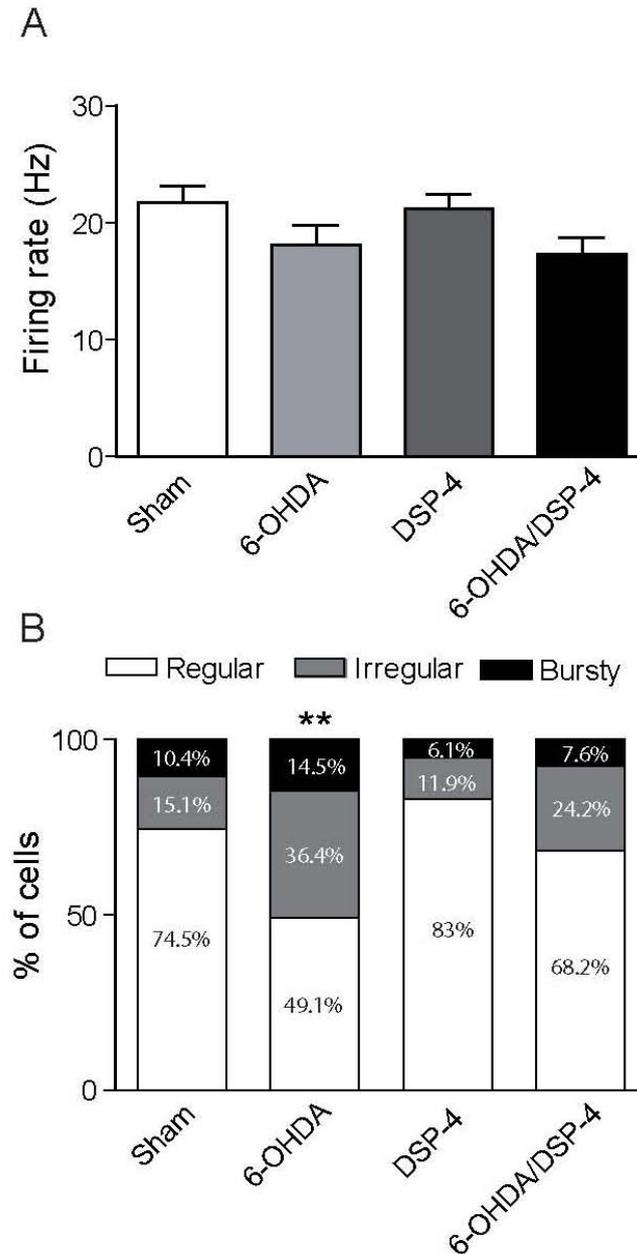


Figure 2. Effect of DSP-4 administration on the spontaneous firing rate and the pattern of discharge of GP neurons in 6-OHDA-lesioned rats.

A. Histograms represent the mean \pm SEM of the firing rate (expressed in Hertz: Hz) of all GP neurons recorded in each experimental group (see Figure 1 for the number of cells). **B.** Histograms represent the firing pattern distribution of GP neurons discharging in a regular (white portion), irregular (grey portion) manner or with bursts (black portion). The number of cells discharging in each pattern is expressed in percentage of the overall population recorded and is indicated in the corresponding portion. ** $p < 0.01$ versus sham group (Chi² test).

Likewise, the NA depletion in 6-OHDA-lesioned rats did not modify the firing rate [two-way ANOVA, $F_{(3,230)} = 0.004$, NS; Fig. 3A] or the firing pattern of SNr neurons ($n = 41$) [NS, $X^2 = 0.47$, $df = 2$, 6-OHDA/DSP-4 *versus* 6-OHDA; Fig. 3B]. The 6-OHDA lesion *per se* ($n = 61$) decreased the spontaneous nigral firing rate compared to sham animals ($n = 88$) [$p < 0.01$, Fisher's PLSD test after a significant one-way ANOVA, $F_{(3,233)} = 4.79$, $p < 0.01$; Fig. 3A]. Furthermore, as described by Tai et al. (2003), the 6-OHDA lesion increased the proportion of SNr neurons discharging with bursts or in an irregular manner [$p < 0.05$, $X^2 = 6.43$, $df = 2$, 6-OHDA *versus* sham, Fig. 3B]. The DSP-4-induced NA depletion alone ($n = 44$) did not alter the firing rate [NS, Fisher's PLSD test; Fig. 3A] or the firing pattern [NS, $X^2 = 3.0$, $df = 2$, DSP-4 *versus* sham rats; Fig. 3B] of SNr neurons.

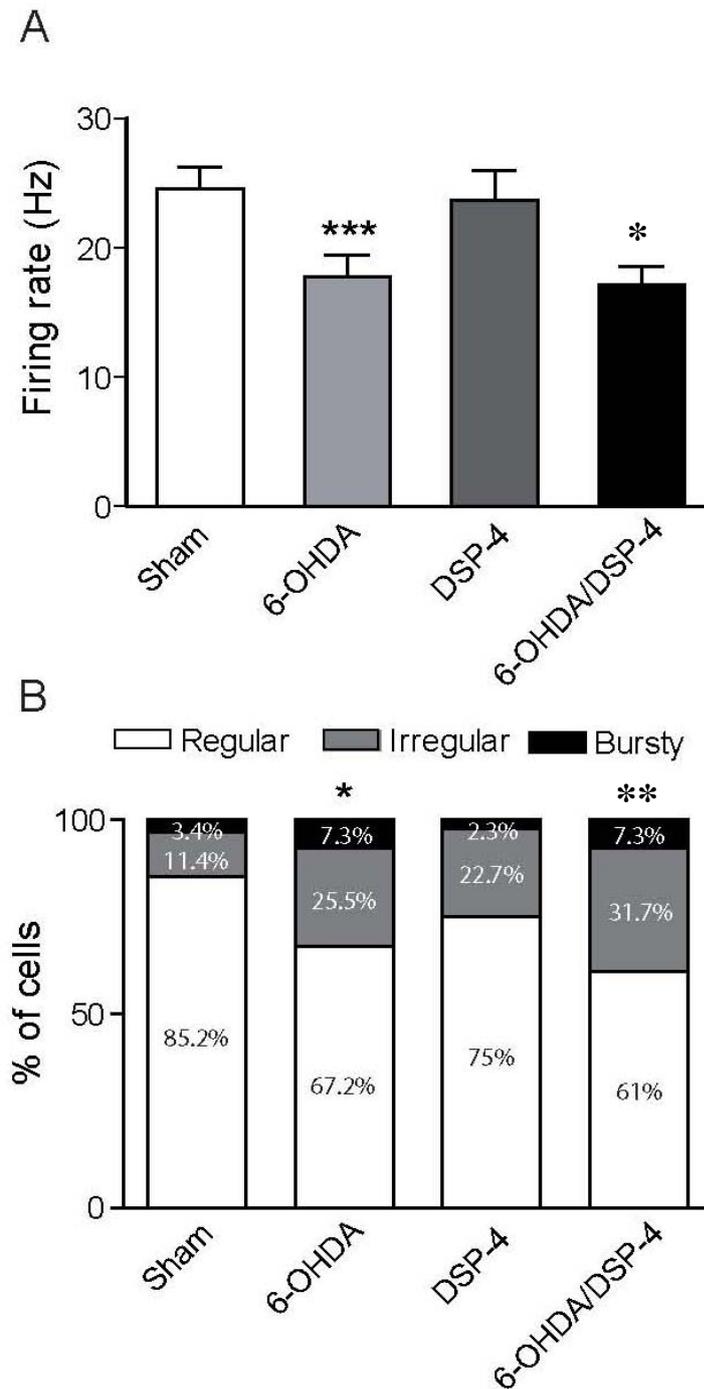


Figure 3. Effect of DSP-4 administration on the spontaneous firing rate and the pattern of discharge of SNr neurons in 6-OHDA-lesioned rats.

A. Histograms represent the mean \pm SEM of the firing rate (expressed in Hertz: Hz) of all SNr neurons recorded in each experimental group (see Figure 1 for the number of cells). ** $p < 0.01$ versus sham group (Fisher's PLSD test). **B.** Histograms represent the firing pattern distribution of SNr neurons discharging in a regular (white portion), irregular (grey portion) manner or with bursts (black portion). The number of cells discharging in each pattern is expressed in percentage of the overall population recorded and is indicated in the corresponding portion. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ versus sham group (Chi² test).

Effect of pCPA on GP and SNr neuronal activity

The 5-HT depletion did not significantly modify the firing rate of GP neurons in 6-OHDA-lesioned rats ($n = 49$) [two-way ANOVA, $F_{(3,249)} = 2.06$, NS; Fig. 4A]. Overall, the firing rate of GP neurons in the pCPA/6-OHDA group was not statistically different from that of the 6-OHDA group [NS, Fisher's PLSD test after a significant one-way ANOVA, $F_{(3,252)} = 6.71$, $p < 0.001$; Fig. 4A]. While the spontaneous firing rate of pallidal neurons was not modified in 6-OHDA-lesioned rats ($n = 55$) compared to sham-lesioned rats ($n = 106$) [NS, Fisher's PLSD test; Fig. 4A], the pCPA administration alone ($n = 44$) induced a significant decrease in GP neuronal firing rate [$p < 0.001$ *versus* the sham group, Fisher's PLSD test; Fig. 4A].

The 5-HT depletion did not alter the pattern of discharge of GP neurons in 6-OHDA-lesioned rats [NS, $X^2 = 0.08$, $df = 2$, pCPA/6-OHDA *versus* 6-OHDA; Fig. 4B]. Although both 6-OHDA lesion and pCPA depletion increased to a similar extent the number of bursty (+4%) and irregular (+21 and 16% respectively) GP neurons by themselves compared to sham rats [$p < 0.01$ and $p < 0.05$, $X^2 = 11.42$ and 5.97 , $df = 2$ for 6-OHDA and pCPA *versus* sham respectively, Fig. 4B], their own effects were not accumulated in the pCPA/6-OHDA group.

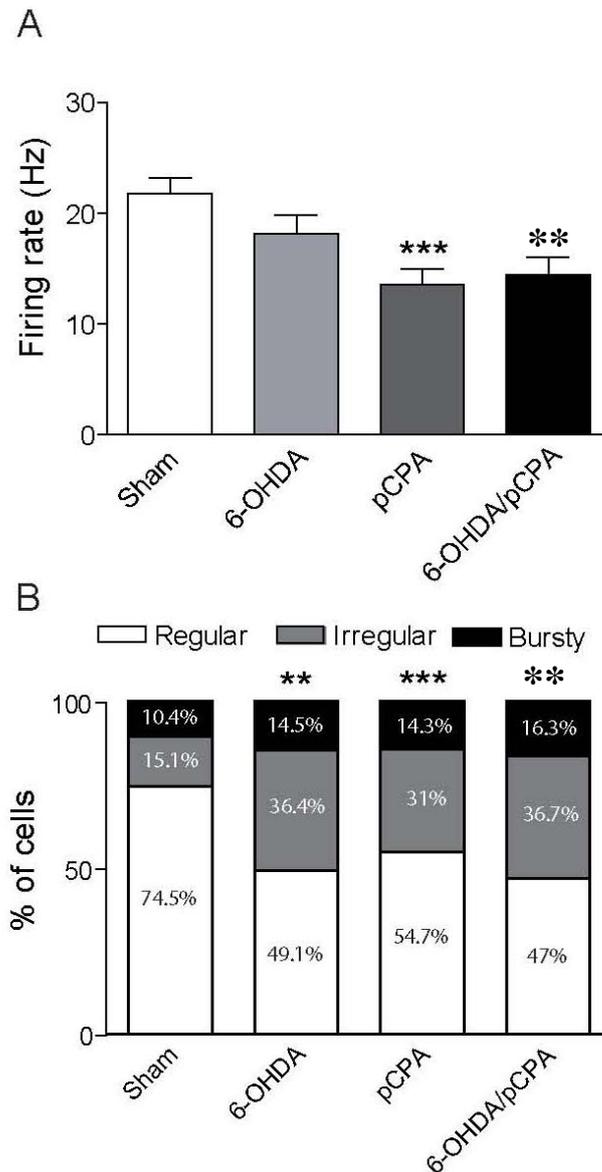


Figure 4. Effect of pCPA administration on the spontaneous firing rate and the pattern of discharge of GP neurons in 6-OHDA-lesioned rats.

A. Histograms represent the mean \pm SEM of the firing rate (expressed in Hertz: Hz) of all GP neurons recorded in each experimental group (see Figure 1 for the number of cells). *** $p < 0.001$ versus sham group (Fisher's PLSD test). **B.** Histograms represent the firing pattern distribution of GP neurons discharging in a regular (white portion), irregular (grey portion) manner or with bursts (black portion). The number of cells discharging in each pattern is expressed in percentage of the overall population recorded and is indicated in the corresponding portion. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus sham group (Chi² test).

The statistical analysis revealed a significant interaction of pCPA administration on the firing rate of SNr neurons in 6-OHDA-lesioned rats [two-way ANOVA $F_{(3,209)} = 7.99$, $p < 0.01$; Fig. 5A]. Both the 6-OHDA lesion ($n = 61$) and the pCPA depletion ($n = 34$) reduced nigral firing rate *per se* [$p < 0.01$ and $p < 0.001$ *versus* sham rats ($n = 88$) respectively, Fisher's PLSD test after a significant one-way ANOVA $F_{(3,212)} = 6.17$, $p < 0.001$; Fig. 5A]. Nevertheless, the effects of both treatments were not additive in the pCPA/6-OHDA group ($n = 30$) [NS, Fisher's PLSD test, pCPA/6-OHDA *versus* 6-OHDA].

The statistical analysis did not reveal any significant difference between the 6-OHDA/pCPA and the 6-OHDA group [NS, $X^2 = 5.39$, $df = 2$; Fig. 5B]. Nevertheless, both the 6-OHDA lesion [$p < 0.05$, $X^2 = 6.43$, $df = 2$ *versus* sham rats; Fig. 5B] and the 5-HT depletion [$p < 0.01$, $X^2 = 12.4$, $df = 2$ *versus* sham rats; Fig. 5B] increased the number of irregular (+25.5% and +29.4%) and bursty (+7.3% and +14.7%) nigral neurons. These effects tended to accumulate when both treatments were combined (+36.7% irregular and +20% bursty neurons).

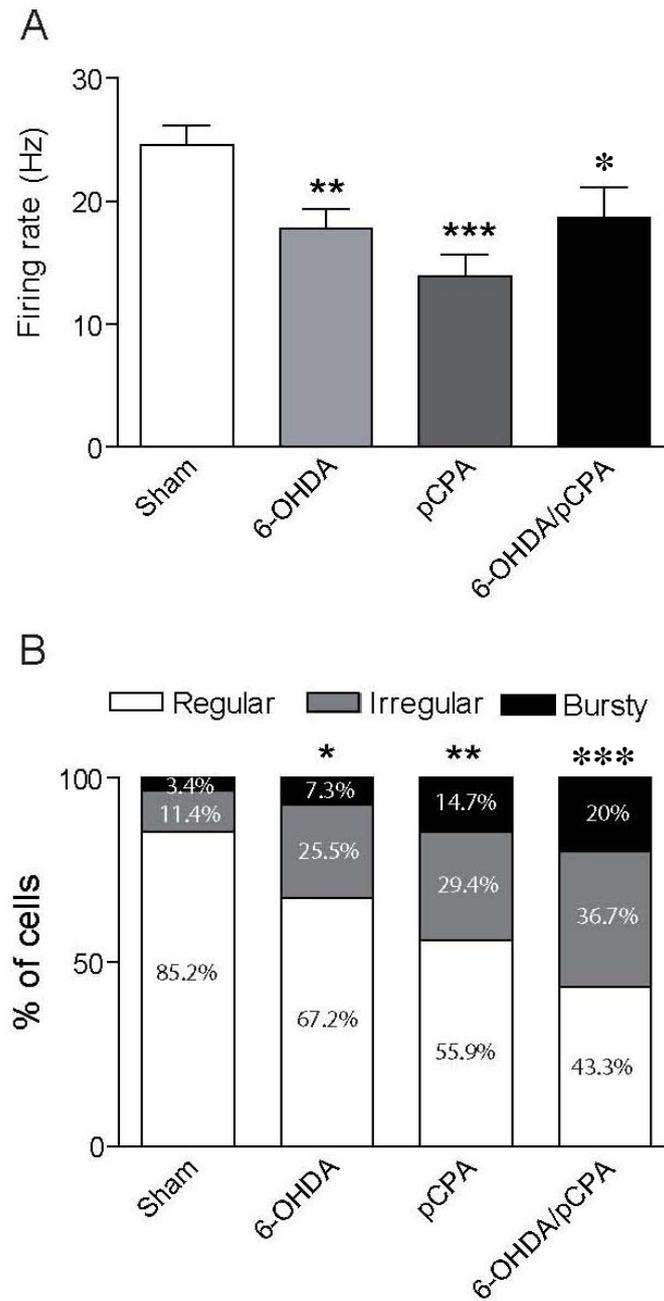


Figure 5. Effect of pCPA administration on the spontaneous firing rate and the pattern of discharge of SNr neurons in 6-OHDA-lesioned rats.

A. Histograms represent the mean \pm SEM of the firing rate (expressed in Hertz: Hz) of all SNr neurons recorded in each experimental group (see Figure 1 for the number of cells). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus sham group (Fisher's PLSD test). **B.** Histograms represent the firing pattern distribution of SNr neurons discharging in a regular (white portion), irregular (grey portion) manner or with bursts (black portion). The number of cells discharging in each pattern is expressed in percentage of the overall population recorded and is indicated in the corresponding portion. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus sham group (Chi² test).

DISCUSSION

Results of the present study show that NA depletion alone did not change GP and SNr neuronal activity whereas 5-HT depletion induced changes in the firing rate and patterns of both GP and SNr neurons. 6-OHDA-induced DA depletion resulted in changes of the firing pattern of GP and SNr neurons confirming the results reported in previous studies including ours. These pattern changes were not significantly influenced by additional NA or 5-HT depletion but tended to accumulate when both 6-OHDA and pCPA treatments were combined.

NA and 5-HT depletion effects on the neuronal activity of GP and SNr neurons in sham-lesioned rats

According to the classical model of basal ganglia circuitry (Albin et al., 1989), GP and SNr neurons are directly influenced by excitatory glutamatergic afferents from the STN. In a recent study we have shown that NA depletion decreased the firing rate and increased the proportion of bursty and irregular neurons in the STN (Delaville et al., 2011, under revision). These modifications in STN neurons should be transmitted to their efferent structures. Surprisingly, NA depletion did not modify either GP or SNr firing activity. This absence of electrophysiological alterations could be explained by the fact that other neurotransmitter systems innervating GP and SNr counterbalanced the direct effect of STN efferents. To our knowledge, few studies focused on NA modulation of these two nuclei. An *in vitro* study on GP slices showed that the spontaneous neuronal activity was unaffected by iontophoretic NA application (Perkins and Stone, 1983) confirming the weak NAergic innervation and very low density of NAergic receptors in GP (Piffl et al., 1991). In contrast to GP, *in vitro* studies on SNr slices have shown that NA increased the tonic firing of SNr neurons (Berretta et al., 2000; Alachkar et al., 2006). In view of these results, we can suggest that the absence of effect

of DSP-4-induced NA depletion on GP and SNr neurons are due to compensatory mechanisms involving other neurotransmitter systems in a network that remains to be determined.

In the case of pCPA-induced 5-HT depletion, although this depletion did not modify either the firing rate or the firing pattern of STN neurons (Delaville et al., 2011, under revision), it induced a decrease in the firing rate in parallel with an increase in the proportion of GP and SNr neurons discharging with burst and in an irregular manner. These effects could be due to a direct deactivation of GP and SNr neurons in the absence of 5-HT. GP neurons receive abundant 5-HT afferents from the dorsal raphe nucleus (DeVito et al., 1980; Lavoie and Parent, 1990; Pifl et al., 1991; Charara and Parent, 1994) and electrical stimulation of the latter evoked an increase of 5-HT level in GP measured by microdialysis (McQuade and Sharp, 1997). Local application of 5-HT increased the firing rate of GP neurons in vitro (Chen et al., 2008) and in vivo (Querejeta et al., 2005). This modulation is more likely to occur by an inhibition of GABA release from striato-pallidal terminals (Querejeta et al., 2005; Di Matteo et al., 2008). 5-HT exerts a tonic control on GP activity by suppressing GABAergic inhibition through presynaptic 5-HT_{1B} receptors. In addition to the firing rate change, we show that 5-HT depletion increased the proportion of bursty and irregular cells suggesting that 5-HT can modulate the firing pattern of GP neurons as well. This result is in good agreement with the fact that local injection of 5-HT decreased the burst index of GP neurons (Kita et al., 2007). SNr neurons also are more bursty and irregular after 5-HT depletion. SNr neurons receive the largest 5-HT innervations from the dorsal raphe nucleus compared to other brain regions (Corvaja et al., 1993) and express the highest density of 5-HT receptors. Microiontophoretic injection of 5-HT into the SNr produced mixed, although mostly inhibitory, effects (Collingridge and Davies, 1981; Dray, 1981; Gongora-Alfaro et al., 1997). In spite of this evidence, Lacey and co-workers have shown that 5-HT not only directly excites SNr neurons

but also disinhibits them by reducing GABA release from striatonigral terminals, acting on presynaptic 5-HT_{1B} receptors (Rick et al., 1995; Stanford and Lacey, 1996). Furthermore, selective 5-HT_{2C} activation excites SNr neurons in vivo (Di Giovanni et al., 2001; Invernizzi et al., 2007). This effect was evident after both systemic administration and local microiontophoretic application of mCPP and Ro 60-0175 (Di Giovanni et al., 2001; Invernizzi et al., 2007). It is thus possible that in the absence of 5-HT after pCPA injection in vivo 5-HT_{2C} and 5-HT_{1B} are not activated resulting in a decrease of the firing rate of SNr neurons.

NA and 5-HT depletion effects on the neuronal activity of GP and SNr neurons in 6-OHDA-lesioned rats

Changes in the firing pattern of GP neurons in rats bearing 6-OHDA-induced DA depletion confirm the findings of previous studies carried out in rodents (Pan and Walters, 1988; Hassani et al., 1996; Ni et al., 2000), MPTP-treated monkeys (Filion and Tremblay, 1991; Bergman et al., 1994) and parkinsonian patients (Sterio et al., 1994; Hutchison et al., 1998). However our 6-OHDA lesion did not change the firing rate of GP neurons in comparison with the sham group. This result does not fit with the classical model of basal ganglia circuitry, which postulates that GP neurons should be hypoactive in the dopamine-depleted state (Albin et al., 1989; DeLong, 1990). Among published data, some authors have shown that DA depletion induced a slight but significant decrease in the mean discharge rate of GP neurons associated with a change in the firing pattern (Pan and Walters, 1988; Hassani et al., 1996), however, others have shown changes in the firing pattern without any change in the firing rate (Ni et al., 2000; Magill et al., 2001; Breit et al., 2007).

As regards the SNr, we show that 6-OHDA-lesion increased the proportion of irregular and bursty neurons in agreement with previous electrophysiological studies (Robledo and Feger, 1991; Burbaud et al., 1995; Murer et al., 1997; Tai et al., 2003). As for

GP, the firing rate changes in SNr neurons are contrasted in the literature. Some studies reported an increase (Burbaud et al., 1995), others no change (Murer et al., 1997; Tai et al., 2003) and others a decrease in SNr firing rate after DA depletion (Wang et al., 2010), as we show in the present study. Nevertheless, it should be noted that in basal ganglia the firing rate is an unstable parameter in animal models of parkinsonism and that the most relevant pathological parameter is the firing pattern.

The changes in GP and SNr neuronal activity after DA depletion were not modified by additional NA or 5-HT depletion. As regards the NA, our results could be explained by the fact that NA depletion, even when applied alone, did not induce changes in either the firing rate or the firing pattern of GP and SNr neurons. However, the situation is more complex for 5-HT depletion. The lack of additional effect produced by DA or 5-HT depletion suggests a convergence of these monoamines on the same circuit. This hypothesis is compatible with our electrophysiological data showing that both DA and 5-HT depletions induced similar increases in the number of SNr neurons discharging with burst and irregular patterns compared to control animals. Neuroanatomical data available clearly indicate that DA-containing neurons in the brain receive a prominent innervation from 5-HT originating in the raphe nuclei of the brainstem (Di Giovanni et al., 2008; Di Giovanni et al., 2010).

In conclusion, results of the present study provide evidence that NA depletion does not modulate GP and SNr neuronal activity whereas 5-HT depletion plays a major role in the modulation of both the firing rate and patterns of GP and SNr neurons. Furthermore, we show that the changes in GP and SNr neuronal activity after DA depletion were not modified by additional NA or 5-HT depletion suggesting that, in the context of experimental parkinsonism, the modulatory role of these monoamines in GP and SNr is more complex than expected and that further investigations are needed.

Disclosure/Conflicts of interest

The authors declare that, except for income received from my primary employer, no financial support or compensation has been received from any individual or corporate entity over the past three years for research or professional service and there are no personal financial holdings that could be perceived as constituting a potential conflict of interest. This article has not been submitted elsewhere. All co-authors have seen and agree with the contents of the manuscript.

Acknowledgments

Claire Delaville was supported by a fellowship from the "Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie" (MENRT). The University Victor Segalen and the "Centre National de la Recherche Scientifique" (CNRS) funded this study. We wish to thank Dr. Martin Guthrie for english reading of the manuscript.

REFERENCES

- Alachkar A, Brotchie J, Jones OT (2006) alpha2-Adrenoceptor-mediated modulation of the release of GABA and noradrenaline in the rat substantia nigra pars reticulata. *Neurosci Lett* 395:138-142.
- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12:366-375.
- 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.
- 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.
- 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.
- Berretta N, Bernardi G, Mercuri NB (2000) Alpha(1)-adrenoceptor-mediated excitation of substantia nigra pars reticulata neurons. *Neuroscience* 98:599-604.

- Bertrand E, Lechowicz W, Szpak GM, Dymecki J (1997) Qualitative and quantitative analysis of locus coeruleus neurons in Parkinson's disease. *Folia Neuropathol* 35:80-86.
- 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, 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.
- Chan-Palay V (1991) Locus coeruleus and norepinephrine in Parkinson's disease. *Jpn J Psychiatry Neurol* 45:519-521.
- Chan-Palay V, Asan E (1989) Alterations in catecholamine neurons of the locus coeruleus in senile dementia of the Alzheimer type and in Parkinson's disease with and without dementia and depression. *J Comp Neurol* 287:373-392.
- Charara A, Parent A (1994) Brainstem dopaminergic, cholinergic and serotonergic afferents to the pallidum in the squirrel monkey. *Brain Res* 640:155-170.
- Chen L, Yung KK, Chan YS, Yung WH (2008) 5-HT excites globus pallidus neurons by multiple receptor mechanisms. *Neuroscience* 151:439-451.
- Collingridge GL, Davies J (1981) The influence of striatal stimulation and putative neurotransmitters on identified neurones in the rat substantia nigra. *Brain Res* 212:345-359.
- Corvaja N, Doucet G, Bolam JP (1993) Ultrastructure and synaptic targets of the raphe-nigral projection in the rat. *Neuroscience* 55:417-427.
- De Deurwaerdere P, Stinus L, Spampinato U (1998) Opposite change of in vivo dopamine release in the rat nucleus accumbens and striatum that follows electrical stimulation of dorsal raphe nucleus: role of 5-HT₃ receptors. *J Neurosci* 18:6528-6538.
- Delaville C, Deurwaerdere PD, Benazzouz A (2011) Noradrenaline and Parkinson's disease. *Front Syst Neurosci* 5:31.
- DeLong MR (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci* 13:281-285.
- DeVito JL, Anderson ME, Walsh KE (1980) A horseradish peroxidase study of afferent connections of the globus pallidus in *Macaca mulatta*. *Exp Brain Res* 38:65-73.
- Di Giovanni G, Esposito E, Di Matteo V (2010) Role of serotonin in central dopamine dysfunction. *CNS Neurosci Ther* 16:179-194.
- Di Giovanni G, Di Matteo V, La Grutta V, Esposito E (2001) m-Chlorophenylpiperazine excites non-dopaminergic neurons in the rat substantia nigra and ventral tegmental area by activating serotonin-2C receptors. *Neuroscience* 103:111-116.
- Di Giovanni G, Di Matteo V, Pierucci M, Esposito E (2008) Serotonin-dopamine interaction: electrophysiological evidence. *Prog Brain Res* 172:45-71.
- Di Matteo V, Pierucci M, Esposito E, Crescimanno G, Benigno A, Di Giovanni G (2008) Serotonin modulation of the basal ganglia circuitry: therapeutic implication for Parkinson's disease and other motor disorders. *Prog Brain Res* 172:423-463.
- Donaldson IM, Dolphin A, Jenner P, Marsden CD, Pycock C (1976) The involvement of noradrenaline in motor activity as shown by rotational behaviour after unilateral lesions of the locus coeruleus. *Brain* 99:427-446.
- Dray A (1981) Serotonin in the basal ganglia: functions and interactions with other neuronal pathways. *J Physiol (Paris)* 77:393-403.
- 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.

- Filion M, Tremblay L (1991) Abnormal spontaneous activity of globus pallidus neurons in monkeys with MPTP-induced parkinsonism. *Brain Res* 547:142-151.
- Gongora-Alfaro JL, Hernandez-Lopez S, Flores-Hernandez J, Galarraga E (1997) Firing frequency modulation of substantia nigra reticulata neurons by 5-hydroxytryptamine. *Neurosci Res* 29:225-231.
- Grzanna R, Berger U, Fritschy JM, Geffard M (1989) Acute action of DSP-4 on central norepinephrine axons: biochemical and immunohistochemical evidence for differential effects. *J Histochem Cytochem* 37:1435-1442.
- 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.
- 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.
- Invernizzi RW, Pierucci M, Calcagno E, Di Giovanni G, Di Matteo V, Benigno A, Esposito E (2007) Selective activation of 5-HT(2C) receptors stimulates GABA-ergic function in the rat substantia nigra pars reticulata: a combined in vivo electrophysiological and neurochemical study. *Neuroscience* 144:1523-1535.
- Kaneoke Y, Vitek JL (1996) Burst and oscillation as disparate neuronal properties. *J Neurosci Methods* 68:211-223.
- Kish SJ (2003) Biochemistry of Parkinson's disease: is a brain serotonergic deficiency a characteristic of idiopathic Parkinson's disease? *Adv Neurol* 91:39-49.
- Kish SJ, Tong J, Hornykiewicz O, Rajput A, Chang LJ, Guttman M, Furukawa Y (2008) Preferential loss of serotonin markers in caudate versus putamen in Parkinson's disease. *Brain* 131:120-131.
- Kita H, Chiken S, Tachibana Y, Nambu A (2007) Serotonin modulates pallidal neuronal activity in the awake monkey. *J Neurosci* 27:75-83.
- Labarre D, Meissner W, Boraud T (2008) Measure of the regularity of events in stochastic point processes, application to neuron activity analysis. In: 33rd IEEE International Conference on Acoustics, pp 489-492. Las Vegas, NV.
- Lavoie B, Parent A (1990) Immunohistochemical study of the serotonergic innervation of the basal ganglia in the squirrel monkey. *J Comp Neurol* 299:1-16.
- Loughlin SE, Foote SL, Fallon JH (1982) Locus coeruleus projections to cortex: topography, morphology and collateralization. *Brain Res Bull* 9:287-294.
- 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.
- McQuade R, Sharp T (1997) Functional mapping of dorsal and median raphe 5-hydroxytryptamine pathways in forebrain of the rat using microdialysis. *J Neurochem* 69:791-796.
- 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.
- Navailles S, Benazzouz A, Bioulac B, Gross C, De Deurwaerdere P (2010) High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus and L-3,4-dihydroxyphenylalanine inhibit in vivo serotonin release in the prefrontal cortex and hippocampus in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 30:2356-2364.
- 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.
- 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.
- Paxinos G, Watson C (1996) *The Rat Brain in Stereotatic Coordinates*. Academic Press, San Diego.
- Perkins MN, Stone TW (1983) Neuronal responses to 5-hydroxytryptamine and dorsal raphe stimulation within the globus pallidus of the rat. *Exp Neurol* 79:118-129.
- Pifl C, Schingnitz G, Hornykiewicz O (1991) Effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on the regional distribution of brain monoamines in the rhesus monkey. *Neuroscience* 44:591-605.
- Querejeta E, Oviedo-Chavez A, Araujo-Alvarez JM, Quinones-Cardenas AR, Delgado A (2005) In vivo effects of local activation and blockade of 5-HT_{1B} receptors on globus pallidus neuronal spiking. *Brain Res* 1043:186-194.
- Rick CE, Stanford IM, Lacey MG (1995) Excitation of rat substantia nigra pars reticulata neurons by 5-hydroxytryptamine in vitro: evidence for a direct action mediated by 5-hydroxytryptamine_{2C} receptors. *Neuroscience* 69:903-913.
- 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.
- Rommelfanger KS, Edwards GL, Freeman KG, Liles LC, Miller GW, Weinshenker D (2007) Norepinephrine loss produces more profound motor deficits than MPTP treatment in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:13804-13809.
- Stanford IM, Lacey MG (1996) Differential actions of serotonin, mediated by 5-HT_{1B} and 5-HT_{2C} receptors, on GABA-mediated synaptic input to rat substantia nigra pars reticulata neurons in vitro. *J Neurosci* 16:7566-7573.
- Sterio D, Beric A, Dogali M, Fazzini E, Alfaro G, Devinsky O (1994) Neurophysiological properties of pallidal neurons in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 35:586-591.
- 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.
- Temel Y, Blokland A, Steinbusch HW, Visser-Vandewalle V (2005) The functional role of the subthalamic nucleus in cognitive and limbic circuits. *Prog Neurobiol* 76:393-413.
- Wang Y, Zhang QJ, Liu J, Ali U, Gui ZH, Hui YP, Chen L, Wang T (2010) Changes in firing rate and pattern of GABAergic neurons in subregions of the substantia nigra pars reticulata in rat models of Parkinson's disease. *Brain Res* 1324:54-63.

I.4. Conclusions et perspectives

Le tableau 3 résume les résultats obtenus.

| Dépletion | Comportement moteurs et non moteurs | | | | Electrophysiologie patron irrégulier et en bouffé | | |
|---------------|-------------------------------------|---------|-----------|----------------|---|----|-----|
| | Moteur | Anxiété | Anhedonie | « Dépression » | NST | GP | SNr |
| DA | ↓ | | | | ↑ | ↑ | ↑ |
| NA | ↓ | | | | ↑ | | |
| 5-HT | | | | | | ↑ | ↑ |
| DA+NA 5-HT | ↓ | ↑ | | | ↑ | ↑ | ↑ |
| DA+NA 5-HT | ↓ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ND | |

Tableau 3 : Effets des déplétions dopaminergique, noradrénergique et/ou 5-HTergique sur les comportements moteurs et non moteurs ainsi que sur l'activité neuronale du NST, du GP et de la SNr. ↑ : augmentation ; ↓ : diminution ; ND : non déterminé.

En raison de problèmes techniques et par manque de temps, nous n'avons pas pu déterminer l'effet de la déplétion des trois monoamines sur l'activité des neurones du GP et de la SNr. Il serait donc intéressant de compléter ce groupe.

Ces deux articles ont permis de montrer l'importance des systèmes monoaminergiques dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson. De plus nous avons pu montrer que les déplétions monoaminergiques altéraient l'activité du NST, du GP et de la SNr. Ces trois structures sont inter-connectées via les afférences excitatrices glutamatergiques du NST. De façon surprenante les altérations observées au niveau du NST après les différentes déplétions ne sont pas retrouvées au niveau du GP et de la SNr. Ainsi, la NA semble plus impliquée dans la modulation de l'activité du NST alors que la 5-HT semble plus moduler l'activité du GP et de la SNr. Ceci pourrait s'expliquer par l'influence directe des trois systèmes monoaminergiques sur chaque structure étudiée. De plus, d'autres structures innervant les ganglions de la base et recevant une large innervation NAergique et 5-HTergique, tel que

l'hippocampe, pourraient être impliquées. Ainsi des études complémentaires pourraient être réalisées afin de confirmer cette hypothèse.

Après avoir caractérisé l'impact des déplétions des systèmes monoaminergiques chez l'animal sham et 6-OHDA, nous avons voulu savoir quelle était la conséquence de ces différentes déplétions monoaminergiques dans la réponse aux traitements de références de la maladie de parkinson : la L-Dopa et la SHF du NST.

II-Effets des traitements antiparkinsoniens sur les comportements moteurs et non-moteurs induits par les différentes déplétions monoaminergiques

II.1. Résumé

Le traitement à la L-Dopa est le traitement pharmacologique de référence de la maladie de Parkinson améliorant de façon considérable les symptômes moteurs. Cependant, cette efficacité décroît avec le temps entraînant des fluctuations et des complications motrices chez 60% des patients après 6 ans de traitement. Elle finit par perdre son efficacité tout en entraînant des mouvements anormaux involontaires (dyskinésies), rendant la maladie à nouveau handicapante. Lorsque ces effets secondaires apparaissent, la L-Dopa peut être remplacée par la stimulation à haute fréquence (SHF) du NST (Bergman et al., 1990 ; Benazzouz et al., 1993 ; Benabid et al., 2000 ; Limousin *et al.*, 1993, 1998). Cette approche permet une amélioration de la fonction motrice et une diminution importante de la dose du traitement à la L-Dopa (50%). A long terme, les bénéfices de la SHF du NST sont préservés (Krack *et al.*, 2003). La résistance des symptômes non-moteurs aux traitements DAergiques mais aussi à la SHF suggère une origine non DAergique de ces troubles.

Nous avons donc tout d'abord testé si les déplétions NAergiques et/ou 5-HTergiques modifiaient les réponses comportementales à ces traitements de références chez le rat déplété en dopamine (article 3, en préparation). Après plusieurs expériences de mise au point, nous avons développé un modèle de lésion DAergique bilatérale. En effet, l'injection i.p. de L-Dopa chez des animaux ayant une déplétion unilatérale en dopamine entraîne des rotations des animaux empêchant toutes mesures comportementales. De plus, les déplétions NAergiques et 5-HTergiques sont bilatérales, il était donc important que la déplétion DAergique soit aussi bilatérale.

Ainsi, nous avons dû tout d'abord caractériser ce nouveau modèle. Tout comme les résultats obtenus après la déplétion DAergique unilatérale, l'addition des déplétions NAergique et/ou 5-HTergique ne potentialisent pas les troubles moteurs induits par la déplétion DAergique bilatérale. Cependant, nous avons pu mettre en évidence que la déplétion 5-HTergique chez ces animaux lésés en DA, augmente l'activité locomotrice des animaux. De la même façon, la déplétion 5-HTergique chez les animaux déplétés en DA diminue l'anxiété alors que la déplétion NAergique chez les animaux lésés en DA, seule ou combinée avec la déplétion 5-HTergique, ne modifie pas les comportements d'anxiété des animaux déplétés en DA seulement. Enfin, tout comme les résultats obtenus après la lésion unilatérale du système DAergique, seule la déplétion des trois systèmes monoaminergiques induit un état dit « dépressif » des animaux. Une fois encore, ces résultats de caractérisation d'un modèle se rapprochant encore plus de la maladie de Parkinson telle qu'elle est décrite chez l'homme, nous laissent supposer que les systèmes DAergique et NAergique sont impliqués dans les comportements moteurs et dans les troubles de l'anxiété et que les trois systèmes monoaminergiques sont impliqués dans les comportements dit de dépression.

Cette étape de caractérisation réalisée, nous avons pu étudier les effets de la L-Dopa et de la SHF bilatérale du NST. Au niveau du comportement moteur, nous avons pu mettre en

évidence que la SHF n'est efficace sur le déficit moteur que chez les rats ayant une déplétion bilatérale en DA. Cette efficacité étant perdue quand les deux autres systèmes monoaminergiques sont affectés. Ceci pourrait expliquer le manque d'efficacité de la SHF du NST chez certains patients parkinsoniens opérés. Dans nos conditions, la L-Dopa n'a pas d'effet par elle-même sur l'activité locomotrice de tous les groupes d'animaux. Ceci pourrait s'expliquer par un problème de dose utilisée (12mg/kg) et/ou par les mouvements anormaux de type dyskinétiques induits par la L-Dopa qui gênaient le comportement locomoteur. Cependant, la L-Dopa améliore l'état anxieux chez les rats 6-OHDA suggérant que ce symptôme est dopamine-dépendant. Enfin, la L-Dopa tout comme la SHF du NST, seules ou combinées ensemble, améliorent l'état « dépressif » des animaux 6-OHDA mais aussi, et ceci de façon plus importante, des animaux ayant une déplétion des trois systèmes monoaminergiques. Ces derniers résultats sont en contradiction avec l'effet de ces traitements sur l'état dépressif des patients parkinsoniens. Cependant ce symptôme dans la maladie de Parkinson reste l'un des symptômes les plus complexes et demande donc de plus amples investigations.

En conclusion, ces résultats ouvrent de nouvelles voies de recherche permettant de développer des stratégies thérapeutiques complémentaires permettant de traiter les symptômes handicapants qui résistent aux traitements existants ou qui sont les conséquences de ces traitements.

II.2. Article 3 : Effets des traitements antiparkinsoniens sur les comportements moteurs et non-moteurs induits par les différentes déplétions monoaminergiques

1. Introduction

1.1. Maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est une pathologie neurodégénérative caractérisée par la manifestation de symptômes moteurs cardinaux qui sont l'akinésie ou bradykinésie, la rigidité, les tremblements de repos et les troubles de la posture. Ces symptômes sont décrits comme la conséquence d'une dégénérescence des neurones dopaminergiques (DAergiques) de la *pars compacta* de la substance noire (SNc) (Ehringer et Hornykiewics, 1969). En plus des désordres moteurs, des troubles de l'humeur et des déficits cognitifs ont été décrits chez les patients parkinsoniens. En effet, 40% des patients souffrent de dépression (Chan-Palay *et al.*, 1989) et de troubles de l'anxiété (Stein *et al.*, 1990). Cependant, l'origine de ces troubles non-moteurs sont mal étudiés (pour revue, Delaville *et al.*, 2011).

La découverte de la déplétion DAergique dans la maladie de Parkinson a permis une grande avancée au niveau de la physiopathologie de la maladie de Parkinson. Il a été montré que cette déplétion DAergique, à l'origine des déficits moteurs, a pour conséquence une désorganisation de l'activité des neurones du noyau sous-thalamique (NST). En effet, les potentiels d'action qui sont émis de façon tonique et régulière à l'état physiologique évoluent vers un état pathologique en bouffées (rat 6-OHDA, Ni *et al.*, 2001 ; singe MPTP, Bergman *et al.*, 1994 ; patients parkinsoniens, Benazzouz *et al.*, 2002). Au vue de l'ensemble de ces données, le NST est une structure jouant un rôle clé dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson. Ceci a été confirmé par les travaux montrant que la lésion ou la stimulation à haute fréquence (SHF) de ce noyau améliorent de façon spectaculaire les symptômes moteurs de la maladie (Bergman *et al.*, 1990 ; Benazzouz *et al.*, 1993 ; Krack *et al.*, 2003).

1.2. Traitements de la maladie de Parkinson: Lévo-Dopa et stimulation à haute fréquence du NST

Plusieurs traitements pharmacologiques et chirurgicaux ont été développés dont les plus utilisés sont la L-Dopa et la SHF du NST. En effet, la L-Dopa, précurseur de la dopamine (DA), améliore de façon considérable les symptômes moteurs. Cependant, cette efficacité décroît avec le temps entraînant des fluctuations et des complications motrices chez 60% des patients après 6 ans de traitement (Hauser, 2009). La L-Dopa finit par perdre son efficacité tout en entraînant des mouvements anormaux involontaires (dyskinésies), rendant la maladie à nouveau handicapante (Hauser, 2009). Lorsque ces effets secondaires apparaissent, la L-Dopa peut être remplacée par une approche neurochirurgicale qui consiste à implanter des électrodes dans le NST à travers desquelles une stimulation à haute fréquence (SHF) chronique est appliquée (Krack et al., 2003). Cette approche permet une amélioration spectaculaire des symptômes moteurs et une diminution importante de la dose (50%) voir un arrêt total de la prise de L-Dopa. A long terme, les bénéfices moteurs de la SHF du NST sont préservés (Krack *et al.*, 2003).

La résistance des symptômes non moteurs aux traitements par SHF du NST mais aussi à la L-Dopa suggère une origine non dopaminergique de ces troubles.

1.3. Maladie de Parkinson et systèmes monoaminergiques

Les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson apparaissent lorsque 70% des neurones DAergiques de la SNc dégénèrent. A ce stade de la maladie, il a aussi été montré une dégénérescence de 70% des neurones du locus coeruleus (LC), principale source de NA du cerveau (German et al., 1992). La déplétion en NA, seule ou combinée avec la déplétion en DA, diminue l'activité locomotrice des animaux et augmente la proportion des neurones du NST déchargeant en bouffées et de manière irrégulière chez le rat. De plus, les résultats du test du labyrinthe en croix surélevée révèlent que la déplétion en DA combinée à celle en NA serait impliquée dans l'anxiété (Delaville *et al.*, en révision).

En plus de la dégénérescence des neurones DAergiques et NAergiques, des études post-mortems ont estimé entre 40 et 70 % la déplétion 5-HTergique chez les patients parkinsoniens (Kish, 2003). Le système sérotoninergique, principalement issu du raphé dorsal (RD), innerve les différentes structures des ganglions de la base (Azmitia et Segal, 1978). Ce système est communément associé aux troubles de l'humeur, telle que la dépression, symptôme observé dans la maladie de Parkinson. Les résultats de notre équipe ont montré que

la déplétion 5-HTergique combinée à celle de la NA et de la DA est impliquée dans les troubles de l'humeur (Delaville et al., en révision)

Ainsi, la maladie de Parkinson n'est pas une pathologie dopaminergique pure mais une affection des trois systèmes monoaminergiques associés à des déficits moteurs et aussi non moteurs.

1.4. Objectifs :

L'objectif de notre étude expérimentale était double :

1) dans un premier temps nous avons caractérisé notre modèle de lésion DAergique bilatérale combinée ou non aux déplétions NAergiques et/ou sérotoninergiques. Pour cela, nous avons étudié les effets de ces déplétions sur les comportements moteurs et non moteurs.

2) dans un second temps, nous avons étudié les effets des traitements antiparkinsoniens, la L-Dopa et la SHF du NST, sur ces déficits comportementaux induits par les mêmes déplétions.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Modèle d'étude

Des rats adultes mâles de souche "Sprague-Dawley" pesant environ 300g ont été utilisés pour les tests comportementaux et les enregistrements électrophysiologiques *in vivo*. Les rats étaient en cages collectives (4 par cage) sous conditions de lumière artificielle (cycle 12h jour/12h nuit), à 24°C avec libre accès à l'eau et à la nourriture. Les différentes expériences ont été réalisées chez des rats rendus parkinsoniens par des injections bilatérales de 6-hydroxydopamine (6-OHDA, n=11) induisant une déplétion dopaminergique, chez des rats ayant subi la déplétion du système DAergique combinée à la déplétion du système NAergique (n=9) ou 5-HTergique (n=10) et chez des rats avec la déplétion des trois monoamines (n=9).

2.2. Lésion des neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta

Les animaux ont été rendus parkinsoniens par une injection stéréotaxique bilatérale de 6-OHDA dans les faisceaux médians du télencéphale (MFB, medial forebrain bundle) selon les coordonnées stéréotaxiques de l'atlas du cerveau de rat (Paxinos et Watson, 1996). Au niveau du MFB se trouvent les fibres DAergiques issues de la SNc qui projettent sur le striatum ; en y injectant la 6-OHDA, toxine spécifique des neurones catécholaminergiques, les corps cellulaires des neurones DAergiques sont lésés de façon rétrograde.

Protocole : avant l'anesthésie par injection intrapéritonéale (i.p.) de ketamine hydrochloride (75mg/kg) et de xylazine hydrochloride (10mg/kg), le rat est traité à la désipramine (0,4%, 5 ml/kg) permettant l'inhibition de la recapture de la NA et donc une protection des neurones NAergiques contre la toxicité de la 6-OHDA. Le rat traité et anesthésié est ensuite placé sur un cadre stéréotaxique (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 (1996), les MFB droit et gauche sont atteints en déplaçant la canule aux coordonnées suivantes : AP (antéropostérieur) : - 2,8 mm par rapport au bregma ; L (latéral) : $\pm 2,0$ mm par rapport à la ligne médiane ; DV (dorsoventral) : -8,4 mm par rapport à la surface. 4,2 μ g de 6-OHDA base (dissouts dans un volume de 2,5 μ l de NaCl 0,9%), sont injectés dans chaque MFB.

2.3. Lésion des fibres NAergiques provenant du LC

La dénervation sélective des afférences NAergiques issues du LC est réalisée par une injection i.p. de N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine (C₁₁H₁₅BrClN-HCl ou DSP-4 ; 50 mg/kg) dissout dans une solution saline à 0,9%. Cette concentration a été montrée comme induisant 80% de déplétion sélective des fibres terminales du LC (Fritschy et Grzanna, 1991 ; Delaville et al., 2011). Cette neurotoxine a été injectée au moins deux semaines après l'injection préalable de la 6-OHDA.

2.4. Déplétion de la sérotonine du raphé dorsal

Le système 5-HTergique a été déplété par une injection i.p. de 4-Chloro-L-phenylalanine (pCPA), un inhibiteur sélectif de la tryptophane hydroxylase (enzyme limitante de la synthèse de la 5-HT). Il s'agit d'une déplétion aigüe et réversible. 50 mg/kg de pCPA, dissoute dans du NaCl (0,9 %), ont été administrés sur 2 jours consécutifs trois semaines après la lésion DAergique combinée ou non à la lésion NAergique. La dose de 50 mg/kg sur 2 jours consécutifs a été montrée comme induisant 60 à 70% de déplétion 5-HTergique (Delaville et al., 2011).

2.5 Implantation bilatérale des électrodes de stimulation

La SHF a été réalisée à l'aide d'électrodes bipolaires concentriques implantées bilatéralement à demeure dans le NST.

Protocole : de la même façon que pour la lésion du système DAergique, le rat est anesthésié par injection i.p. de ketamine/xylazine (75mg/kg et 10mg/kg respectivement), puis placé sur un cadre stéréotaxique. A l'aide de l'atlas stéréotaxique de Paxinos et Watson (1996), une électrode de stimulation bipolaire concentrique est implantée dans chaque NST aux coordonnées suivantes : AP : -3,8 mm par rapport au bregma ; L : ±2,5 mm par rapport à la ligne médiane ; DV : -8 mm par rapport à la surface. Les électrodes de stimulation sont maintenues grâce à un casque de ciment fixé sur le crâne à l'aide de 6 vis.

2.6 Traitements à la L-Dopa et à la SHF du NST

Le traitement pharmacologique consiste en une injection simultanée par voie systémique de L-Dopa (12 mg/kg) combinée à la benserazide (15 mg/kg) (inhibiteur de la dopa-décarboxylase ne traversant pas la barrière hématoencéphalique ce qui empêche la

conversion de la L-Dopa en DA à la périphérie). Les tests comportementaux ont été réalisés pendant le pic d'effet de la L-Dopa, soit 40 min après l'injection (Navailles et al., 2010).

La SHF du NST a été réalisée à la fréquence de 130 Hz et à une largeur d'impulsion de 60 μ s (paramètres utilisés chez les patients parkinsoniens, Krack et al., 2003). Seule l'intensité de la stimulation est déterminée pour chaque rat en se plaçant à une intensité inférieure à celle déclenchant des effets secondaires délétères.

Lors du couplage de la SHF et de la L-Dopa, la dose de L-Dopa est réduite de 50% (soit 6mg/kg) comme chez les patients bénéficiant des deux traitements (Krack et al., 2003).

2.7. Effets des déplétions monoaminergiques et des traitements

Deux approches expérimentales vont être utilisées :

- une étude des comportements moteurs se basant sur des tests mesurant l'activité locomotrice des animaux (actimètre) et leur catalepsie (test de la barre).
- une étude des comportements non moteurs mesurant l'état dépressif (test de la nage forcée) et anxieux (test du labyrinthe en croix surélevé).

La caractérisation de l'effet des déplétions se fait en comparant les valeurs brutes obtenues chez les différents groupes d'animaux (6-OHDA, 6-OHDA/pCPA, 6-OHDA/DSP-4, et 6-OHDA/pCPA/DSP-4).

Afin de comparer l'effet des traitements (SHF, L-Dopa et SHF+L-Dopa) chez les différents groupes, nous avons analysé l'efficacité des traitements définie comme :

$$[(\text{données après traitement}) - (\text{données avant traitement})]$$

Ainsi, les valeurs positives correspondent à une efficacité du traitement alors que les valeurs négatives expriment une aggravation de la symptomatologie pour l'activité locomotrice et l'anxiété et inversement pour les troubles de la dépression.

➤ **Comportements moteurs**

Mesure de l'activité locomotrice

Cette activité est mesurée à l'aide d'un actimètre (« *Open field* », Biosep, USA) équipé de deux barres contenant des faisceaux infrarouges situées à deux hauteurs différentes. Ce système permet de quantifier 3 types de mouvements : horizontaux, stéréotypés et redressements (Belujon *et al.*, 2007). Durant ce test, les animaux ont été filmés et les bandes vidéo ont été analysées visuellement pour déterminer d'éventuels comportements anormaux, non détectés par le système. Le paramètre utilisé pour étudier l'activité locomotrice est le nombre de mouvement horizontaux par session de 10 minutes.

Mesure de la catalepsie : Bar test :

Le test standard a été utilisé afin de déterminer le score de catalepsie obtenu par les animaux ayant subi une déplétion DAergique bilatérale associée ou non à une déplétion en NA et/ou 5-HT.

Les deux pattes sont placées sur une barre suspendue à 9 cm du sol et nous mesurons le temps entre le placement de l'animal et le moment où il ôte définitivement une de ses pattes. Afin d'éviter tout désagrément pour l'animal, nous limitons l'expérience à deux minutes.

➤ **Comportements non moteurs**

Mesure de l'anxiété : "Elevated plus maze" (EPM)

L'anxiété a été mesurée à l'aide d'un labyrinthe en croix surélevé (Elevated Plus Maze, EPM). Ce test permet d'évaluer l'état anxieux de l'animal face à un environnement nouveau. Il s'agit d'un labyrinthe en forme de croix, constitué de deux bras ouverts face à face et de deux bras fermés face à face reliés par une plateforme centrale de 10x10 cm. Chaque bras mesure 50 cm de longueur et 10 cm de largeur, les parois des bras fermés ont une hauteur de 30 cm (l'intérêt est de donner aux rats une sensation de sécurité). Ce labyrinthe est soulevé à une hauteur de 75 cm par rapport au sol. Chaque rat a été placé face à un bras ouvert sur la plateforme centrale afin de pouvoir explorer librement le labyrinthe pendant 5 minutes. Ce test a été réalisé dans une pièce faiblement éclairée.

L'anxiété est mesurée comme suit :

$$\frac{\text{Temps passé dans les bras ouverts}}{\text{Temps passé dans les bras ouverts + fermés}} \times 100$$

Une entrée n'est prise en compte que si les quatre pattes de l'animal sont dans le bras. Ainsi, un rat anxieux n'explore pas ou peu les bras ouverts comparé à un animal non anxieux.

Test dit « de dépression » : Test de la nage forcée (Forced Swim Test, FST)

Ce test se déroule sur deux jours consécutifs. Le premier jour, considéré comme pré-test dure 15 minutes par rat et correspond à l'habituation de l'animal au milieu, alors que le jour test dure 5 minutes. Il consiste à placer l'animal dans un cylindre en plexiglas transparent (50 cm de haut et 20 cm de diamètre) remplie de 30 cm d'eau à une température de 23 ± 2 °C. La profondeur de l'eau est délibérément choisie à 30 cm contrairement aux 15 cm utilisés à l'origine par Porsolt et al. (1978) afin d'empêcher le rat de toucher le fond du cylindre. Les animaux sont filmés afin d'analyser visuellement les différents paramètres : la durée de la nage, la durée d'immobilité et la durée d'escalade des parois. Le paramètre utilisé pour exprimer la dépression est la durée d'immobilité (en seconde).

2.8 Validation du modèle d'étude

Afin de vérifier les lésions et les sites d'implantation des électrodes, les rats ont été sacrifiés, les cerveaux prélevés rapidement et congelés à l'aide de l'isopentane à -50°C.

Vérification des déplétions DAergiques à la 6-OHDA, NAergiques au DSP-4 et 5-HTergiques à la pCPA

Nous avons réalisé une quantification de la concentration tissulaire en DA, NA et 5-HT en "post-mortem" grâce à la technique de chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

a. Traitement du tissu

Les structures cérébrales (cortex droit et gauche et striatum droit et gauche) sont rapidement retirées de -80°C par série de 4 et de manière aléatoire et sont directement placées dans la glace pour la pesée. Dès que le poids de la structure est déterminé, 200 µl d'HClO₄ (0,1N, 4°C) sont ajoutés. Les structures sont dissociées pendant 5 secondes environ par sonication à 4°C. L'homogénat est centrifugé à 13000 tours/min pendant 30 min à 4°C.

b. Analyse par HPLC des surnageants

La séparation des catécholamines est réalisée par HPLC en phase inversée. Une pompe isocratique (modèle 116, système Gold, Beckman, Paris) délivre la phase mobile à un débit de 1,2 ml/min à travers le système (pression ~ 1500 psi).

La phase mobile utilisée dans ces conditions a la composition suivante : NaH₂PO₄ (60 mM), Na₂EDTA (0,1mM), acide octylsulphonique (0,2 mM), 7 % méthanol et ajustée à un pH de 3,9 avec de l'acide orthophosphorique. La colonne (Cromasyl C8, 4,6 x 150 mm, 5 µm, Touzard et Matignon, Paris) est précédée d'une précolonne (Browlee-Newgard, RP-8, 15 X 3,2 mm, 7 µm). 20 µl de surnageant sont injectés (après dilution adaptée dans la phase mobile). Dans ces conditions, les temps de rétention sont les suivants : NA (4,2 min), DA (11 min) et 5-HT (26,5 min). Les échantillons sont injectés par un injecteur automatique (vanne rhéodyne 7725) équipé d'une boucle de 200 µl (injection en boucle partielle). Le système de HPLC est piloté par le logiciel GOLD.

c. Détection électrochimique

Les catécholamines sont détectées par électrochimie de type coulométrique. Ce système se compose d'une cellule de garde (modèle 5021, ESA) dont le potentiel est fixé à 0,1 V, une cellule analytique (modèle 5011, ESA) et un détecteur Coulochem II (ESA). Des potentiels de +350 mV et -270 mV sont appliqués pour oxyder et réduire les composés, respectivement. Le traitement du signal ampérométrique se fait par le logiciel spike2. Le seuil de détection pour les différentes molécules (rapport signal/bruit=3) est d'environ 15 pg/20 µl injectés.

Seuls les rats présentant une lésion DAergique et NAergique de plus de 65% et une lésion 5-HTergique de plus de 60% ont été sélectionnés pour les analyses statistiques des données comportementales.

Vérification du site d'implantation

Afin de localiser les sites d'implantations des électrodes de stimulation, la partie du cerveau contenant le NST est coupée au cryostat et une coloration histochimique à l'acétylcholinestérase est pratiquée sur les coupes histologiques. Cette coloration permet de distinguer les différentes structures sur les coupes, et le contraste qu'elle produit facilite la visualisation des traces des électrodes de stimulation.

Protocole : les coupes, d'une épaisseur de 25 µm (obtenues à l'aide d'un cryostat), ont été 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 0,2 M, 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 0,2 M, les coupes ont été révélées au sulfure d'ammonium (dilué au 1/100^e en tampon acétate 0,2 M), puis rincées trois fois avant d'être montées entre lame et lamelle. La localisation de la trace d'électrode a été réalisée grâce à l'observation au microscope optique.

Seuls les rats présentant leurs traces d'électrodes dans le NST sont sélectionnés pour les analyses statistiques des données comportementales.

2.9 Statistiques

Les comparaisons statistiques ont été réalisées grâce au logiciel SPSS (SPSS statistics 17.0, New-York, NY).

Analyses biochimiques

Afin de vérifier les déplétions des systèmes monoaminergiques, un groupe contrôle a été ajouté à l'étude. Les concentrations en DA, NA et 5-HT dans nos quatre différents groupes d'animaux ont été comparées à l'aide d'une ANOVA une voie suivie quand significatif d'un test PLSD de Fisher. Le seuil de significativité est de 0,05.

Tests comportementaux

La comparaison des effets des déplétions NAergique et/ou 5-HTergique chez les rats déplétés en DA sur les comportements moteurs et non moteurs a été réalisée à l'aide d'une ANOVA une voie suivie, quand significatif, d'un test PLSD de Fisher.

Au sein de chaque groupe, les effets induits par les différents traitements ont été comparés à l'aide d'une ANOVA une voie suivie, quand significatif, d'un test PLSD de Fisher.

Enfin, la comparaison de l'efficacité de chaque traitement suivant les déplétions monoaminergiques a été effectuée grâce à une ANOVA deux voies suivie pour chaque traitement d'une ANOVA une voie et d'un test PLSD de Fisher. Le seuil de significativité est de 0,05.

3. Résultats

3.1. Résultats biochimiques :

L'analyse biochimique par HPLC montre que l'injection bilatérale de 6-OHDA dans le MFB entraîne une déplétion importante en DA au niveau du striatum ($91\% \pm 1,6\%$, $p < 0,001$ vs Sham group, PLSD de Fisher, après une Anova une voie, $F[4;56]=37,95$, $p < 0,001$). De même, l'injection systémique de DSP-4 entraîne une forte déplétion en NA dans le cortex ($86\% \pm 3\%$, $p < 0,001$ vs Sham group, PLSD de Fisher $F[4;56]=20,1$, $p < 0,001$). L'injection systémique de pCPA entraîne également une diminution drastique de la concentration en 5-HT dans le cortex ($93\% \pm 1,7\%$, $p < 0,001$ vs Sham group, PLSD de Fisher, $F[4;56]=71,26$, $p < 0,001$).

3.2. Caractérisation comportementale du modèle

1) Comportement moteur

➤ Activité locomotrice

L'effet des déplétions NAergique et/ou 5-HTergique sur l'activité locomotrice chez les animaux ayant reçu une déplétion bilatérale en DA a été étudié (Fig. 1). Ces déplétions monoaminergiques modifient significativement l'activité locomotrice ($p < 0,01$, Anova une voie, $F[3;30]=5,545$; Fig. 1). En effet, la déplétion en 5-HT combinée à la déplétion en DA augmente l'activité locomotrice en comparaison avec la déplétion en DA seule ($p < 0,01$, PLSD de Fisher). Cependant, la déplétion en NA seule ou combinée avec la déplétion en 5-HT chez les rats 6-OHDA ne modifie pas l'activité locomotrice ($p > 0,05$, PLSD de Fisher, Fig. 1).

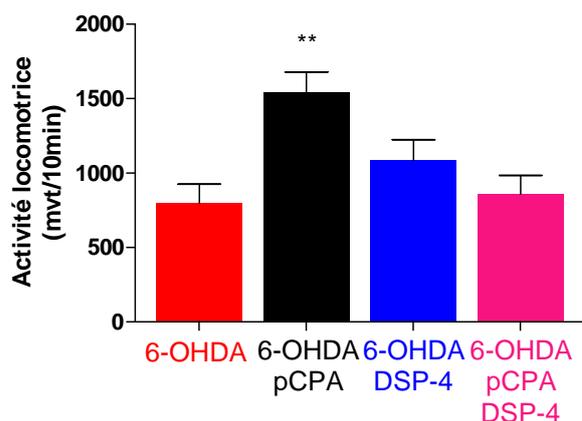


Figure 1 : Effet des différentes déplétions monoaminergiques sur l'activité locomotrice enregistrée par actimétrie. L'axe des ordonnées représente le nombre de mouvements réalisés en 10 minutes. Groupe 6-OHDA : n=8, groupe 6-OHDA/pCPA : n= 11, groupe 6-OHDA/DSP-4 : n=10, groupe 6-OHDA/pCPA/DSP-4 : n=7. ** $p < 0,01$ versus groupe 6-OHDA ; test PLSD de Fisher.

➤ Catalepsie

Le test standard de la barre a été utilisé afin de déterminer le score de catalepsie obtenu par les animaux ayant subi une, deux ou les trois déplétions monoaminergiques. Ces déplétions n'induisent pas de catalepsie chez l'animal 6-OHDA ($p > 0,05$, $F[3;43]=1,07$, Anova une voie ; résultats non montrés).

2) Comportements non moteur

➤ Anxiété

L'état anxieux des animaux a été étudié en analysant le temps passé dans les bras ouverts lors du test du labyrinthe en croix surélevé. Les déplétions monoaminergiques modifient significativement le pourcentage du temps passé dans les bras ouverts ($p < 0,001$, Anova une voie, $F[3;33]=7,3$; Fig. 2). En effet, la déplétion en 5-HT combinée à la déplétion en DA augmente le pourcentage du temps passé dans les bras ouverts en comparaison avec la déplétion en DA seule ($p < 0,01$, PLSD de Fisher).

Cependant, la déplétion en NA seule ou combinée avec la déplétion en 5-HT chez les rats 6-OHDA n'affecte pas le pourcentage du temps passé dans les bras ouverts ($p > 0,05$, PLSD de Fisher ; Fig. 2).

➤ Dépression

Le comportement dépressif a été étudié en mesurant la durée d'immobilité des animaux dans l'eau durant le test de la nage forcée. Les déplétions monoaminergiques modifient significativement le pourcentage du temps d'immobilité des rats dans l'eau ($p < 0,001$, Anova une voie, $F[3;40]=14,9$; Fig. 3). En effet, seule la déplétion combinée des trois monoamines induit une augmentation significative du pourcentage du temps d'immobilité par rapport aux rats ayant reçu une déplétion DAergique seule ($p < 0,001$, PLSD de Fisher, Fig. 3).

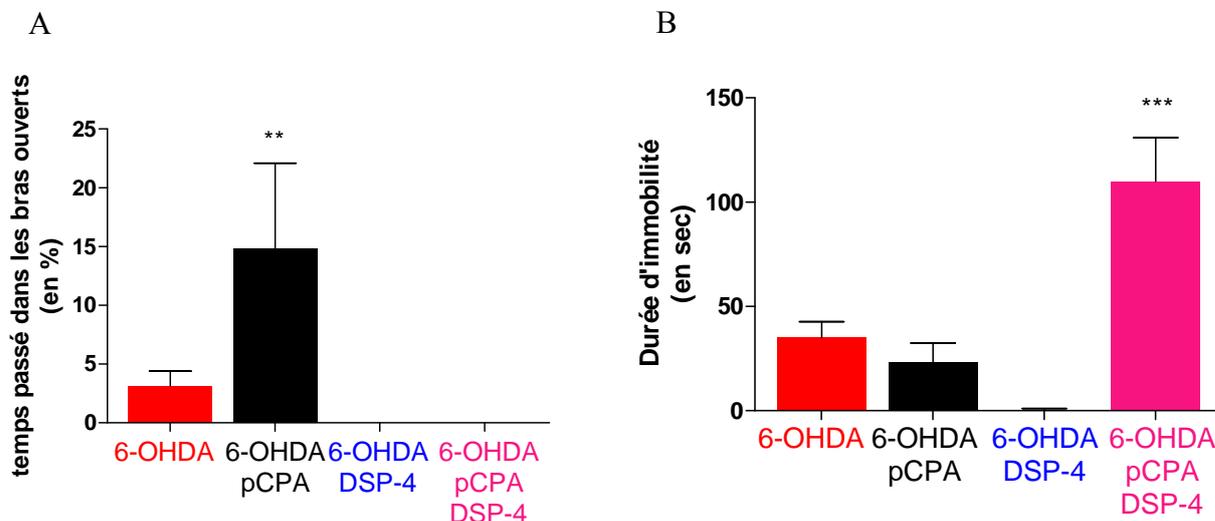


Figure 2 : Effet des déplétions monoaminergiques sur les troubles non moteurs A : Effet des déplétions sur le temps passé dans les bras ouverts. B : Effet des déplétions sur l'immobilité dans l'eau. Groupe 6-OHDA, n= 11; groupe 6-OHDA/pCPA, n=10 ; groupe 6-OHDA/DSP-4, n=10; groupe 6-OHDA/pCPA/DSP-4, n=9. sec= seconde. ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ versus groupe 6-OHDA.; test PLSD de Fisher.

3.3 Effets des traitements à la L-Dopa et de la SHF du NST sur le comportement

Afin de s'affranchir de l'effet des déplétions de par elles même et donc d'étudier spécifiquement l'efficacité des traitements suivant les différents groupes d'animaux, les résultats ont été exprimés comme suit : [valeurs obtenues sans traitements] – [valeurs obtenues pendant le traitement] (cf figure 2).

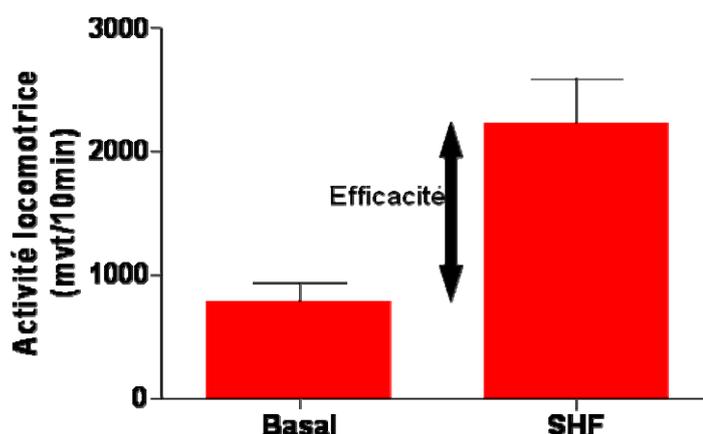


Figure 2 : Exemple de calcul de l'efficacité des traitements. Basal : activité locomotrice sans traitement ; SHF : activité locomotrice des mêmes animaux pendant la stimulation à haute fréquence. Efficacité = différence entre basal et SHF

1) Comportement moteur

L'effet des deux traitements seuls ou combinés a été étudié sur l'activité locomotrice dans les différentes situations de déplétions monoaminergiques.

Chez les rats 6-OHDA, les traitements antiparkinsoniens modifient significativement l'activité locomotrice ($p < 0,05$, Anova une voie, $F[3,25]=3,41$). En effet, la SHF du NST seule ou combinée à la L-Dopa augmente de façon significative l'activité locomotrice chez les rats 6-OHDA ($p < 0,01$ et $p < 0,05$, respectivement, PLSD de Fisher, Fig. 3). Par contre, la L-Dopa seule n'entraîne pas de modification significative chez ces animaux ($p > 0,05$; Fig. 3).

Au contraire, chez les rats 6-OHDA avec une déplétion en NA et/ou en 5-HT, la SHF du NST, la L-Dopa ainsi que les deux traitements combinés n'ont aucun effet significatif sur l'activité locomotrice.

Ainsi, les deux traitements antiparkinsoniens modifient de façon différente l'activité locomotrice selon les différents groupes d'animaux ($p < 0,05$, Anova deux voies, $F[15;93]=2,43$, fig. 3).

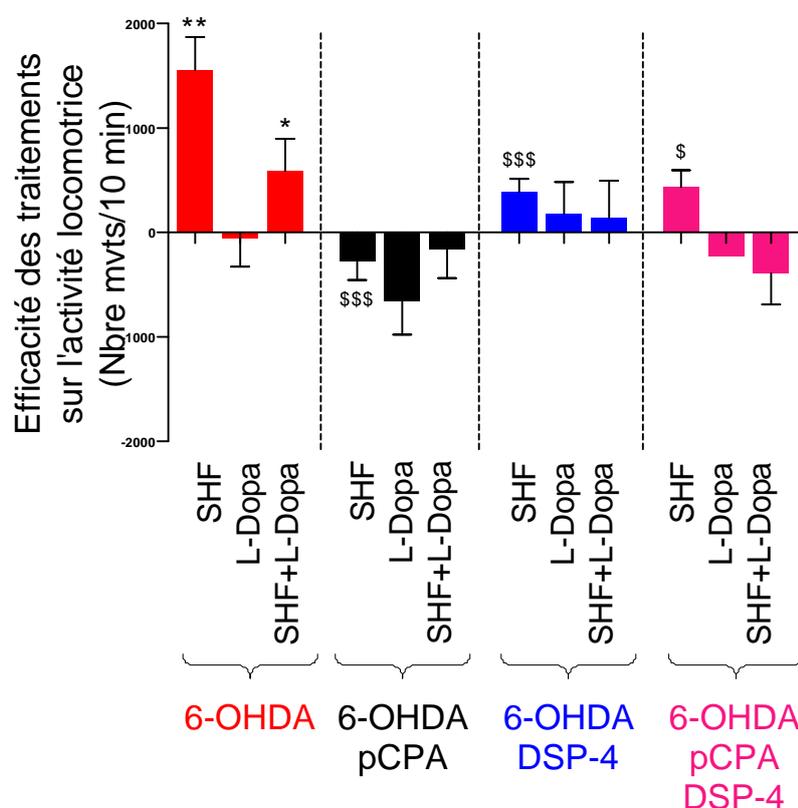


Figure 3 : Effets des traitements sur l'activité locomotrice chez les différents groupes d'animaux. SHF : stimulation à haute fréquence du NST. Groupe 6-OHDA, n=8; groupe 6-OHDA/pCPA, n=11; groupe 6-OHDA/DSP-4, n=10; groupe 6-OHDA/pCPA/DSP-4, n=7. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ versus groupe 6-OHDA. \$ = $p < 0,05$; \$\$\$ = $p < 0,01$ versus SHF du groupe 6-OHDA ; test PLSD de Fisher.

2) Comportements non moteurs

L'effet des deux traitements seuls ou combinés a été étudié sur les troubles non moteurs (anxiété et dépression) observés chez les patients parkinsoniens dans les différentes situations de déplétions monoaminergiques.

➤ Anxiété

Chez les rats 6-OHDA, les traitements antiparkinsoniens modifient significativement le pourcentage de temps passé dans les bras ouverts ($p < 0,01$, Anova une voie, $F[3,38]=4,56$, Fig. 4). En effet, la L-Dopa augmente de façon significative le temps passé dans les bras ouverts chez les rats 6-OHDA ($p < 0,01$, PLSD de Fisher, Fig. 4).

Chez les rats 6-OHDA avec une déplétion en 5-HT, les traitements modifient significativement le pourcentage de temps passé dans les bras ouverts ($p < 0,05$, Anova une voie, $F[3,22]=3,98$). En effet, la SHF ainsi que la L-Dopa diminuent de façon significative le temps passé dans les bras ouverts chez ces rats ($p < 0,05$ et $p < 0,01$, respectivement, PLSD de Fisher, Fig. 4).

Chez les rats 6-OHDA avec une déplétion en NA seule ou combinée à une déplétion en 5-HT, les traitements n'ont pas d'effet significatif sur le pourcentage de temps passé dans les bras ouverts ($p > 0,05$; Fig. 4).

Les traitements antiparkinsoniens ne modifient pas de façon différente le pourcentage de temps passé dans les bras ouverts selon les différents groupes de rats ($p > 0,05$, Anova deux voies, $F[15,102]=1,67$; Fig. 4).

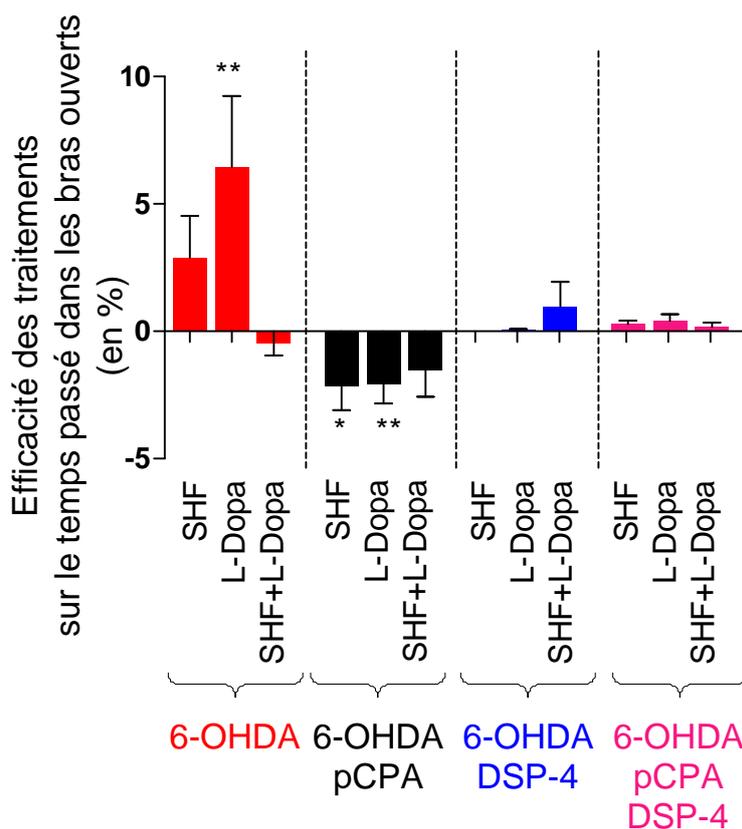


Figure 4 : Effets des traitements sur le pourcentage de temps passé dans les bras ouverts chez les différents groupes d'animaux.

SHF : stimulation à haute fréquence du NST. Groupe 6-OHDA, n=11 ; groupe 6-OHDA/pCPA, n=9 ; groupe 6-OHDA/DSP-4, n=10 ; groupe 6-OHDA/pCPA/DSP-4, n=9. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ versus groupe 6-OHDA ; test PLSD de Fisher.

Chez les rats 6-OHDA, les traitements antiparkinsoniens modifient significativement la durée d'immobilité dans l'eau ($p < 0,001$, Anova une voie, $F[3,33]=6,86$). En effet, Les trois traitements diminuent de façon significative la durée d'immobilité chez les rats 6-OHDA (SHF : $p < 0,01$, L-Dopa : $p < 0,01$, et SHF associée à la L-Dopa : $p < 0,01$, PLSD de Fisher ; Fig. 5).

De même, les traitements modifient significativement la durée d'immobilité chez les rats 6-OHDA déplétés en NA et en 5-HT ($p < 0,01$, Anova une voie, $F[3,26]=4,7$). En effet, les trois traitements diminuent de façon significative la durée d'immobilité chez les rats avec une déplétion des trois monoamines (SHF : $p < 0,05$, L-Dopa : $p < 0,01$, SHF associé à la L-Dopa : $p < 0,01$, PLSD de Fisher ; Fig 5).

Au contraire, les traitements n'ont aucun effet sur les rats 6-OHDA déplétés en NA ou en 5-HT ($p > 0,05$; PLSD de Fisher ; Fig. 5).

Ces traitements antiparkinsoniens modifient de façon différente la durée d'immobilité selon les déplétions ($p < 0,001$, Anova deux voies, $F[14,110]=4,96$). En effet, la SHF du NST influence différemment la durée le pourcentage d'immobilité selon les différentes déplétions monoaminergiques ($p < 0,01$, Anova une voie, $F[3,37]=5,79$, Fig. 5). En effet, la SHF du NST diminue de façon significativement plus importante la durée d'immobilité chez les rats avec la déplétion des trois monoamines par rapport aux animaux avec une déplétion en DA seule ($p < 0,05$, PLSD de Fisher, Fig. 5).

De même, la L-Dopa influence différemment la durée d'immobilité selon les différentes déplétions ($p < 0,001$, Anova une voie, $F[3,29]=22,83$). En effet, la L-Dopa diminue, de façon significative, la durée d'immobilité chez les rats avec la déplétion des trois monoamines par rapport aux animaux avec une déplétion en DA seule ($p < 0,01$, PLSD de Fisher, fig. 6).

La SHF associée à la L-Dopa influence également différemment le pourcentage d'immobilité selon les différentes déplétions monoaminergiques ($p < 0,001$, Anova une voie, $F[3,20]=12,16$; Fig 5). En effet, ce traitement diminue de façon significativement plus importante la durée d'immobilité chez les rats avec la déplétion des trois monoamines par rapport aux animaux avec une déplétion en DA seule ($p < 0,01$, PLSD de Fisher).

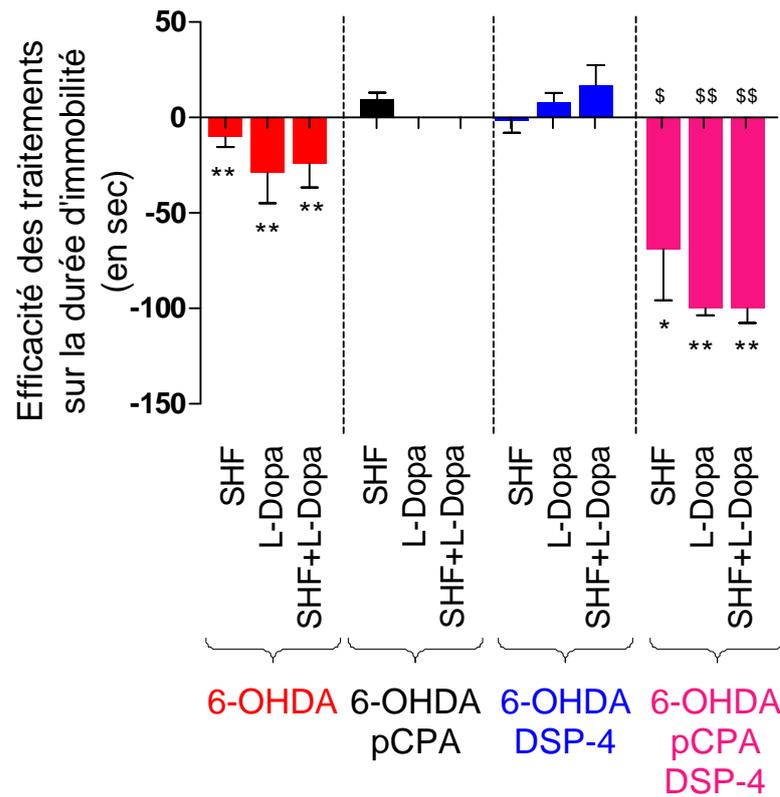


Figure 5 : Effets des traitements sur la durée d'immobilité chez les différents groupes d'animaux.

SHF : stimulation à haute fréquence du NST. Sec : seconde ; Groupe 6-OHDA, n=10 ; groupe 6-OHDA/pCPA, n=10 ; groupe 6-OHDA/DSP-4, n=10; groupe 6-OHDA/pCPA/DSP-4, n=7. *= p<0,05 ; ** = p<0,01 versus groupe 6-OHDA ; \$=p<0,05 ; \$\$=p<0,01 versus SHF du groupe 6-OHDA ; test PLSD de Fisher.

4. Discussion

4.1 Caractérisation du modèle : effet des déplétions monoaminergiques sur les comportements moteur et non-moteurs

Aucune catalepsie n'a été observée après les différentes déplétions. De ce fait, les déficits moteurs observés grâce au test d'actimétrie ne sont pas associés à ce trouble délétère. Nos résultats ont montré que la déplétion NAergique seule ou combinée avec la déplétion en 5-HT chez les rats 6-OHDA n'entraîne pas de modification de l'activité locomotrice en comparaison avec les animaux ayant reçu une déplétion DAergique seule. Ces résultats confirment l'origine DAergique des déficits moteurs dans la maladie de Parkinson. Cependant, et de façon inattendue, la déplétion 5-HTergique augmente l'activité locomotrice chez les rats 6-OHDA. Ceci suggère que cette déplétion en 5-HT serait impliquée dans des mécanismes compensatoires des désordres moteurs dans la maladie de Parkinson. Plusieurs études ont montré l'existence d'une forte interaction entre les deux systèmes (Dray, 1981 ; Loughlin et Fallon, 1982). De plus, Guiard et al. (2008) ont montré que la lésion des neurones 5-HTergiques induit une augmentation de l'activité des neurones DAergiques. Ainsi cette levée de l'inhibition des neurones DAergiques suite à l'injection de pCPA chez nos animaux 6-OHDA induirait une libération plus importante de DA. Cependant, comme dans nos conditions expérimentales le pourcentage des neurones DAergiques survivants est faible, l'amélioration du déficit moteur peut aussi être due à un effet réseau impliquant les ganglions de la base. En effet, l'ensemble des structures de ce réseau reçoit des projections 5-HTergiques du RD (Steinbusch, 1981 ; Azmitia et Segal, 1978). Ainsi l'absence de la modulation de la 5-HT au niveau de ces structures pourrait compenser les effets dus à la perte DAergique.

Toutefois, l'amélioration du déficit moteur retrouvée chez ces rats 6-OHDA/pCPA est altérée par la déplétion additionnelle en NA. Ceci est en accord avec nos données précédentes (partie 1) montrant que la déplétion NAergique induit un déficit moteur similaire à celui de la

déplétion DAergique. Ces résultats confirment l'implication directe du système NAergique dans le contrôle moteur et par conséquent sa déplétion serait, de la même façon que la déplétion DAergique, impliquée dans la physiopathologie des troubles moteurs de la maladie de Parkinson.

D'après nos précédents résultats (partie 1), la déplétion DAergique unilatérale n'est pas suffisante seule pour induire un comportement d'anxiété. Au contraire, nos résultats actuels montrent que la déplétion DAergique bilatérale seule induit un état anxieux chez les animaux. Ceci montre la nécessité d'une déplétion bilatérale dans l'induction de ce trouble. De plus, nos résultats montrent que l'état anxieux induit par la lésion DAergique bilatérale est amélioré par la déplétion en 5-HT en accord avec l'étude de Briley et al. (1990). Par contre, cette amélioration a été détériorée par l'addition de la déplétion NAergique. Ces données suggèrent qu'un équilibre dans la transmission des trois systèmes monoaminergiques est indispensable dans le contrôle de l'anxiété.

Les tests utilisés pour mesurer l'activité locomotrice et le comportement anxieux de l'animal, nous permettent d'exclure l'implication des déficits moteurs dans le test d'anxiété et inversement. Ainsi les comportements moteurs et d'anxiété semblent être régis par les mêmes mécanismes de modulation impliquant l'interaction des trois monoamines comme l'a supposé Taylor et al. (2009).

En ce qui concerne la dépression, nos résultats montrent que la déplétion DAergique bilatérale seule ou combinée à la déplétion en NA ou en 5-HT n'entraîne pas de trouble de type dépressif. Seule la déplétion combinée des trois monoamines induit un « état dépressif » se traduisant par une augmentation de la durée d'immobilité des animaux dans le test de la nage forcée. Ceci suggère donc que la dépression développée chez les patients parkinsoniens n'est pas associée qu'à la dégénérescence des neurones 5-HTergique mais à sa combinaison avec delà déplétion en NA et en DA. Des études biochimiques en microdialyse *in vivo* ont

montré que le traitement de la dépression par des antidépresseurs, comme les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la 5-HT, induit une augmentation du niveau des trois monoamines (Damsa et al., 2004). De plus, des études d'imageries ont révélé le lien entre la perte des neurones DAergique et NAergique et le niveau de dépression (Remy et al., 2005). Ainsi, nos résultats prouvent qu'il existe une relation réciproque et fonctionnelle entre les trois systèmes monoaminergiques et les troubles de la dépression associés à la maladie de Parkinson.

4.2. Effet des traitements antiparkinsoniens sur les comportements induits par les différentes déplétions monoaminergiques

La L-Dopa ainsi que la SHF du NST sont les deux traitements de référence utilisés chez les patients parkinsoniens. Cependant dans certaines situations, comme les stades avancés de la maladie et/ou la présence de troubles cognitifs et émotionnels, ces traitements perdent leur efficacité thérapeutique et/ou induisent des effets secondaires indésirables. Notre étude apporte des évidences permettant de comprendre l'origine des effets des traitements et de leur perte d'efficacité sur les déficits induits par les différentes déplétions monoaminergiques mais également sur les conditions d'induction des effets secondaires.

La SHF du NST induit une amélioration spectaculaire de l'activité locomotrice chez les animaux présentant une déplétion DAergique bilatérale seule. Cet effet est tout à fait similaire à celui décrit par des travaux antérieurs chez le rat 6-OHDA (Temel et al., 2005), chez le singe MPTP (Benazzouz et al., 1993 ; 1996) et chez la majorité des patients opérés (Limousin et al., 1998 ; Krack et al., 2003).

De façon inattendue, nos résultats montrent que la L-Dopa seule est inefficace sur le déficit locomoteur induit par la déplétion en DA. On peut penser que la faible quantité de cellules DAergiques survivantes (environ 10%) à la suite de la lésion DAergique sévère ne suffit pas à la conversion de la L-Dopa en DA. D'autre part, il est probable que la dose de L-Dopa utilisée (12 mg/kg) ne soit pas adaptée à notre modèle animal. En effet, cette dose peut

induire des effets secondaires de type dyskinétiques gênant le comportement locomoteur. Ceci est confirmé par le fait que la L-Dopa quand elle est associée à la SHF du NST, réduit l'amélioration de l'activité locomotrice induite par la SHF du NST seule.

Chez les animaux avec une déplétion DAergique combinée avec celle de la NA et/ou de la 5-HT, la SHF du NST n'induit pas d'amélioration importante de l'activité locomotrice. Ces résultats montrent que cette approche thérapeutique n'améliore que les déficits moteurs induits par la déplétion DAergique expliquant ainsi certains résultats non satisfaisants obtenus chez certains patients stimulés.

Au contraire, la L-Dopa, et non la SHF du NST, améliore l'état anxieux induit par une déplétion DAergique bilatérale s'exprimant par une augmentation du temps passé dans les bras ouverts. Ceci confirme l'origine DAergique des troubles de l'anxiété en accord avec les données cliniques obtenues chez les patients parkinsoniens montrant que ce symptôme est dopamine-dépendant (Chaudhuri and Schapira, 2009). Cependant, la L-Dopa au même degré que la SHF du NST induit une aggravation de l'anxiété chez les rats avec une déplétion combinée en DA et en 5-HT et n'induit aucune amélioration ni aggravation de l'état anxieux chez les rats avec une déplétion combinée en DA et en NA ou une triple déplétion monoaminergique. Ces résultats suggèrent que chez certains patients parkinsoniens montrant une résistance de ce symptôme au traitement à la L-Dopa, les systèmes DAergiques et NAergiques combinés ou les trois systèmes monoaminergiques sont affectés.

Dans la première partie, nous avons pu mettre en évidence que le trouble dépressif était associé à un défaut dans la transmission des trois monoamines. Dans le contexte de la maladie de Parkinson, il a été montré que la SHF du NST induit la manifestation de troubles de type dépressifs associés à la diminution de l'activité des neurones 5-HTergiques du raphé dorsal chez le rat (Temel et al., 2007). Plus récemment, des données de notre équipe ont montré que la SHF du NST diminue le niveau de libération de 5-HT dans plusieurs structures cérébrales

incluant le cortex et l'hippocampe (Navailles et al., 2010). Dans notre étude, de façon surprenante, nous montrons que la L-Dopa au même titre que la SHF du NST seule ou combinée à la L-Dopa améliore l'état dépressif des animaux ayant une déplétion DAergique seule et ceci d'autant plus chez les rats avec les déplétions combinées des trois monoamines. Au contraire, les traitements n'ont aucun impact sur le niveau de dépression chez les rats 6-OHDA avec une déplétion en NA ou en 5-HT. La réponse aux traitements dans ce trouble dépend donc de l'interaction entre les trois monoamines. Cependant, nous n'avons sélectionné que les animaux dont les électrodes de stimulation ont été implantées au niveau du centre du NST correspondant à la partie sensorimotrice du noyau chez l'homme (Benarroch, 2008). Ceci nous a permis aussi de nous affranchir des effets secondaires, cognitifs et limbiques, résultant de la diffusion du courant électrique dans les régions avoisinantes. En ce qui concerne la L-Dopa, la littérature est partagée quant à ses effets sur la dépression. Certains auteurs ont montré une amélioration de l'état dépressif associée à la prise de L-Dopa (Yahr, 1969), alors que d'autres études montrent une détérioration de cet état (Cherington, 1970 ; Sacks, 1970). Enfin, des études plus récentes ont aussi montré que la L-Dopa n'avait pas d'effet sur la dépression chez les patients parkinsoniens (Sethi, 2008 ; Marsh, 1973). Ainsi le rôle de la L-dopa dans le traitement de ce trouble non-moteur reste à élucider. Dans notre modèle, il serait intéressant d'étudier plusieurs doses de L-Dopa afin de mieux comprendre ces effets. De plus, le test de la nage forcée implique un acte moteur. Ainsi, la diminution du temps d'immobilité suite à la SHF et à la prise de L-Dopa pourrait simplement être due à l'amélioration du comportement moteur. Cependant, nous n'avons pas observé d'amélioration de ce comportement moteur après la prise de L-Dopa avec le test de l'actimètre. En effet, l'actimètre met en jeu des mouvements locomoteurs volontaires alors que le test de la nage forcée met en jeu l'acte moteur « de survie » de l'animal. Ainsi, la sensibilité de ces deux tests dans la mesure de l'acte moteur n'est pas la même. Il serait donc intéressant de confirmer les

résultats obtenus à l'aide d'autres tests tel que le test de consommation du sucrose qui ne met pas en jeu l'acte moteur de l'animal. Ainsi ces résultats inattendus ouvrent la voie à de nouvelles investigations visant à mieux comprendre l'origine de ce désordre cognitif qui reste très difficile à corriger chez les patients parkinsoniens.

Bibliographie

- Azmitia EC, Segal M An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol*. 1978 Jun 1; **179**(German *et al.*, 1992):641-67.
- Benazzouz A, Breit S, Koudsie A, Pollak P, Krack P, Benabid AL. Intraoperative microrecordings of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2002 ; **17**(Suppl 3):S145-9.
- Bergman H, Wichmann T, Karmon B, DeLong MR. The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of Parkinsonism. *J Neurophysiol*. 1994 Aug; **72**(2):507-20.
- Bergman H, Wichmann T, DeLong MR. Reversal of experimental Parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science*. 1990 Sep 21 ; **249**(4975):1436-8.
- Briley M, Chopin P, Moret C. Effect of serotonergic lesion on "anxious" behaviour measured in the elevated plus-maze test in the rat. *Psychopharmacology* (Parry *et al.*, 1994). 1990; **101**(2):187-9.
- Chan-Palay V, Asan E Alterations in catecholamine neurons of the locus coeruleus in senile dementia of the Alzheimer type and in Parkinson's disease with and without dementia and depression. *J Comp Neurol*. 1989 Sep 15; **287**(German *et al.*, 1992):373-92.
- Chaudhuri KR, Schapira AH. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurol*. 2009 May; **8**(5):464-74. Review.
- Damsa C, Bumb A, Bianchi-Demicheli F, Vidailhet P, Sterck R, Andreoli A, Beyenburg S. "Dopamine-dependent" side effects of selective serotonin reuptake inhibitors: a clinical review. *J Clin Psychiatry*. 2004 Aug; **65**(8):1064-8. Review.
- Delaville C, De Deurwardère P, Benazzouz A. Noradrenaline and Parkinson's disease. *Frontiers in systems neuroscience*. 2011.
- Delaville C, Chetrit J, Abdallah K., Morin S, Carroit L., De Deurwaerdere P., Benazzouz A. Emerging dysfunctions consequent to combined monoaminergic depletions in parkinsonisme, *Neurobiology of aging*; in revision.
- Ehringer H, Hornykiewicz O. Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. *Parkinsonism Relat Disord*. 1998 Aug; **4**(2):53-7.
- Fritschy JM, Grzanna R. Immunohistochemical analysis of the neurotoxic effects of DSP-4 identifies two populations of noradrenergic axon terminals. *Neuroscience*. 1989 ; **30**(1):181-97.
- Guiard BP, El Mansari M, Merali Z, Blier P. Functional interactions between dopamine, serotonin and norepinephrine neurons: an in-vivo electrophysiological study in rats with monoaminergic lesions. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2008 Aug; **11**(5):625-39. Epub 2008 Jan 21
- Hauser RA. New considerations in the medical management of early Parkinson's disease: impact of recent clinical trials on treatment strategy. *Parkinsonism Relat Disord*. 2009 Dec; **15** Suppl 3:S17-21.
- Kish S. Biochemistry of Parkinson's disease : is a brain serotonergic deficiency a characteristic of idiopathic Parkinson's disease? *Advances in Neurology*, volume 91 ; 39-49 ; edited by A.Gordin, Kaakkola S., and Teravainen H.; Philadelphia 2003
- 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. Five-year follow-up of bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med*. 2003 Nov 13; **349**(20):1888-91.
- Navailles S, Bioulac B, Gross C, De Deurwaerdère P. Chronic L-DOPA therapy alters central serotonergic function and L-DOPA-induced dopamine release in a region-dependent manner in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2011 Feb; **41**(2):585-90. Epub 2010 Nov 16.
- Ni Z, Bouali-Benazzouz R, Gao DM, Benabid AL, Benazzouz A. Time-course of changes in firing rates and firing patterns of subthalamic nucleus neuronal activity after 6-OHDA-induced DA depletion in rats. *Brain Res*. 2001 Apr 27; **899**(1-2):142-7.
- Paxinos, G., Watson, C., *The rat brain in stereotaxic coordinates*; Academic Press, New York, 1996
- Temel Y, Boothman LJ, Blokland A, Magill PJ, Steinbusch HW, Visser-Vandewalle V, Sharp T. Inhibition of 5-HT neuron activity and induction of depressive-like behavior by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Oct 23; **104**(43):17087-92. Epub 2007 Oct 17.

II.4. Conclusions et perspectives

Ces résultats sont résumés dans le tableau 4. Cependant, ils restent préliminaires en raison du faible nombre d'animaux dans certaines conditions. Ils doivent donc être confirmés.

| | Activité locomotrice | Anxiété | Dépression |
|------------|----------------------|---------|------------|
| DA+5-HT | ↗ | ↘ | = |
| DA+NA | = | = | = |
| DA+5-HT+NA | = | = | ↗ |

Tableau 4 : Récapitulatif de l'effet des déplétions bilatérales en DA, NA et 5-HT sur les différents comportements. DA+5-HT : déplétion dopaminergique et 5-HTergique ; DA+NA : déplétions DAergique et NAergique ; DA+5-HT+NA : déplétions des trois systèmes monoaminergiques ; = : pas d'effet de l'addition de la déplétion NA et/ou 5-HT chez les rats déplétés en DA . ↗ : augmentation ; ↘ : diminution

La SHF est efficace sur le déficit moteur chez les rats 6-OHDA. Cette efficacité est dégradée quand les deux autres systèmes monoaminergiques sont affectés. Ceci pourrait expliquer le manque d'efficacité de la SHF du NST chez certains patients. Le traitement pharmacologique à la L-Dopa améliore l'état anxieux chez les rats 6-OHDA montrant que ce symptôme est dopamine-dépendant. De plus, les deux traitements antiparkinsoniens seules ou combinés ensemble améliorent l'état dépressif associé à la déplétion des trois monoamines. Nos résultats, résumés dans le tableau 5, apportent de nouvelles évidences permettant de comprendre le rôle des trois monoamines dans la physiopathologie et la thérapie de la maladie de Parkinson.

| | Activité locomotrice | | | Anxiété | | | Dépression | | |
|-------------------------------|----------------------|--------|----------------|---------|--------|----------------|------------|--------|----------------|
| | SHF | L-Dopa | SHF+ L-Dopa | SHF | L-Dopa | SHF+ L-Dopa | SHF | L-Dopa | SHF+ L-Dopa |
| DA | ↗ | | ↗ | | ↘ | | ↘ | ↘ | ↘ |
| DA + 5-HT | | | | | | | | | |
| DA + NA | | | | | | | | | |
| DA + 5-HT + NA | | | | | | | ↘ | ↘ | ↘ |

Tableau 5 : Récapitulatif de l’efficacité des traitements antiparkinsoniens selon les déplétions bilatérales en DA, NA et/ou 5-HT sur les différents comportements. DA : déplétion dopaminergique ; DA+5-HT : déplétion dopaminergique et 5-HTergique ; DA+NA : déplétions DAergique et NAergique ; DA+5-HT+NA : déplétions des trois systèmes monoaminergiques ; ↘ : diminution du comportement.

En perspective et afin de mieux appréhender les mécanismes de la L-Dopa, nous envisageons d’étudier les effets moteurs et non moteurs de plusieurs doses de L-Dopa afin de déterminer la dose la plus adaptée à notre modèle pour améliorer les déficits moteurs.

D’autre part, afin d’étudier l’implication des ganglions de la base dans le traitement des déficits induits par la déplétion des trois monoamines, il serait intéressant de réaliser une étude électrophysiologique au niveau des différentes structures de ce système.

En conclusion, l’ensemble de nos résultats apporte de nouvelles évidences permettant de comprendre le rôle des trois monoamines dans la physiopathologie et la thérapie de la maladie de Parkinson. Le système DAergique est largement étudié et plusieurs études s’intéressent au système 5-HTergique. Cependant peu d’études se sont focalisées sur l’impact de la NA dans cette pathologie. Notre première partie, tout comme la seconde, a mise en évidence l’importance de ce système noradrénergique au niveau du comportement moteur mais aussi au niveau du NST. Il nous a donc semblé intéressant d’étudier plus précisément le

mécanisme d'action de la NA par la modulation de ses récepteurs au niveau du NST. Pour cela, nous avons étudié les effets des agonistes et antagonistes des récepteurs NAergiques alpha injectés localement dans le NST sur l'activité électrique des neurones de ce noyau et aussi sur le comportement moteur.

III- Contrôle NAergique du NST et du comportement moteur in vivo chez le rat

III.1. Résumé

Au sein des ganglions de la base, le NST est l'une des structures recevant le plus de projections NAergiques. Il a été montré que l'injection i.p. d'agents NAergiques modulait l'activité comportementale mais aussi électrophysiologique du NST chez des animaux sains et chez le rat 6-OHDA. Cependant, ces effets pourraient être du à une modulation directe ou indirecte au niveau du NST. Ainsi l'article suivant étudie l'effet de l'injection locale dans le NST d'agoniste et antagonistes des récepteurs NAergiques alpha 1 et alpha2 sur le comportement moteur et sur l'activité électrophysiologique des neurones du NST chez des animaux sains et des animaux 6-OHDA.

En utilisant des agonistes et antagonistes sélectifs, nous avons ainsi pu montrer que le NST possédait des récepteurs alpha 1 et alpha 2 fonctionnels qui permettent le contrôle de la fréquence mais aussi du mode de décharge des neurones du NST, ce qui permet de moduler le comportement moteur. Ainsi, l'activation des récepteurs alpha 1 entraîne une augmentation de la fréquence de décharge sans modification du comportement moteur alors que l'activation des récepteurs alpha 2 entraîne une augmentation du mode de décharge en bouffée ainsi qu'une diminution de l'activité locomotrice. Ces résultats sont similaires chez les animaux sham et 6-OHDA prouvant que la modulation NAergique ne dépend pas de l'innervation DAergique au sein des ganglions de la base. Ces résultats ont ainsi pu mettre en évidence que les récepteurs alpha 2 jouent un rôle important dans la genèse de l'activité en bouffée au niveau du NST ce qui pourrait être à l'origine des déficits moteurs.

III.2. Article 5: Noradrenergic control of the subthalamic nucleus and motor behavior

Journal section: Neurobiology of Disease

Noradrenergic control of the subthalamic nucleus and motor behavior

Abbreviated title: Noradrenaline and subthalamic nucleus

Claire Delaville^{1,2}, Jonathan Zapata^{1,2}, Laura Cardoit^{1,2}, and Abdelhamid Benazzouz^{1,2,3*}

1. Université de Bordeaux, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, F-33000 Bordeaux, France

2. Centre National de la Recherche Scientifique, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, F-33000 Bordeaux, France

3. Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

* Correspondence should be addressed to Dr. Abdelhamid Benazzouz, Université Bordeaux Segalen, CNRS UMR 5293, Institut des Maladies Neurodégénératives, 146 rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France

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

Tel: +33 557 57 46 25

Number of figures: 4

Number of pages: 20

Number of words for Abstract (247), Introduction (433), and Discussion (1356)

Financial disclosures

There is no financial disclosure or conflict of interest for any of the authors. This article has not been submitted elsewhere. All co-authors have seen and agree with the contents of the manuscript.

Acknowledgements

Claire Delaville was supported by a fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie (MENRT). The University Bordeaux Segalen, the "Centre National de la Recherche Scientifique" (CNRS) and the "Association France Parkinson" funded this study. We wish to thank Dr. Martin Guthrie for English reading of the manuscript.

Abstract

The subthalamic nucleus (STN) is a basal ganglia component playing a key role in motor control. Although the modulation of STN neuronal activity by dopamine is extensively studied, the modulation by noradrenaline is still unknown. The present study aimed to investigate the effects of local injection of noradrenergic agents on the firing activity of STN neurons and the impact of these agents on locomotor activity in sham and 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-lesioned rats. Using selective agonists and antagonists of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ adrenergic receptors, we show that functional $\alpha 1$ - and $\alpha 2$ -ARs are present in the STN and that modulation of these receptors controls STN firing. We further demonstrate that local infusion of clonidine, an $\alpha 2$ -AR agonist, induced a switch from tonic to bursty pattern without changing the firing rate. This change in the firing pattern was prevented by the local infusion of idazoxan, an $\alpha 2$ -AR antagonist. Furthermore, clonidine injection into the STN reduced locomotor activity in sham and 6-OHDA-lesioned rats. In contrast, local injection of phenylephrine, an $\alpha 1$ -AR agonist increased the firing rate of STN neurons without changing the firing pattern. In parallel, phenylephrine did not change locomotor activity. This is the first evidence showing the implication of $\alpha 1$ -ARs in the modulation of firing rate and $\alpha 2$ -ARs in the modulation of the firing pattern of STN neurons. Furthermore, our data provide also evidence that activation of the STN $\alpha 2$ -ARs plays a key role in the genesis of STN bursty activity, which may be at the origin of motor deficits.

Key words: subthalamic nucleus; Noradrenaline; Parkinson's disease; locomotor activity; extracellular recordings; 6-hydroxydopamine; Clonidine; Phenylephrine; Idazoxan; Benaxothian.

Introduction

Parkinson's disease (PD) is a neurological disorder characterized by the manifestation of motor symptoms such as akinesia, rigidity and rest tremor. Despite the focus on dopamine (DA) cell degeneration in the substantia nigra pars compacta (SNc) (Ehringer and Hornykiewicz, 1960), PD is characterized also by the loss of noradrenaline (NA) neurons of the locus coeruleus (LC) (Bertrand et al., 1997; Fornai et al., 2007). Several studies have shown that NA depletion, similarly to DA depletion, induced motor deficits in rodents (Donaldson et al., 1976; Rommelfanger and Weinshenker, 2007). Moreover, blocking the α 2-adrenergic receptors (α 2-ARs), mainly inhibitory autoreceptors (Langer, 1974; Starke, 1972), reversed tremor and rigidity induced by reserpine in the rat (Colpaert, 1987) and potentiated ipsilateral circling induced by the DA releasing agent amphetamine in the unilateral 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-lesioned animals (Chopin *et al.*, 1999; Mavridis *et al.*, 1991). α 2-AR antagonists also improved parkinsonian motor disabilities in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated monkeys (Bezard *et al.*, 1999; Colpaert, 1987) and preserved the antiparkinsonian effects of L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) while decreasing L-DOPA-induced dyskinesia (Gomez-Mancilla and Bedard, 1993). Furthermore, we have recently shown that systemic administration of α 1- and α 2-AR agents was able to modulate locomotor activity in the rat and that behavioral changes were paralleled by changes in the neuronal activity of subthalamic nucleus (STN) (Belujon et al., 2007). This nucleus has been shown to play a key role in the pathophysiology of PD. This was demonstrated by the fact that, in rodent and primate models of PD, STN neurons are more bursty than in normal animals (Bergman et al., 1994; Hassani et al., 1996; Ni et al., 2001) and by the ability of STN ablation (Bergman et al., 1990; Guridi and Obeso, 2001) and high frequency stimulation (Benabid *et al.*, 2000; Benazzouz *et al.*, 1993) to alleviate PD motor symptoms. Furthermore, anatomical studies revealed that the STN receives NA afferents from the LC (Boyajian *et al.*,

1987; Canteras *et al.*, 1990; Parent and Hazrati, 1995; Wang *et al.*, 1996) and that this innervation is relatively sparse (Cragg *et al.*, 2004; Swanson and Hartman, 1975). Although previous *in vitro* electrophysiological studies on slices (Arcos *et al.*, 2003; Belujon *et al.*, 2007) have shown that STN neurons have functional α 1- and α 2-ARs, the impact of these receptors on STN neuronal activity and the motor behaviour remains unknown. Thus, the present study aimed to investigate the effects of local injection of selective agonists and antagonists of α 1- and α 2-ARs upon (i) the firing rate and patterns of extracellularly recorded STN neurons and (ii) on the locomotor activity. These electrophysiological and behavioral studies were carried out in sham and 6-OHDA-lesioned rats.

Materials and Methods

Animals. Adult male Sprague Dawley rats, weighing 280–380 g, were used for behavioral studies and *in vivo* electrophysiological experiments. Animals were provided by the “Centre d’Elevage Dépré” (Saint Doulchard, France) and arrived at least 1 week before use. They were housed four per cage under artificial conditions of light (light/dark cycle; lights on at 7:00 A.M.), temperature (24°C), and humidity (45%) with food and water available *ad libitum*. All animal experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

Guide cannula implantation. Two weeks after 6-OHDA injection, rats were placed in a stereotaxic frame (Kopf, Unimecanique, France) under xylazine/ketamine anesthesia (ketamine hydrochloride (75 mg/kg, i.p.) and xylazine hydrochloride (10 mg/kg, i.p), Sigma). Each animal was implanted with a guide cannula with the tip 1mm above the STN at coordinates 3.8 mm posterior to bregma, 2.5mm lateral to the midline, and 7mm below the skull according to the brain atlas of Paxinos and Watson (1996). The guide cannula was

attached to the skull with stainless steel screws and dental cement. An obturator inside the guide cannula was then placed to prevent obstruction. Rats were placed in the animal facilities for one week to recover.

Drugs. Drugs were chosen on the basis of their different affinity for their preferential receptors. Phenylephrine was chosen as α 1-AR agonist and benoxathian as α 1-AR antagonist. In a similar manner, Clonidine and idazoxan, α 2-AR agonist and antagonist respectively, were selected. All drugs were purchased from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France). A dose of 20 μ g/ μ l was used for all the drugs except for benoxathian (10 μ g/ μ l). These doses were chosen on the basis of a detailed literature search, showing a significant behavioral effect in the rat (Crestani et al., 2008). The drugs were dissolved in 0.9% sterile saline and infused slowly via a digital microsyringe (Hamilton Company, Nevada, USA). The drugs were locally injected into the STN at a volume of 200 nl for behavioral tests and 20 nl for electrophysiological recordings. 200 nl was selected after a series of control tests in which this volume showed a diffusion of the solution into the whole STN without a spread outside the nucleus. For electrophysiological recordings, the volume of 20 nl is sufficient to reach the recorded cell, as the tip of the injection cannula is 200 μ m above the tip of the recording microelectrode. This small volume was also used to avoid the risk of losing the recorded cell due to pressure effects. In 6-OHDA-lesioned animals, as the toxin was injected unilaterally, NAergic agents were also injected unilaterally in the same 6-OHDA-lesioned hemisphere.

6-OHDA injection. As described previously (Tai et al., 2003), 30 min before surgery, animals were injected intraperitoneally with desipramine (25mg/kg; Sigma) dissolved in 0.9% sodium chloride and injected at a volume of 5 ml/kg body weight. Rats were placed in a stereotaxic frame (Kopf, Unimecanique, France) under xylazine/ketamine anesthesia (ketamine hydrochloride (75 mg/kg, i.p.) and xylazine hydrochloride (10 mg/kg, i.p.), Sigma). Each

animal received a unilateral injection of 2.5 μ l of 6-OHDA (5 mg/ml in sterile NaCl, 0.9%; Sigma) with 0.01% ascorbic acid into the right medial forebrain bundle at coordinates 2.8 mm posterior to bregma, 2mm lateral to the midline, and 8.4mm below the skull according to the brain atlas of Paxinos and Watson (1996). The 6-OHDA injection was made over a 5 min period of time and then, the syringe needle was withdrawn slowly to prevent reflux of the solution.

Open-field locomotor activity. Spontaneous locomotor activity was measured using a photoelectric actimeter (Actitrack; Panlab, Barcelona, Spain), as previously described (Dulawa et al., 1999), 3 weeks after the surgery. The apparatus consisted of a transparent cage that was connected to a photoelectric cell. Light beams detected movement, and the total number of horizontal movements of each rat was recorded over two successive sessions of 10 min each day. All testing in the actimeter was done in an isolated room between 8:00 A.M. and 1:00 P.M. and consisted of three phases for each group of rats. In phase A, spontaneous locomotor activity was recorded during three consecutive days, immediately after local injection of NaCl 0.9% each day. Between-session habituation was analyzed by comparing behavior in the actimeter on day 2 versus that on day 3. The first session of 10 min was considered as the daily habituation. Only the locomotor activity recorded during the second session of 10 min was used for data analysis. In phase B, for drug injection, as for saline injection, the needle used for microinjection was 1 mm longer than the guide cannula and was connected to a 10-ml Hamilton digital syringe (Hamilton Company, Nevada, USA) through tubing. The needle was carefully inserted into the guide cannula and drugs were injected slowly over 2 minutes. The needle was removed after a 60 sec period. The rat was then immediately placed into the actimeter, and locomotor activity was recorded during two sessions of 10 min. In phase C, 1 day after noradrenergic agent injection, a post-challenge test was done and rats were re-exposed to the actimeter immediately after STN injection of 0.9%

NaCl (day 5). If the values of the actimeter returned to the basal level, animals received local injection of another drug the day after. Behavioral tests were performed in two groups of animals and rats of each group received the injection of two drugs. One group received the agonist and antagonist of α 1-AR and the other one received the agonist and antagonist of α 2-AR.

Extracellular recordings. Extracellular single-unit recordings were made in rats anesthetized with urethane (1.2 g/kg, i.p.). Recordings were done in sham and 6-OHDA-lesioned rats 3 weeks after surgery as previously reported (Tai et al., 2003). Double or triple glass micropipettes, with one for recording (impedance, 8–12 M Ω) and one or two for drug injection were used. The tips between recording and injection micropipettes were separated by 160 to 220 nm. The injection pipette was filled with a NAergic drug and the recording pipette was filled with 4% Pontamine sky blue in 0.09% NaCl. The micropipettes were placed into the STN according to the coordinates given in the brain atlas of Paxinos and Watson (1996) (anteroposterior, 3.8 mm posterior to bregma; lateral, 2.5 mm from the midline; dorsal, 6.8–8.2 mm from the dura). Extracellular neuronal activity was amplified, bandpass-filtered (300–3000 Hz) (Neurolog system; Digitimer, Hertfordshire, UK), displayed on an oscilloscope and transferred via a Powerlab interface (AD Instruments, Oxfordshire, UK) to a computer equipped with Chart 5 software (AD Instruments, USA). Only neuronal activity with a signal-to-noise ratio of 3:1 was recorded and used for additional investigation. Basal firing of STN neurons was recorded for 20 min before drug injection to ascertain the stability of the discharge activity, then a noradrenergic agent or the saline vehicle was injected directly into the STN at a volume of 20 nl, using brief pulses (200 ms) of pneumatic pressure (Picospritzer III, Royston Herts, U.K.). In 6-OHDA rats, STN neuronal activity was recorded in the 6-OHDA-lesioned hemisphere. In all tested rats, the central part of the nucleus was targeted. 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 μ A for 8 min. STN neuron activity was analyzed with a spike discriminator using a spike histogram program (AD Instruments, Oxfordshire, UK), and firing parameters were determined using the Neuroexplorer program (AlphaOmega, Nazareth, Israel).

Validation of the recording and implantation sites. After completion of the 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 and acetylcholine esterase staining was used as previously described (Chetrit et al., 2009) to visualize the guide cannula track and to determine the location of the Pontamine sky blue dots marking the recording site in the recorded structure. Only brains in which both the recording and drug injection were shown to be in the STN were used for data analysis.

Validation of DA lesion. Dopamine cell degeneration was determined by immunohistochemistry of tyrosine hydroxylase as previously described (Ni et al., 2001). Sections of the SNc and striatum were stained and only rats with almost total loss of TH immunoreactivity were used to analyze electrophysiological recordings and behavioral experiments (data not shown).

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). For behavioral data, values were compared using a Friedman test followed, when significant, by Dunn's multiple post tests. For electrophysiological data, normalized firing rates, before and after drug injection, were compared with Kruskal-Wallis by Dunn's multiple post tests. Firing patterns were analyzed using the method developed by Kaneoke and Vitek (1996) as previously described (Boraud et al., 1998; Tai et al., 2003) to determine if STN neurons discharged with regular, irregular or bursty pattern and the proportions of neurons

according to their pattern were compared using a χ^2 test. In addition, the coefficient of variation of the interspike intervals was analyzed to determine the changes in the firing pattern during time after drug injections using a Kruskal-Wallis by Dunn's multiple post tests. The effects of clonidine alone or blocked by the previous injection of idazoxan were compared by a Mann-Whitney test.

Results

Effects of STN α_1 - and α_2 -AR modulation on locomotor activity of sham and 6-OHDA rats

Spontaneous locomotor activity was measured using an "open field" actimeter as previously reported (Belujon et al., 2007). Preliminary studies showed that after 3 days of habituation, the behavior of the animals was stable (student t test, $p > 0.05$, ns), indicating that the rats were accustomed to their test environment (data not shown).

The effects of local injection of α_1 -AR agents into the STN on locomotor activity of sham rats and 6-OHDA rats are shown in figure 1. Administration of phenylephrine (α_1 -AR agonist) and benoxathian (α_1 -AR antagonist) did not modify locomotor activity in sham [$p > 0.05$, ns, Dunn's test after a significant Friedman test, $F = -42.92$, $p < 0.001$, $n = 8$, Fig. 1A] or in 6-OHDA rats [$p > 0.05$, ns, Dunn's test after a significant Friedman test, $F = -71.92$, $p < 0.001$, $n = 10$, Fig. 1B]. However, injection of clonidine (α_2 -AR agonist) into the STN significantly decreased locomotor activity compared with saline injection into the STN of sham [$p < 0.01$, Dunn's test after a significant Friedman test, $F = -19.24$, $p < 0.001$, $n = 16$, Fig. 1C] and 6-OHDA rats [$p < 0.01$, Dunn's test after a significant Friedman test, $F = -18.91$, $p < 0.001$, $n = 10$, Fig. 1D]. Idazoxan (α_2 -AR antagonist) did not induce any effect on locomotor activity in sham [$p > 0.05$, Dunn's test after a significant Friedman test, $F = -19.24$, $p < 0.001$, $n = 16$, Fig.

1C] or in 6-OHDA rats [$p > 0.05$, Dunn's test after a significant Friedman test, $F = -18.91$, $p < 0.001$, $n = 10$, Fig. 1D].

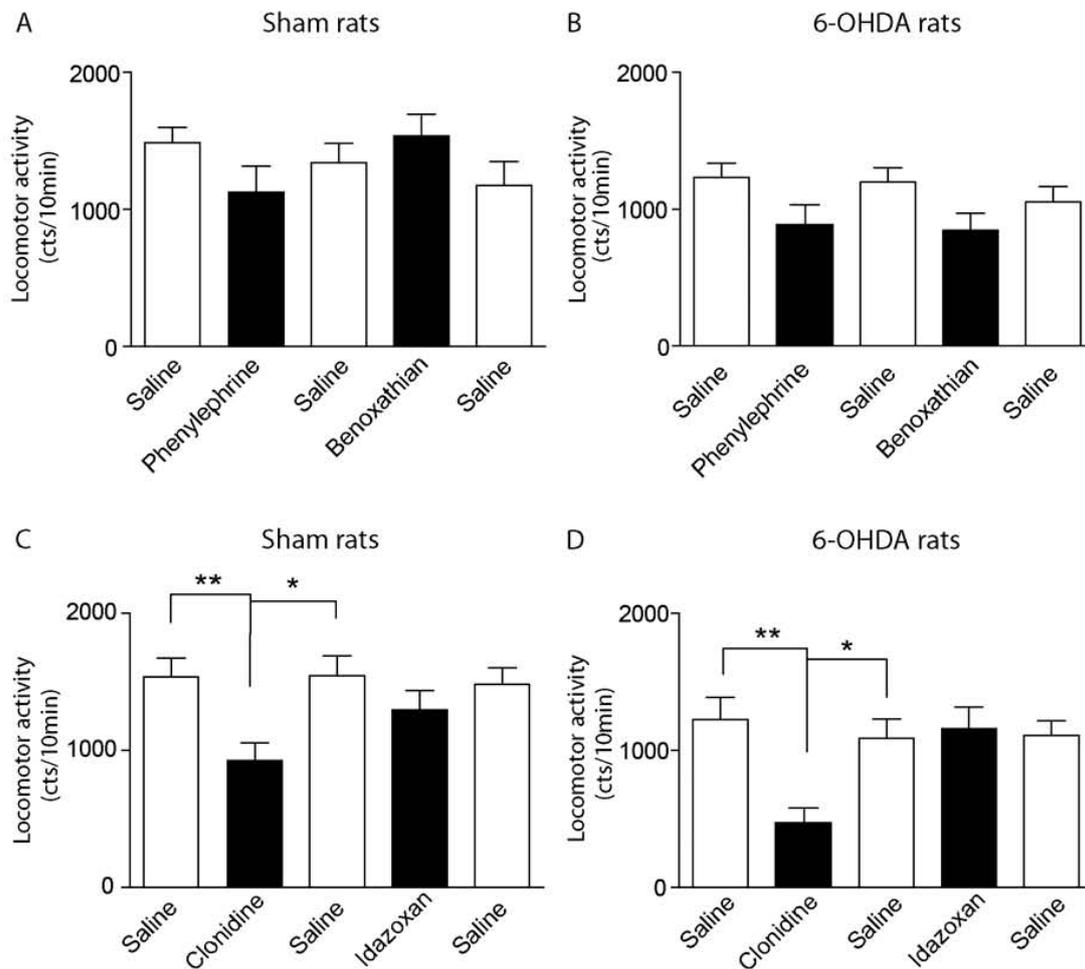


Figure 1. Effects of STN injection of α_1 - and α_2 -AR agonists and antagonists on locomotor activity of sham and 6-OHDA rats. Histograms represent the number of horizontal movements recorded during 10 minutes. (A-B) Neither phenylephrine (α_1 -AR agonist) nor benoxathian (α_1 -AR antagonist) changed the number of spontaneous movements in both sham ($n = 8$, A) and 6-OHDA ($n = 10$, B) rats. (C-D) Clonidine (α_2 -AR agonist) significantly decreased the number of movements in both sham (C) and 6-OHDA rats (D), however, idazoxan (α_2 -AR antagonist) did not change this parameter in either groups of rats ($n = 16$ sham rats; $n = 10$ 6-OHDA rats). Values are the mean \pm SEM. Statistical analysis using

Friedman test followed, when significant, by Dunn's multiple post tests was performed. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Effects of STN $\alpha 1$ - and $\alpha 2$ -AR modulation on the firing activity of STN neurons in sham and 6-OHDA rats

The table 1 summarizes the firing rates and coefficient of variations of the interspike interval of STN neurons before and after drug injections.

A. Firing rates (spikes/sec)

| | Sham | | 6-OHDA | |
|---------------|------------|------------|------------|--------------|
| | Before | After | Before | After |
| Phenylephrine | 13,6±1,73 | 24±3,5*** | 12,6±2,1 | 16,8±2,56*** |
| Benoxathian | 10,4±1,5 | 11,9±2,7 | 11,1±2,95 | 12,5±3,9 |
| Clonidine | 12,3±2,04 | 10,87±1,75 | 9,9±1,02 | 9,52±1,29 |
| Idazoxan | 10,95±2,97 | 9,98±2,82 | 10,79±2,07 | 11,54±1,36 |

B. Coefficient of variations of the ISI

| | Sham | | 6-OHDA | |
|---------------|-----------|------------|-----------|--------------|
| | Before | After | Before | After |
| Phenylephrine | 0,59±0,08 | 0,56±0,06 | 1,28±0,24 | 1,25±0,24 |
| Benoxathian | 0,68±0,17 | 0,68±0,2 | 0,83±0,19 | 0,68±0,16 |
| Clonidine | 0,65±0,09 | 1,55±0,5** | 0,92±0,15 | 1,38±0,25*** |
| Idazoxan | 0,67±0,11 | 0,75±0,13 | 0,93±0,28 | 0,93±0,27 |

Table 1: Changes in firing rates (A) and coefficient of variations of the interspike intervals (ISI) (B) induced by the local injection of noradrenergic agents into the STN of sham and 6-OHDA-lesioned rats. The values are mean± s.e.m. Statistical analysis using Kruskal-Wallis test followed, when significant, by Dunn's multiple comparison test was performed. **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, in comparison with basal activity.

Injection of the $\alpha 1$ -AR agonist, phenylephrine, into the STN induced a dramatic increase in the firing rate of STN neurons in sham [$p < 0.001$, Dunn's test after a significant Kruskal-

Wallis test, $F=62.52$, $p<0.0001$, $n=27$, Fig. 2A,B] as well as in 6-OHDA rats [$p<0.001$, Dunn's test after a significant Kruskal-wallis test, $F=32.52$, $p<0.0001$, $n=11$, Fig. 2E,F]. This effect occurred 10 minutes after the injection and lasted 30 minutes. In contrast, no change was observed after the $\alpha 1$ -AR antagonist, benoxathian was injected in sham [Kruskal-wallis test, $F=5.23$, $p>0.05$, ns, $n=6$, Fig. 2A,B] or in 6-OHDA rats [Kruskal-wallis test, $F=9.376$, $p>0.05$, ns, $n=9$, Fig. 2E,F].

As regards the firing pattern, neither phenylephrine nor benoxathian induced a change in sham or 6-OHDA rats (Fig. 2C,D and Fig. 2G,H respectively). Indeed, the coefficient of variance of the interspike interval of STN neurons was not modified after phenylephrine injection into the STN of sham [$p>0.05$, Dunn's test after a significant Kruskal-wallis test, $F=11.11$, $p<0.05$, $n=27$, Fig. 2C] or 6-OHDA rats [Kruskal-wallis test, $F=6.893$, $p>0.05$, $n=11$, Fig. 2G]. Similarly, benoxathian did not modify the coefficient of variation in either groups [sham rats: Kruskal-wallis test, $F=1.552$, $p>0.05$, ns, $n=6$, Fig. 2C; 6-OHDA rats: Kruskal-wallis test, $F=8.761$, $p>0.05$, ns, $n=9$, Fig. 2G].

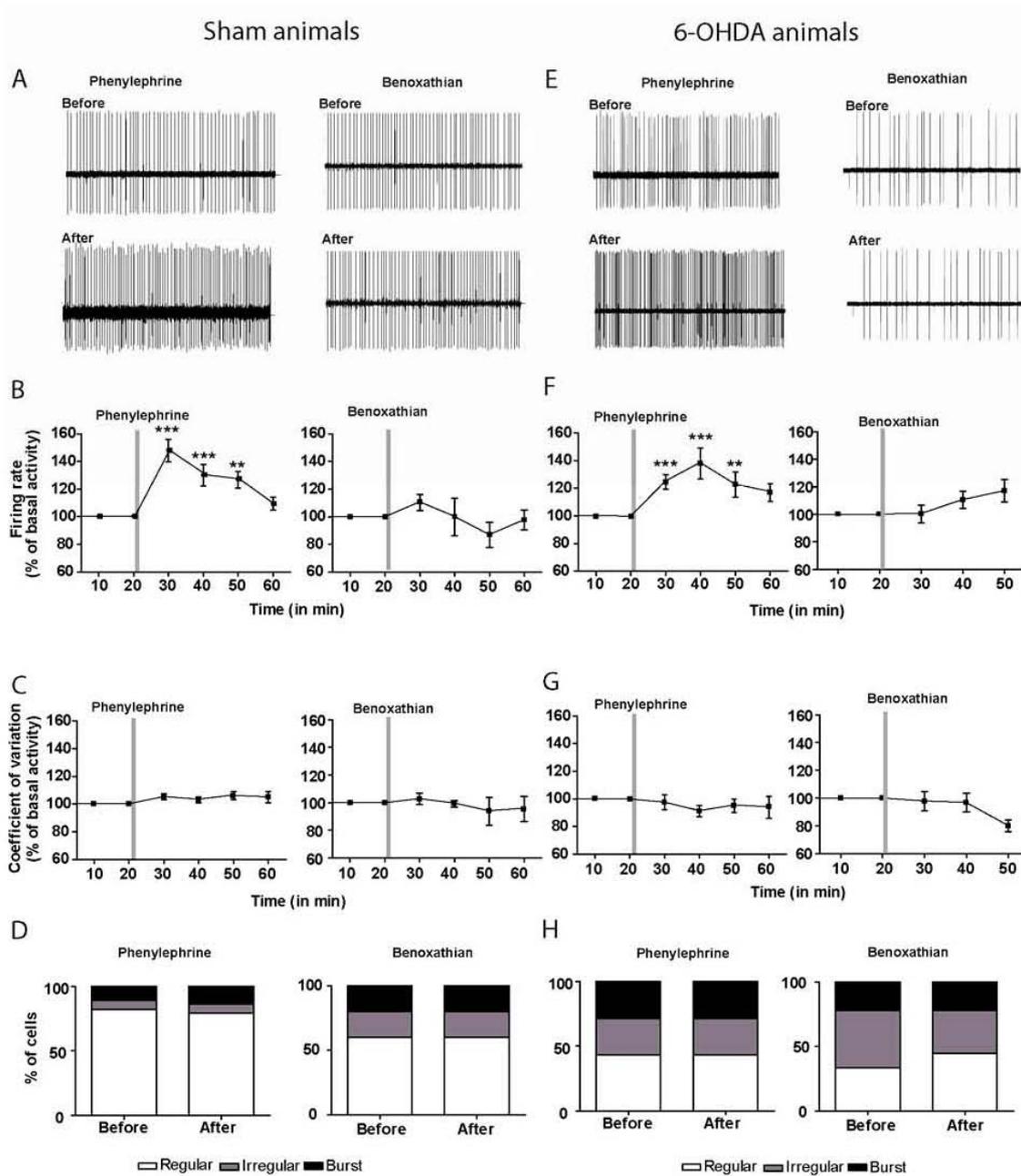


Figure 2. Effects of STN injection of α 1-AR agonists and antagonists on the firing activity of STN neurons in sham and 6-OHDA rats. A-D: Effects of α 1-AR agents in sham rats. E-H: Effects of α 1-AR agents in 6-OHDA rats. A and E: Section of recordings with representative examples of STN neuronal activity before and after the injection of α 1-AR drugs. B and F: Phenylephrine (α 1-AR agonist) significantly increased the firing rate of STN neurons in sham (n=27 cells) and 6-OHDA (n=11 cells) rats, however, benoxathian (α 2-AR

antagonist) did not change the firing rate of STN neurons in either group (n=6 cells in sham rats; n=9 in 6-OHDA rats). Values are the percentage of basal activity \pm SEM. C and G: Phenylephrine, like benoxathian, did not induce any significant changes in the coefficient of variation. Values are the percentage of basal activity \pm SEM. D and H: Firing pattern histograms showing the absence of changes in the proportion of STN neurons discharging regularly, irregularly or with bursts after the injection of α 1-AR drugs in the two groups. Statistical analysis using Kruskal-Wallis test followed, when significant, by Dunn's multiple comparison test was performed for the firing rate and the coefficient of variation. Time scale: 5 sec duration of each trace.

Regarding the α 2-AR, STN injection of clonidine did not induce a significant change in the firing rate of STN neurons in sham [$p > 0.05$, ns, Dunn's test after a significant Kruskal-wallis test, $F = 12.75$, $p < 0.05$, $n = 16$, Fig. 3A,B] or in 6-OHDA rats [Kruskal-wallis test, $F = 1.161$, $p > 0.05$, ns, $n = 11$, Fig. 3E,F]. As was found for the α 1-AR, no change in the firing rate was observed after the α 2-AR antagonist injection, idazoxan, in sham [Kruskal-wallis test, $F = 8.419$, $p > 0.05$, ns, $n = 7$, Fig. 3A,B] or in 6-OHDA Kruskal-wallis test, $F = 5.276$, $p > 0.05$, ns, $n = 7$, Fig. 3E,F]

Although idazoxan did not induce any change in the firing pattern of STN neurons in sham [Kruskal-wallis test, $F = 4.997$, $p > 0.05$, ns, $n = 7$, Fig. 3C,D] or in 6-OHDA rats (Kruskal-wallis test, $F = 7.397$ $p > 0.05$, ns, $n = 7$, Fig. 3G,H)), clonidine significantly increased the percentage of neurons discharging with burst in sham (Fig. 3D) as well as in 6-OHDA rats (Fig. 3H). Indeed, the coefficient of variation of interspike interval of STN neurons significantly increased after clonidine injection into the STN of sham [$p < 0.01$, Dunn's test after a significant Kruskal-wallis test, $F = 29.75$, $p < 0.0001$, $n = 16$, Fig. 3C] and of 6-OHDA rats [$p < 0.001$, Dunn's test after a significant Kruskal-wallis test, $F = 34.94$, $p < 0.0001$, $n = 11$, Fig. 3G]. This effect occurred 10 minutes after the injection and no recovery to the basal level was observed before 40 min after the injection.

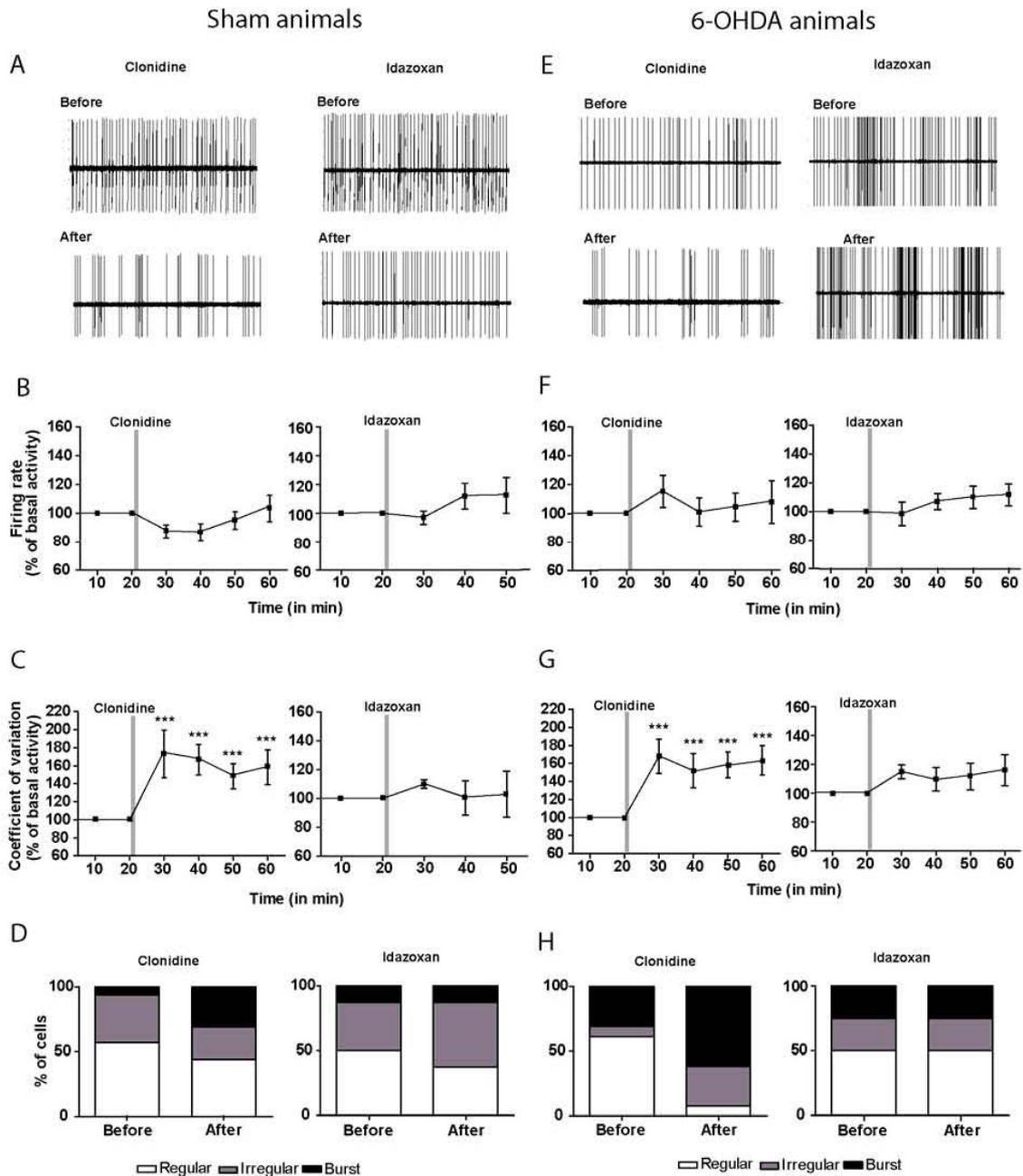


Figure 3. Effects of STN injection of α_2 -AR agonists and antagonists on the firing activity of STN neurons in sham and 6-OHDA rats. A-D: Effects of α_2 -AR agents in sham rats. E-H: Effects of α_2 -AR agents in 6-OHDA rats. A and E: Section of recordings with representative examples of STN neuronal activity before and after the injection of α_2 -AR drugs. B and F: Neither clonidine (α_2 -AR agonist) nor idazoxan (α_2 -AR antagonist) changed the firing rate of STN neurons in sham ($n=16$ and $n=7$ cells respectively) and 6-OHDA ($n=11$

and $n=7$ cells respectively) rats. Values are the percentage of basal activity \pm SEM. C and G: Clonidine induced a significant increase in the coefficient of variation of interspike intervals, however, idazoxan did not induce any change in this coefficient. Values are the percentage of basal activity \pm SEM. D and H: Firing pattern histograms showing that clonidine induced a significant increase in the proportion of bursty neurons in both sham and 6-OHDA rats, however, idazoxan did not change these proportions. Statistical analysis using Kruskal-Wallis test followed, when significant, by Dunn's multiple comparison test was performed for the firing rate and the coefficient of variation. Time scale: 5sec duration of each trace.

The selectivity of clonidine on α_2 -ARs was tested by injecting idazoxan five minutes before its injection. In this situation, the increased coefficient of variation induced by clonidine alone was prevented by the prior injection of idazoxan (Mann-whitney test, $U=0.000$, $p<0.05$, Fig. 4). Saline injection into the STN did not change either the firing rate or the firing pattern of STN neurons (Kruskal-wallis test, $F=2.02$, $p>0.05$, $n=5$ for the firing rate; $F=2.97$, $p>0.05$, $n=5$ for the coefficient of variation of interspike interval).

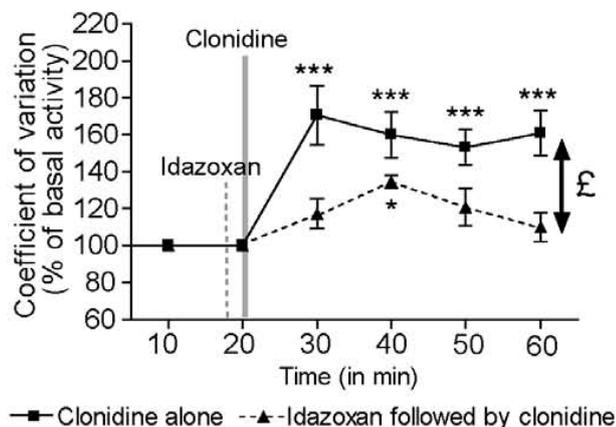


Figure 4. Verification of the selective effect of clonidine on α_2 -ARs. When the injection of clonidine is preceded by the injection of idazoxan it did not induce a significant change in the coefficient of variation of the interspike intervals of STN neurons. Values are the percentage of basal activity \pm SEM. Statistical analysis using Kruskal-Wallis test followed, when significant, by Dunn's multiple comparison test was performed. ***: $p<0.001$, for clonidine

injection alone in comparison with basal activity. £: $p < 0.05$ for clonidine injection alone in comparison with clonidine injection after idazoxan. $n=27$ neurons for clonidine injection alone and $n=5$ neurons for idazoxan injection followed by clonidine.

Discussion

The present study provides the first *in vivo* evidence that activation of $\alpha 2$ -ARs, located in the STN increased the ability of STN neurons to discharge in bursts without affecting the firing rate and subsequently decreased locomotor activity in both sham and 6-OHDA rats. However, activation of STN $\alpha 1$ -ARs, which increased the firing rate of STN neurons without affecting the firing pattern, did not affect locomotor activity in the two groups of animals. This is the first direct evidence supporting the possibility that noradrenaline acting on $\alpha 2$ -AR contributes to the emergence of burst firing pattern of STN neurons, which is a pathological signature related to parkinsonian motor disabilities.

Implication of the STN in motor control

Many studies have identified the STN as a basal ganglia nucleus playing a key role in motor control and consequently in the pathophysiology of PD. Indeed, after DA and NA depletion, STN neurons, which normally exhibit a tonic discharge pattern, become bursty in animal models of PD (Bergman et al., 1994; Ni et al., 2001). This pathological bursty pattern has also been reported in PD patients (Benazzouz *et al.*, 2002; Delaville *et al.*; Hutchison *et al.*, 1998). Moreover, the motor symptoms of PD are improved by either STN ablation ((Bergman et al., 1990; Guridi and Obeso, 2001) or high frequency stimulation (Benabid *et al.*, 2000; Benazzouz *et al.*, 1993). The STN is a small but complex structure receiving afferent projections from different brain areas. STN neuronal activity is under the control of GABAergic afferents from the globus pallidus (Parent and Hazrati, 1995), glutamatergic afferents from the cortex (Kitai and Deniau, 1981; Parent and Hazrati, 1995), dopaminergic

afferents from the SNc (Baufreton *et al.*, 2003; Cragg *et al.*, 2004; Hassani and Feger, 1999; Ni *et al.*, 2001) and serotonergic afferents from the dorsal raphe nucleus (Stanford *et al.*, 2005; Xiang *et al.*, 2005). In addition to these afferents, the STN receives also noradrenergic fibers arising from locus coeruleus (Canteras *et al.*, 1990; Carpenter *et al.*, 1981; Parent and Hazrati, 1995). However, NA modulation of STN neuronal activity is not documented (Arcos *et al.*, 2003; Belujon *et al.*, 2007).

STN α 2-ARs but not α 1-ARs are involved in the control of locomotor activity

Our results show that α 1-ARs located in the STN are not implicated in the control of locomotor activity. Indeed, neither activation nor blockade of these receptors had a clear effect upon the locomotor activity parameters in both sham and lesioned rats. Interestingly, we show that α 2-ARs are implicated in the motor control as their activation by the agonist clonidine decreased the spontaneous locomotor activity of both sham and lesioned rats, i.e. displaying a parkinsonian-like hypokinesia. This hypo-locomotor activity is not due to a cataleptic state as the parameters of the bar test were not modified after the injection of clonidine into the STN. However, blockade of α 2-ARs by the antagonist idazoxan did not show any change in the spontaneous locomotor activity parameters. These results suggest that the changes in locomotor activity induced by systemic injection of α 1- and α 2-AR agonists/antagonists reported in previous studies (Antonelli *et al.*, 1991; Belujon *et al.*, 2007; Mathe *et al.*, 1996; Wellman and Davies, 1992) are not due to their direct effect on STN neurons, but to an indirect network effect.

Activation of α 1-ARs located in the STN induced changes in STN firing rate whereas activation of α 2-ARs induced changes in STN firing pattern

Effects of STN α 1-AR modulation

We show that α 1-ARs located in the STN are implicated in the modulation of the STN neuronal firing rate. Indeed, their activation by the agonist increased the firing rate without changing the firing pattern of STN neurons in both sham and lesioned rats. Moreover, the firing rate increase was not paralleled with a change in locomotor activity. These results provide direct evidence that the increase in the firing rate of STN neurons is not related to the induction of motor hypokinesia. These “excitatory” α 1-ARs, which are coupled to a Gq protein (McCormick et al., 1991; McCormick and Wang, 1991), are located on the postsynaptic membrane in different brain nuclei (Lakhlani et al., 1996; Langer, 1974; Starke, 1972) including the STN (Belujon et al., 2007). Our electrophysiological results fit with previous *in vitro* studies showing the same excitatory effect in STN slices (Arcos et al., 2003) even after blocking afferent synaptic transmission (Arcos et al., 2003). Moreover, the observed effect is not mediated by DA transmission as we show that DA depletion did not influence the responses of STN neurons induced by α 1-AR drugs.

Effects of STN α 2-AR modulation

In contrast to α 1-ARs, activation of α 2-ARs, which decreased locomotor activity, dramatically increased the capacity of STN neurons to discharge in bursts without changing the firing rate. This represents direct evidence that the bursty pattern, not the increase in the firing rate, of STN neurons is the most relevant pathological activity related to the manifestation of hypokinesia. These results are in agreement with our previous *in vitro* study in which an α 2-AR agonist was tested on evoked plateau potentials of STN neurons. We have shown that α 2-AR activation increased all indices of burst competency (Belujon et al., 2007). The bursty pattern induced by the activation of α 2-ARs is due to a presynaptic effect as these “inhibitory” receptors, coupled to Gi proteins, are located on afferent nerve terminals in

different brain nuclei (Benarroch, 2009; Lakhani *et al.*, 1996; Langer, 1974; Starke, 1972) including the STN (Belujon *et al.*, 2007). The presynaptic effect of the α_2 -AR agonist is in agreement with the results of Arcos *et al.* (2003), who studied the effects of α_2 -AR activation *in vitro* in STN slices. After blockade of synaptic transmission, these authors showed that α_2 -AR activation did not induce any change in STN neuronal activity. Furthermore, it is unlikely that the effect induced by clonidine may be due to its action on receptors other than α_2 -ARs, as the α_2 -AR antagonist treatment, idazoxan prevented the firing pattern changes induced by clonidine. In contrast to the results obtained *in vitro* showing that idazoxan reduced all indices of burst competency (Belujon *et al.*, 2007), we show that, even if this α_2 -AR antagonist prevented the effect of the agonist, it did not change the firing activity of STN neurons when injected alone. This discrepancy could be explained by the fact that *in vitro* idazoxan was tested on evoked plateau potentials, not on the spontaneous activity of STN neurons as in the present study.

Functional relevance of STN α_2 -ARs

Although it is known that α_2 -ARs are located presynaptically on afferents to STN, it is not clear on which class of neurons they are located. The three main classes of afferents arise from cortex/thalamus, GPe and SNc. As we show that the activation of α_2 -ARs induced the same effect in sham and 6-OHDA rats, it is unlikely that these receptors are located on dopaminergic terminals arising from the SNc. These results fit with a previous study showing that atipamezole, an α_2 -AR antagonist, had no effect on dopamine overflow (Yavich *et al.*, 2003). The absence of changes in the firing rate after clonidine injection might suggest a simultaneous activation of α_2 ARs located on glutamatergic and GABAergic afferents, which could suppress transmitter release in both glutamatergic and GABAergic synapses. Although it has been demonstrated that α_2 -AR activation by clonidine inhibits the release of glutamate

in several brain regions (Kamisaki *et al.*, 1993; Kamisaki *et al.*, 1992), several studies have shown that clonidine was able to potentiate the effects of GABA, including in the red nucleus (Ciranna *et al.*, 2000) and the vestibular nucleus (Di Mauro *et al.*, 2008). Indeed, recent evidence suggests that emergent pathological bursty activity in the STN is probably due to an imbalance between glutamatergic and GABAergic transmission in the STN (Bevan *et al.*, 2006).

In conclusion, this study adds noradrenaline to the list of neuroactive substances able to modulate the firing activity of STN neurons. Indeed, our data provide evidence that $\alpha 2$ -ARs located in the STN play a key role in the modulation of STN firing pattern and that their activation is implicated in the genesis of STN bursty activity, which may be at the origin of parkinsonian motor deficits.

References

- Antonelli, T., M. Morari, A. Magri and C. Bianchi (1991). "Effect of alpha-adrenoreceptors in the control of spontaneous motility and morphine withdrawal syndrome." Boll Soc Ital Biol Sper **67**(10-11): 965-71.
- Arcos, D., A. Sierra, A. Nunez, G. Flores, J. Aceves and J. A. Arias-Montano (2003). "Noradrenaline increases the firing rate of a subpopulation of rat subthalamic neurones through the activation of alpha 1-adrenoceptors." Neuropharmacology **45**(8): 1070-9.
- Baufreton, J., M. Garret, A. Rivera, A. de la Calle, F. Gonon, B. Dufy, B. Bioulac and A. Taupignon (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**(3): 816-25.
- Belujon, P., E. Bezard, A. Taupignon, B. Bioulac and A. Benazzouz (2007). "Noradrenergic modulation of subthalamic nucleus activity: behavioral and electrophysiological evidence in intact and 6-hydroxydopamine-lesioned rats." J Neurosci **27**(36): 9595-606.
- Benabid, A. L., P. P. Krack, A. Benazzouz, P. Limousin, A. Koudsie and P. Pollak (2000). "Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus for Parkinson's disease: methodologic aspects and clinical criteria." Neurology **55**(12 Suppl 6): S40-4.
- Benarroch, E. E. (2009). "The locus ceruleus norepinephrine system: functional organization and potential clinical significance." Neurology **73**(20): 1699-704.
- Benazzouz, A., S. Breit, A. Koudsie, P. Pollak, P. Krack and A. L. Benabid (2002). "Intraoperative microrecordings of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease." Mov Disord **17 Suppl 3**: S145-9.

- Benazzouz, A., C. Gross, J. Feger, T. Boraud and B. Bioulac (1993). "Reversal of rigidity and improvement in motor performance by subthalamic high-frequency stimulation in MPTP-treated monkeys." Eur J Neurosci **5**(4): 382-9.
- Bergman, H., T. Wichmann and M. R. DeLong (1990). "Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus." Science **249**(4975): 1436-8.
- Bergman, H., T. Wichmann, B. Karmon and M. R. DeLong (1994). "The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism." J Neurophysiol **72**(2): 507-20.
- Bertrand, E., W. Lechowicz, G. M. Szpak and J. Dymecki (1997). "Qualitative and quantitative analysis of locus coeruleus neurons in Parkinson's disease." Folia Neuropathol **35**(2): 80-6.
- Bevan, M. D., J. F. Atherton and J. Baufreton (2006). "Cellular principles underlying normal and pathological activity in the subthalamic nucleus." Curr Opin Neurobiol **16**(6): 621-8.
- Bezard, E., C. Brefel, F. Tison, H. Peyro-Saint-Paul, P. Ladure, O. Rascol and C. E. Gross (1999). "Effect of the alpha 2 adrenoreceptor antagonist, idazoxan, on motor disabilities in MPTP-treated monkey." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **23**(7): 1237-46.
- Boraud, T., E. Bezard, D. Guehl, B. Bioulac and C. Gross (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**(1): 157-60.
- Boyajian, C. L., S. E. Loughlin and F. M. Leslie (1987). "Anatomical evidence for alpha-2 adrenoceptor heterogeneity: differential autoradiographic distributions of [3H]rauwolscine and [3H]idazoxan in rat brain." J Pharmacol Exp Ther **241**(3): 1079-91.
- Canteras, N. S., S. J. Shammah-Lagnado, B. A. Silva and J. A. Ricardo (1990). "Afferent connections of the subthalamic nucleus: a combined retrograde and anterograde horseradish peroxidase study in the rat." Brain Res **513**(1): 43-59.
- Carpenter, M. B., S. C. Carleton, J. T. Keller and P. Conte (1981). "Connections of the subthalamic nucleus in the monkey." Brain Res **224**(1): 1-29.
- Chetrit, J., B. Ballion, S. Laquitaine, P. Belujon, S. Morin, A. Taupignon, B. Bioulac, C. E. Gross and A. Benazzouz (2009). "Involvement of Basal Ganglia network in motor disabilities induced by typical antipsychotics." PLoS One **4**(7): e6208.
- Chopin, P., F. C. Colpaert and M. Marien (1999). "Effects of alpha-2 adrenoceptor agonists and antagonists on circling behavior in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal pathway." J Pharmacol Exp Ther **288**(2): 798-804.
- Ciranna, L., F. Licata, G. Li Volsi and F. Santangelo (2000). "Neurotransmitter-mediated control of neuronal firing in the red nucleus of the rat: reciprocal modulation between noradrenaline and GABA." Exp Neurol **163**(1): 253-63.
- Colpaert, F. C. (1987). "Pharmacological characteristics of tremor, rigidity and hypokinesia induced by reserpine in rat." Neuropharmacology **26**(9): 1431-40.
- Cragg, S. J., J. Baufreton, Y. Xue, J. P. Bolam and M. D. Bevan (2004). "Synaptic release of dopamine in the subthalamic nucleus." Eur J Neurosci **20**(7): 1788-802.
- Cragg, S. J., J. Baufreton, Y. Xue, J. P. Bolam and M. D. Bevan (2004). "Synaptic release of dopamine in the subthalamic nucleus." Eur J Neurosci **20**(7): 1788-802.
- Crestani, C. C., F. H. Alves, L. B. Resstel and F. M. Correa (2008). "Both alpha1 and alpha2-adrenoceptors mediate the cardiovascular responses to noradrenaline microinjected into the bed nucleus of the stria terminal of rats." Br J Pharmacol **153**(3): 583-90.
- Delaville, C., P. D. Deurwaerdere and A. Benazzouz "Noradrenaline and Parkinson's disease." Front Syst Neurosci **5**: 31.

- Di Mauro, M., D. Bronzi, G. Li Volsi, F. Licata, P. Lombardo and F. Santangelo (2008). "Noradrenaline modulates neuronal responses to GABA in vestibular nuclei." Neuroscience **153**(4): 1320-31.
- Donaldson, I. M., A. Dolphin, P. Jenner, C. D. Marsden and C. Pycock (1976). "The involvement of noradrenaline in motor activity as shown by rotational behaviour after unilateral lesions of the locus coeruleus." Brain **99**(3): 427-46.
- Dulawa, S. C., D. K. Grandy, M. J. Low, M. P. Paulus and M. A. Geyer (1999). "Dopamine D4 receptor-knock-out mice exhibit reduced exploration of novel stimuli." J Neurosci **19**(21): 9550-6.
- Ehringer, H. and O. Hornykiewicz (1960). "[Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]." Klin Wochenschr **38**: 1236-9.
- Fornai, F., A. B. di Poggio, A. Pellegrini, S. Ruggieri and A. Paparelli (2007). "Noradrenaline in Parkinson's disease: from disease progression to current therapeutics." Curr Med Chem **14**(22): 2330-4.
- Gomez-Mancilla, B. and P. J. Bedard (1993). "Effect of nondopaminergic drugs on L-dopa-induced dyskinesias in MPTP-treated monkeys." Clin Neuropharmacol **16**(5): 418-27.
- Guridi, J. and J. A. Obeso (2001). "The subthalamic nucleus, hemiballismus and Parkinson's disease: reappraisal of a neurosurgical dogma." Brain **124**(Pt 1): 5-19.
- Hassani, O. K. and J. Feger (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**(2): 533-43.
- Hassani, O. K., M. Mouroux and J. Feger (1996). "Increased subthalamic neuronal activity after nigral dopaminergic lesion independent of disinhibition via the globus pallidus." Neuroscience **72**(1): 105-15.
- Hutchison, W. D., R. J. Allan, H. Opitz, R. Levy, J. O. Dostrovsky, A. E. Lang and A. M. Lozano (1998). "Neurophysiological identification of the subthalamic nucleus in surgery for Parkinson's disease." Ann Neurol **44**(4): 622-8.
- Kamisaki, Y., T. Hamada, K. Maeda, M. Ishimura and T. Itoh (1993). "Presynaptic alpha 2 adrenoceptors inhibit glutamate release from rat spinal cord synaptosomes." J Neurochem **60**(2): 522-6.
- Kamisaki, Y., T. Hamahashi, T. Hamada, K. Maeda and T. Itoh (1992). "Presynaptic inhibition by clonidine of neurotransmitter amino acid release in various brain regions." Eur J Pharmacol **217**(1): 57-63.
- Kaneoke, Y. and J. L. Vitek (1996). "Burst and oscillation as disparate neuronal properties." J Neurosci Methods **68**(2): 211-23.
- Kitai, S. T. and J. M. Deniau (1981). "Cortical inputs to the subthalamus: intracellular analysis." Brain Res **214**(2): 411-5.
- Lakhlani, P. P., D. M. Lovinger and L. E. Limbird (1996). "Genetic evidence for involvement of multiple effector systems in alpha 2A-adrenergic receptor inhibition of stimulus-secretion coupling." Mol Pharmacol **50**(1): 96-103.
- Langer, S. Z. (1974). "Presynaptic regulation of catecholamine release." Biochem Pharmacol **23**(13): 1793-800.
- Mathe, J. M., G. G. Nomikos, B. E. Hildebrand, P. Hertel and T. H. Svensson (1996). "Prazosin inhibits MK-801-induced hyperlocomotion and dopamine release in the nucleus accumbens." Eur J Pharmacol **309**(1): 1-11.
- Mavridis, M., F. C. Colpaert and M. J. Millan (1991). "Differential modulation of (+)-amphetamine-induced rotation in unilateral substantia nigra-lesioned rats by alpha 1 as compared to alpha 2 agonists and antagonists." Brain Res **562**(2): 216-24.

- McCormick, D. A., H. C. Pape and A. Williamson (1991). "Actions of norepinephrine in the cerebral cortex and thalamus: implications for function of the central noradrenergic system." Prog Brain Res **88**: 293-305.
- McCormick, D. A. and Z. Wang (1991). "Serotonin and noradrenaline excite GABAergic neurones of the guinea-pig and cat nucleus reticularis thalami." J Physiol **442**: 235-55.
- Ni, Z. G., R. Bouali-Benazzouz, D. M. Gao, A. L. Benabid and A. Benazzouz (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**(1-2): 142-7.
- Parent, A. and L. N. Hazrati (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**(1): 128-54.
- Paxinos, G. and C. Watson (1996). "The Rat Brain in Stereotatic Coordinates." Academic Press, San Diego.
- Rommelfanger, K. S. and D. Weinshenker (2007). "Norepinephrine: The redheaded stepchild of Parkinson's disease." Biochem Pharmacol **74**(2): 177-90.
- Stanford, I. M., M. A. Kantaria, H. S. Chahal, K. C. Loucif and C. L. Wilson (2005). "5-Hydroxytryptamine induced excitation and inhibition in the subthalamic nucleus: action at 5-HT(2C), 5-HT(4) and 5-HT(1A) receptors." Neuropharmacology **49**(8): 1228-34.
- Starke, K. (1972). "Influence of extracellular noradrenaline on the stimulation-evoked secretion of noradrenaline from sympathetic nerves: evidence for an α -receptor-mediated feed-back inhibition of noradrenaline release." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **275**(1): 11-23.
- Swanson, L. W. and B. K. Hartman (1975). "The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine-beta-hydroxylase as a marker." J Comp Neurol **163**(4): 467-505.
- Tai, C. H., T. Boraud, E. Bezard, B. Bioulac, C. Gross and A. Benazzouz (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**(13): 1820-30.
- Wang, R., L. B. Macmillan, R. T. Freneau, Jr., M. A. Magnuson, J. Lindner and L. E. Limbird (1996). "Expression of alpha 2-adrenergic receptor subtypes in the mouse brain: evaluation of spatial and temporal information imparted by 3 kb of 5' regulatory sequence for the alpha 2A AR-receptor gene in transgenic animals." Neuroscience **74**(1): 199-218.
- Wellman, P. J. and B. T. Davies (1992). "Effects of the alpha 1-adrenergic agonist cirazoline on locomotion and brown adipose tissue thermogenesis in the rat." Life Sci **50**(23): 1745-53.
- Xiang, Z., L. Wang and S. T. Kitai (2005). "Modulation of spontaneous firing in rat subthalamic neurons by 5-HT receptor subtypes." J Neurophysiol **93**(3): 1145-57.
- Yavich, L., J. Sirvio, A. Haapalinna, A. Ylinen and P. T. Mannisto (2003). "Atipamezole, an alpha2-adrenoceptor antagonist, augments the effects of L-DOPA on evoked dopamine release in rat striatum." Eur J Pharmacol **462**(1-3): 83-9.

III.3. Conclusions et perspectives

Cette étude nous a permis de montrer l'importance de la NA dans la modulation de l'activité des neurones du NST et de par ce fait dans la modulation du comportement locomoteur. Les figures 19 et 20 résument les résultats obtenus et propose un mécanisme fonctionnel du mode d'action des agonistes et antagonistes Alpha NAergiques au niveau du NST.

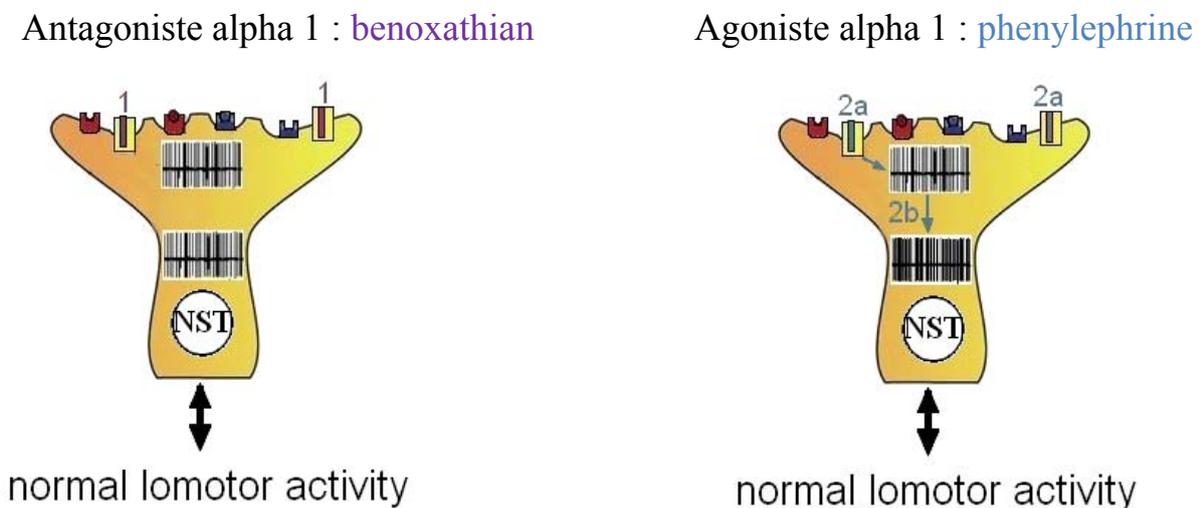


Figure 19 : Modulation des récepteurs alpha 1. Les récepteurs alpha 1 sont localisés post-synaptiquement sur les neurones glutamatergiques du NST. A l'état basal peu de NA est libérée au niveau de la fente synaptique. La fixation de l'antagoniste (1) n'induit donc aucun effet. Par contre la fixation de l'agoniste (2a) induit via l'activation de la protéine Gq l'augmentation de la fréquence de décharge des neurones du NST (2b). Cependant ceci n'induit pas de modification du comportement moteur.

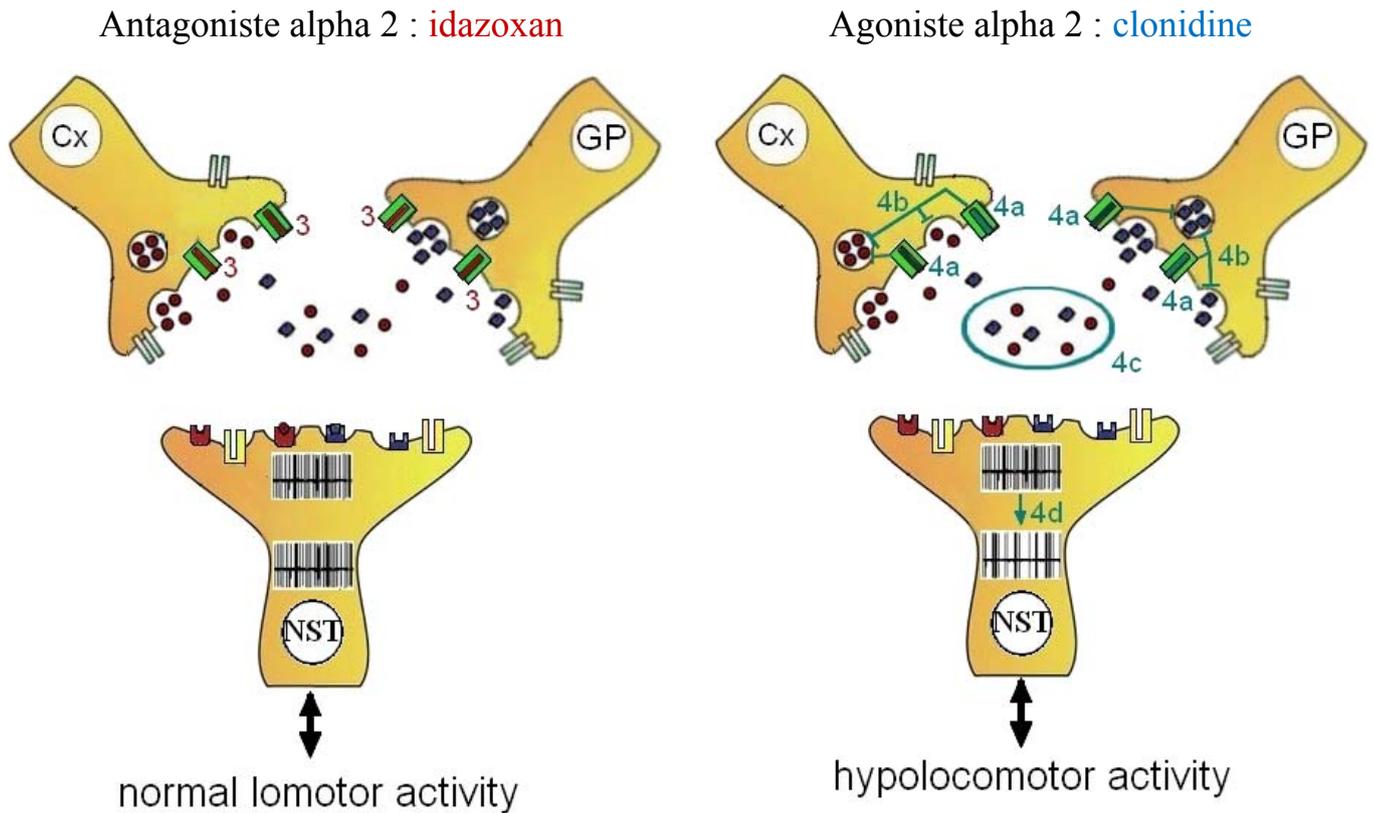


Figure 20 : Modulation des récepteurs alpha 2. Les récepteurs alpha 2 sont localisés pré-synaptiquement sur les afférences des neurones du NST tel que les fibres GABAergiques en provenance du GP et glutamatergiques du cortex (Cx). Cependant, au vu de la similarité des résultats entre les rats sham et les rats 6-OHDA, ces récepteurs ne peuvent pas être localisés sur les afférences dopaminergiques en provenance de la SNC. A l'état basal peu de NA est libérée au niveau de la fente synaptique. La fixation de l'antagoniste sur les récepteurs alpha 2 (German *et al.*, 1992) n'induit donc aucun effet. Par contre la fixation de l'agoniste (4a) induit via l'activation de la protéine Gi/o (4b) la diminution de la libération de GABA et/ou glutamate (4c). Cette différence de modulation glutamatergique et/ou GABAergique des neurones du NST va ainsi augmenter la proportion de neurones déchargeant en bouffées (4d), Ce qui a pour conséquence l'induction de déficits moteurs.

En conclusion, nos résultats montrent que l'activation des récepteurs alpha 2 induit un mode de décharge en bouffée au niveau du NST ce qui pourrait être à l'origine des déficits moteurs. Il serait donc intéressant d'étudier le devenir de l'activité neuronale des structures efférentes du NST, le GP et la SNr, suite à l'injection d'un agoniste alpha 2 au niveau du NST. Nos résultats préliminaires montrent une tendance à la diminution de la fréquence de décharge à la fois au niveau du GP (n=16) et au niveau de la SNr (n=11) sans modification du

patron de décharge. Cependant, ces expériences ont été réalisées à l'aide d'une électrode d'enregistrement unitaire dans la structure cible et d'une électrode d'injection au niveau du NST. Ceci ne nous permet pas de vérifier le changement de patron de décharge au niveau du NST suite à l'injection de l'agoniste alpha 2. De plus, tous les neurones du GP et de la SNr ne reçoivent pas de projections du NST. Ainsi, il serait intéressant de réaliser ces expériences à l'aide d'une multi-électrode, munie d'une canule d'injection, au niveau du NST permettant d'injecter et d'enregistrer simultanément et d'une multi-électrode au niveau des structures efférentes du NST afin d'augmenter la probabilité d'enregistrer des neurones recevant des projections du NST.

CONCLUSION GENERALE &
PERSECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'identification de substrats neuronaux impliqués dans les symptômes moteurs et non moteurs est importante pour le développement de nouvelles stratégies plus efficaces dans le traitement des différents symptômes de la maladie de Parkinson. Ainsi, nous avons montré que la déplétion NAergique, au même titre que la déplétion DAergique, est impliquée dans le contrôle de l'acte moteur. L'anhédonie ainsi que les comportements dits de « dépression » sont liés à la déplétion des trois monoamines et l'anxiété serait due à la déplétion DAergique. En ce qui concerne les déficits moteurs, l'absence d'effet additionnel observé après les déplétions combinées des systèmes DAergiques et NAergique suggère que ces deux systèmes interagissent ensemble pour moduler le circuit moteur. De plus nos résultats électrophysiologiques au niveau du NST sous-tendent cette interaction dans la mesure où la déplétion NAergique au même titre que la déplétion en DA induit une augmentation de la proportion des neurones déchargeant de façon irrégulière et en bouffées. L'origine de cette interaction reste cependant à déterminer. Plusieurs hypothèses s'ouvrent à nous : la NA pourrait moduler l'activité des ganglions de la base au niveau d'une structure plus en aval dans le circuit des ganglions de la base que le striatum dont l'activité neuronale est modulée majoritairement par la DA. Nous avons ainsi pu montrer dans la partie trois que la NA modulait de façon directe l'activité du NST et par conséquent modulait l'activité locomotrice des animaux. Ainsi les effets électrophysiologiques et comportementaux observés après la déplétion NAergique pourraient être la conséquence d'un changement direct de modulation de l'activité des neurones du NST ou indirect via les neurones DAergiques. Certains travaux ont mis en évidence un contrôle de la libération de DA via les afférences NAergiques du LC (Lategan *et al.*, 1992; Schank *et al.*, 2006). Ainsi une déplétion NAergique induirait une diminution de l'activité des neurones DAergiques de la SNc et par conséquent une réduction

de la libération de DA au niveau striatal mimant par ce fait la situation parkinsonienne.

Nous avons aussi pu mettre en évidence que la déplétion des trois systèmes monoaminergiques était nécessaire pour induire des comportements d'anhédonie et de dépression et ceci aussi bien chez les rats ayant subi une déplétion DAergique unilatérale que bilatérale. Il a aussi été montré que les déplétions 5-HTergiques et NAergiques seules n'induisaient pas de comportements dits de « dépression » (Lucki and O'Leary, 2004; Rosenbrock *et al.*, 2005). Ainsi, ces données suggèrent que ces troubles de l'humeur seraient une conséquence de la défaillance de l'interaction entre les trois systèmes monoaminergiques et non la seule implication du système 5-HTergique comme souvent étudié (Blier and de Montigny, 1999). Ces résultats sont en accord avec les données des expériences de microdialyse montrant une corrélation entre l'amélioration des comportements dits « dépressifs » suite à l'injection d'antidépresseurs et l'augmentation de la libération des trois monoamines (Damsa *et al.*, 2004; Hajos-Korcsok *et al.*, 2000). Nous pouvons aussi supposer grâce à nos résultats électrophysiologiques que ces déficits limbiques seraient associés à une augmentation de la fréquence de décharge des neurones du NST. Il a en effet été montré que le NST participait aux fonctions associatives et limbiques en plus de la fonction sensorimotrice (Benarroch, 2008; Gubellini *et al.*, 2009). Cependant, dans nos conditions, nous ne pouvons pas établir une relation cause à effet entre ces deux paramètres, les mesures d'électrophysiologie ayant été réalisées chez des rats anesthésiés et celles utilisées pour les tests de nage forcée et de consommation du sucrose chez les animaux éveillés.

Concernant l'anxiété, nos résultats ne sont pas en accord suivant la déplétion DAergique réalisée. En effet, la déplétion DAergique unilatérale était nécessaire mais pas suffisante seule pour induire un comportement anxieux alors que les rats déplétés de façon bilatérale en DA sont anxieux. Ceci confirme l'origine DAergique des troubles de l'anxiété en accord avec les données cliniques obtenues chez les patients parkinsoniens montrant que ce symptôme est

dopamine-dépendant (Chaudhuri and Schapira, 2009).

Nous avons aussi étudié les effets de la L-Dopa et de la SHF du NST sur le comportement moteur et non moteur des animaux déplétés en DA combinée ou non à une déplétion en NA et/ou en 5-HT. La SHF est efficace sur le déficit moteur chez les rats déplétés en DA de façon bilatérale. La perte de cette efficacité après les déplétions NAergique et/ou 5-HTergique sous-tend une implication des ces deux systèmes dans l'efficacité de la SHF. Ainsi, chez les patients ne répondant que peu ou pas à la SHF, nous pouvons supposer qu'ils présentent une déplétion combinée d'au moins deux des trois systèmes monoaminergiques. La L-Dopa, à 12mg/kg, n'a été efficace que pour le test d'anxiété chez les animaux ayant une déplétion DAergique bilatérale. Bien que ce symptôme ait une origine DAergique (Chaudhuri and Schapira, 2009), le fait que la L-Dopa aggrave l'anxiété chez les rats avec une déplétion combinée en DA et en 5-HT et n'ait aucun effet sur l'état anxieux chez les rats avec une déplétion combinée en DA et en NA ou une déplétion des trois systèmes monoaminergiques, suppose que les systèmes NAergique et 5-HTergique sont impliqués dans la réponse à la L-Dopa au niveau des comportements anxieux.

De façon très surprenante, les deux traitements utilisés seuls ou combinés améliorent l'état dépressif chez les animaux déplétés en DA bilatéralement et ceci de façon encore plus importante chez les animaux ayant subi la déplétion des trois systèmes monoaminergiques. Chez le patient parkinsonien, bien que la L-Dopa n'aurait pas d'effet sur les comportements de dépression (Marsh and Markham, 1973; Sethi, 2008), la SHF aggraverait cette dépression. Cependant dans notre cas, les animaux sont sélectionnés suivant le site d'implantation des électrodes dans la partie motrice du NST. Ainsi, ce protocole devrait nous avoir permis toute diffusion du courant électrique aux régions avoisinantes du NST comme cela peut être le cas chez certains patients. Cependant, étant donné que le test de la nage forcée est contesté dans la littérature (Borsini and Meli, 1988; Detke and Lucki, 1996) il nous paraît important de

confirmer nos résultats à l'aide d'un autre test comme celui de la préférence au sucrose.

En conclusion cette thèse a apporté de nouvelles évidences quant au rôle respectif des systèmes monoaminergiques dans la manifestation des déficits moteurs et non-moteurs de la maladie de Parkinson. De plus, nous avons aussi mis en évidence l'importance du contrôle de l'activité des neurones du NST par la modulation des récepteurs NAergiques et de par ce fait son implication dans le contrôle moteur.

Ceci nous amène donc à nous poser de nouvelles questions. Lors de la dégénérescence importante des neurones DAergiques, la L-Dopa pourrait être prise en charge par les neurones 5-HTergiques (Navailles et al., 2010 ; Ng et al., 1972). En effet, il a été montré que la L-Dopa pouvait pénétrer dans toutes les cellules dont les cellules 5-HTergique où elle serait métabolisée par la DCAA en dopamine et libérée en même temps que la sérotonine. Un des points importants de notre modèle est que la déplétion 5-HTergique se fait à l'aide de la pCPA qui est un inhibiteur de la tryptophane hydroxylase, enzyme limitante de la synthèse 5-HTergique. Ainsi, nous ne dégradons pas les neurones 5-HTergiques et la L-Dopa peut toujours être métabolisée en DA dans ces neurones et libérée de façon exogène dans le cerveau. Pour vérifier cela, il serait intéressant de mesurer les taux de DA et de 5-HT dans une structure ayant peu de libération basale de DA mais une forte libération de 5-HT tels que l'hippocampe ou le cortex préfrontal par microdialyse intracérébrale chez des animaux déplétés en DA et en 5-HT après injection de L-Dopa. Ces expériences pourraient ainsi permettre d'expliquer les effets observés sur le comportement dit de « dépression » suite à l'injection de L-Dopa dans notre modèle animal. En effet, l'hippocampe et le cortex préfrontal sont des structures impliquées dans les comportements de dépression (Clark *et al.*, 2009; Krishnan and Nestler, 2008).

PUBLICATIONS ANNEXES

PUBLICATIONS ANNEXES

En plus d'une revue écrite durant cette thèse, j'ai pu participer au sein de l'équipe à des travaux connexes visant à mieux comprendre le rôle des ganglions de la base dans des conditions physiologiques et pathologiques. Ces travaux ont fait l'objet de six publications.

I. Revue: Noradrenaline and Parkinson's disease

Delaville C., DeDeurwaerdère P, Benazzouz A.



Noradrenaline and Parkinson's disease

Claire Delaville^{1,2}, Philippe De Deurvaerdère^{1,2} and Abdelhamid Benazzouz^{1,2,3*}

¹ UMR5293, Institut des Maladies Neurodégénératives, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

² UMR5293, Institut des Maladies Neurodégénératives, Centre National de la Recherche Scientifique, Bordeaux, France

³ Centre Hospitalier Universitaire, Bordeaux, France

Edited by:

Elizabeth Abercrombie, Rutgers-Newark: The State University of New Jersey, USA

Reviewed by:

Christine E. Collins, Vanderbilt University, USA
Alessandro Stefani, University of Rome, Italy

*Correspondence:

Abdelhamid Benazzouz, Institut des Maladies Neurodégénératives, Université Bordeaux Segalen, 146, rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France.
e-mail: abdelhamid.benazzouz@u-bordeaux2.fr

Parkinson's disease (PD) is characterized by the degeneration of dopamine (DA) neurons in the substantia nigra *pars compacta*, and motor symptoms including bradykinesia, rigidity, and tremor at rest. These symptoms are exhibited when striatal dopamine concentration has decreased by around 70%. In addition to motor deficits, PD is also characterized by the non-motor symptoms. However, depletion of DA alone in animal models has failed to simultaneously elicit both the motor and non-motor deficits of PD, possibly because the disease is a multi-system disorder that features a profound loss in other neurotransmitter systems. There is growing evidence that additional loss of noradrenaline (NA) neurons of the locus coeruleus, the principal source of NA in the brain, could be involved in the clinical expression of motor as well as in non-motor deficits. In the present review, we analyze the latest evidence for the implication of NA in the pathophysiology of PD obtained from animal models of parkinsonism and from parkinsonian patients. Recent studies have shown that NA depletion alone, or combined with DA depletion, results in motor as well as in non-motor dysfunctions. In addition, by using selective agonists and antagonists of noradrenaline alpha receptors we, and others, have shown that $\alpha 2$ receptors are implicated in the control of motor activity and that $\alpha 2$ receptor antagonists can improve PD motor symptoms as well as L-Dopa-induced dyskinesia. In this review we argue that the loss of NA neurons in PD has an impact on all PD symptoms and that the addition of NAergic agents to dopaminergic medication could be beneficial in the treatment of the disease.

Keywords: Parkinson's disease, motor and non-motor symptoms, noradrenaline, dopamine, locus coeruleus

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is a degenerative disorder of the central nervous system that impairs motor skills, cognitive processes, and other functions. Motor symptoms are characterized by tremor, rigidity, bradykinesia, and postural instability. Among non-motor symptoms are autonomic dysfunction, sensory and sleep difficulties, cognitive, and neurobehavioral problems, including dementia and depression. For example, depression occurs in approximately 45% of all PD patients and reduces patient's quality of life independently from motor symptoms (Lemke et al., 2004). These non-motor symptoms are common in the advanced stages of the disease.

Parkinson's disease is a non-hereditary disease of unknown etiology that usually appears after the age of 50 and affects both sexes equally (Jankovic and Talosa, 1988). It is well-known to be characterized by a progressive degeneration of dopaminergic (DAergic) neurons (70–75%) in the substantia nigra *pars compacta* (SNc), which results in a dopamine (DA) depletion in the striatum (Ehringer and Hornykiewicz, 1960). However, it is misleading to reduce PD to a malady of the SNc. Indeed, it has been repeatedly shown over the last 50 years that noradrenergic (NAergic) cells from the locus coeruleus (LC) also degenerate in the disease (Greenfield and Bosanquet, 1953; Ehringer and Hornykiewicz, 1960; German et al., 1992; Bertrand et al., 1997; Tohgi et al., 1997; Ehringer and Hornykiewicz, 1998). The neuronal loss in the LC is greater (83%) than in the SNc (78%; Zarow et al., 2003). This is in agreement with the Braak's theory (Braak and Del Tredici, 2008) that proposed a progressive caudo-rostral alteration of monoaminergic centers in

the symptomatology of PD with a degeneration of LC NAergic neurons occurring before that of SNc DAergic neurons. Several studies revealed the existence of a correlation between the severity of DA and noradrenaline (NA) depletions with the severity of PD neurological symptoms (Marie et al., 1995; Selikhova et al., 2002). While the DAergic system is the main target of the pharmacological approaches to PD, corrections of the NA alterations inherent to the disease could improve the efficacy of current therapies. In this review we focus on the implication of the LC NA system in the pathophysiology of PD and on the different therapeutic approaches using NAergic agents.

NORADRENERGIC SYSTEMS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

THE NORADRENERGIC SYSTEM

Two main NAergic systems can be distinguished: one is composed of neurons belonging to the medulla oblongata (A1/C1 nucleus), whereas the other is more rostral (A2/C2 nucleus) and is located in the pons (Gaspar, 1994). The caudal NAergic system corresponds to diffuse groups of cells in the lower brainstem. The rostral NAergic system corresponds mainly to the locus coeruleus (LC, A6) located in the pons.

Noradrenaline release exerts potent neuromodulatory effects on synaptic transmission, changing the membrane potential, excitability of neurons and synaptic plasticity *via* adrenergic receptors (ARs). Two subtypes of ARs have been described: alpha ARs ($\alpha 1$ and $\alpha 2$) and beta ARs ($\beta 1$, $\beta 2$, and $\beta 3$). These ARs are found throughout

the brain including the striatum and substantia nigra. Different subtypes are coupled to different G proteins. In general, excitatory effects are mediated by $\alpha 1$ and β postsynaptic ARs (McCormick and Wang, 1991; McCormick et al., 1991; Arcos et al., 2003) and inhibitory effects by $\alpha 2$ presynaptic ARs (Belujon et al., 2007; Benarroch, 2009; Table 1).

THE LOCUS COERULEUS

The LC nucleus is present in all mammalian species and represents the main source of NA for the central nervous system (Mann, 1983; Aston-Jones, 2004). Synaptic inputs from several sources influence the activity of LC neurons. The LC NAergic system, via its widespread projections, modulates cortical, subcortical, and brainstem circuits. Due to the very small size of the LC, biochemical studies are unable to differentiate LC nucleus vs surrounding areas. A lot of

retrograde and anterograde tract tracing studies over the years, that have been well recapitulated by Aston-Jones (2004) and Benarroch (2009), have demonstrated the numerous afferent and efferent connections of LC neurons. These reviews document that the orbitofrontal and anterior cingulate cortices provide the main source of glutamatergic afferent drive to the LC. LC modulates a variety of central functions through the release of NA into several brain areas including neocortex, hippocampus, thalamus, subthalamic nucleus, and substantia nigra. These projections are only sparse in striatum and spinal cord. **Figure 1** summarizes the major afferent and efferent projections of the LC.

The biochemistry of NA neurons has relevance to PD. Because L-Dopa, the metabolic precursor of DA, given to patients to enhance DA synthesis, is also a metabolic precursor of NA. In the normal condition, tyrosine hydroxylase (TH) catalyzes the conversion of

Table 1 | Adrenergic receptor characteristics.

| Receptor subtypes | G protein | Distribution | Effects |
|-------------------|-----------|---|--|
| Alpha 1 | Gq | Postsynaptic throughout brain (including cortex, thalamus, STN, Striatum...) | ↑ Excitability |
| Alpha 2 | Gi/o | Presynaptic on NAergic and non-NAergic terminals | ↓ Spontaneous firing and excitability; ↓ Neurotransmitter release |
| Beta 1 | Gs | Postsynaptic in cerebral cortex, mainly expressed in the heart and the kidney | Adenylate cyclase activation; diffuse cellular response |
| Beta 2 | Gs/Gi | Postsynaptic in cerebellum and cerebral cortex, hippocampus, midbrain..., mainly expressed in peripheral nervous system | Adenylate cyclase activation, resulting in an increase of cAMP; LTP facilitation |
| Beta 3 | Gs | Adipose tissue | Adenylate cyclase activation; regulation of body weight |

STN, subthalamic nucleus; LTP, long-term potentiation; cAMP, cyclic adenosine monophosphate.

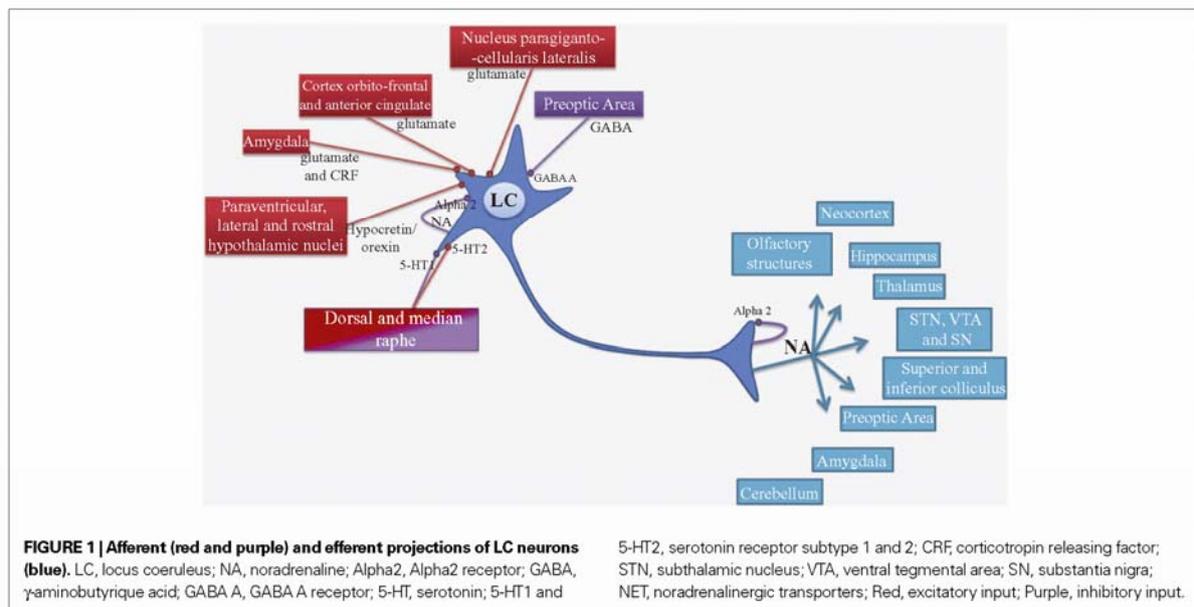


FIGURE 1 | Afferent (red and purple) and efferent projections of LC neurons (blue). LC, locus coeruleus; NA, noradrenaline; Alpha2, Alpha2 receptor; GABA, γ -aminobutyric acid; GABA A, GABA A receptor; 5-HT, serotonin; 5-HT1 and

5-HT2, serotonin receptor subtype 1 and 2; CRF, corticotropin releasing factor; STN, subthalamic nucleus; VTA, ventral tegmental area; SN, substantia nigra; NET, noradrenalinergic transporters; Red, excitatory input; Purple, inhibitory input.

the amino acid tyrosine to L-Dopa. Both normally produced and administered L-Dopa are catalyzed to DA by L-aromatic amino acid decarboxylase (AADC). DA beta-hydroxylase (DBH) synthesizes NA from DA in the cytosol and either the vesicular monoamine transporter (VMAT) moves the NA into vesicles ready for exocytotic release or monoamine oxidase A degrades the NA. Once released into the extracellular space, reuptake of NA is performed by the plasmalemmal noradrenaline transporter (Rascol et al., 2001), while extracellular NA also limits its own release through the stimulation of auto-inhibitory α_2 ARs (Figure 1). Of note, as reported in the cortex (Tanda et al., 1997), NET can also transport extracellular DA inside NAergic neurons.

The LC NAergic system contributes to long-term synaptic plasticity, pain modulation, energy homeostasis and control of local blood flow (McCormick, 1992). LC neurons fire in two distinct modes, tonic and phasic (Aston-Jones and Cohen, 2005a,b). Tonic activity is characterized by a sustained and highly regular pattern of discharge that is highest during wakefulness and decreases during slow-wave sleep. This tonic activity plays a central role in the sleep-waking cycle anticipating the fluctuations of electroencephalographic activity and promoting a state of vigilance. It is indeed well known that the stimulation of central NAergic receptors leads to changes in the state of vigilance. There is also a sustained increase in tonic discharge rate in response to environmental stimuli that elicit behavioral arousal and exploratory behavior. During focused attention and accurate task performance, LC neurons reduce their tonic firing to a moderate rate and respond phasically to task-relevant stimuli. The phasic bursts of LC activity are closely associated with highly accurate behavioral responses. Thus the LC nucleus has a major role in arousal, attention and stress response (Berridge and Waterhouse, 2003; Aston-Jones and Cohen, 2005a).

Alteration of the LC NAergic system has been implicated in many pathologies such as sleep and arousal disorders, attention deficit, hyperactivity disorder, post-traumatic stress disorder and psychiatric disorders, including anxiety, depression, schizophrenia, and mechanisms of opioid addiction (Benarroch, 2009). It constitutes a target for pharmacological treatment of these conditions (Aston-Jones, 2004; Rommelfanger and Weinshenker, 2007; Benarroch, 2009).

THE LOCUS COERULEUS NORADRENERGIC SYSTEM IN PD

Locus coeruleus is often severely affected in neurodegenerative diseases (Saper et al., 1991) and a growing number of anatomical and biochemical data has stressed this point in PD. In line with the drastic decrease in NAergic cell bodies (Chan-Palay and Asan, 1989), significant depletions (>80%) of NA concentration have also been reported in the PD brain (Taquet et al., 1982; Jenner et al., 1983; Gaspar et al., 1991). Consistently, Positron emission tomography (Dailly et al., 2006) studies have reported that [11 C] RTI-32, an *in vivo* marker of both DA transporter (DAT) and NET binding, was reduced in several regions including those poorly innervated by DAergic fibers (Marie et al., 1995; Remy et al., 2005). It has also been shown that NAergic synapses change size and shape of the pre- and postsynaptic components, polymorphism of the synaptic vesicles and marked morphological alterations of the mitochondria (Chan-Palay and Asan, 1989; Baloyannis et al., 2006). Cash et al. (1984, 1986) have reported an increase in

the density of α_1 and β_1 ARs in synaptosomal and microsomal fractions in the 6-hydroxydopamine (6-OHDA) rat model of PD (see below) as well as in the pre-frontal cortex of parkinsonian patients. The studies in animal models and PD patients suggest that the impairment of LC NAergic function could contribute to the motor and non-motor symptoms of PD.

THE LOCUS COERULEUS NORADRENERGIC SYSTEM IN ANIMAL MODELS OF PD

A variety of models have been developed over the years with the increase in understanding of PD. Most, if not all, animal models have focused on DA depletion because PD symptoms typically occur in humans when approximately 70–80% of DA tissue content in the striatum has been lost (Bezard et al., 2001; McNamara and Durso, 2006). The impairment of the NAergic system, also typical of the human disease, has been neglected for several years to the point that most rat models of the disease, generated by administration of the catecholaminergic neurotoxin 6-OHDA, incorporate the concomitant protection of NAergic neurons with the NET blocker desipramine (see below). The reasons that have led to ignoring the role of NAergic neurons in the disease could be related to the demonstration that NAergic neurons are not directly responsible for the behavioral effects of L-Dopa in animal models. Also, the striatum has been the main target of the anti-parkinsonian treatments, a brain region that is poorly innervated by NAergic fibers. Nonetheless, NAergic mechanisms may participate in the therapeutic outcome of L-Dopa (Fox et al., 2001) and NA may act in brain regions that may profoundly impact on the control of motor behaviors, including the subthalamic nucleus (Belujon et al., 2007). The few data available regarding the various animal models of PD support a non-negligible role of NA in the aberrant motor output consequent to DA depletion.

Non-human primate models of the disease have been developed after the discovery of a specific neurotoxin 1-methyl 4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) able to induce parkinsonism in humans (Langston and Ballard, 1983). MPTP has been shown to produce parkinsonian motor deficits in the non-human primate that are similar to PD (Langston and Ballard, 1984). This model has been essential in the understanding of the pathophysiology of PD (Fox and Brotchie, 2010) and the development of new therapeutic approaches, such as the lesion or high frequency stimulation of the subthalamic nucleus (Bergman et al., 1990; Benazzouz et al., 1993, 1996). MPTP-treated rhesus monkeys mimicked the DAergic cell degeneration in the SNc and profound striatal DA depletion. However, the inter-regional pattern of striatal DA loss typically encountered in the idiopathic PD, i.e., a significantly greater depletion of DA in the putamen compared to the caudate nucleus, is not reproduced in this model (Pifl et al., 1991). It was originally reported that MPTP did not cause LC cell death in non-human primates. However, it has become clear that MPTP also causes a distinct and often severe cell loss in the LC and/or NE depletion in terminal fields (Javitch et al., 1984; Mitchell et al., 1985; Di Paolo et al., 1986; Forno et al., 1986; Miyoshi et al., 1988; Pifl et al., 1991). MPTP-treated monkeys developed typical parkinsonian signs of bradykinesia, tremor, and hypokinesia. Behavioral symptoms of PD could involve the concomitant loss of DAergic and NAergic neurons, rather than DAergic neurons alone.

1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine has been also used in mice. MPTP-treated mice with 80% loss of DA do not exhibit profound motor impairments (German et al., 1992; Marien et al., 2004; Archer and Fredriksson, 2006). The fact that MPTP treatment in mice has little to no effect on LC neurons or NA tissue content may explain the lack of motor deficits. In support of a role of NA in motor symptoms in PD, DBH^{-/-} mice display motor impairments associated with a hypodopaminergic state. These mice synthesize normal amounts of DA, but, in the absence of NA, the release of DA seems to be decreased (Rommelfanger and Weinschenker, 2007). This is consistent with data reporting the excitatory influence exerted by NA on DAergic neuron function (see below interaction between DA and NA). One important note is that DBH^{-/-} mice are supplemented with NA agonists and NA itself during development as DBH is necessary for development (Thomas et al., 1995). Taken together, these data suggest that the behavioral symptoms of PD appear to be correlated with a concomitant loss of DA and NA.

The reserpinized rat model (Colpaert, 1987) and the VMAT KO mice (VMAT^{-/-} mice; Taylor et al., 2009) also support an interaction between DAergic and NAergic systems in PD motor symptoms. Reserpine blocks the VMAT, leading to a rapid decrease in the release of monoamines. The cardinal signs of the disease including tremor, rigidity, and hypokinesia are induced by reserpine in rats. The order of occurrence and time course of these signs appear to resemble the natural history of the human disease (Colpaert, 1987; Taylor et al., 2009). Surprisingly, drugs that increase post-synaptic ARs activation or NA availability, but not DA modulation, are effective in reducing parkinsonian signs in reserpinized rats (Colpaert, 1987). These observations led to the proposal that adrenergic mechanisms in the brain may play an important role in modifying motor and non-motor signs. As VMAT is impaired in both the reserpinized rats and the VMAT^{-/-} mice models, the involvement of serotonin (5-HT) in these mechanisms cannot be excluded because VMAT is also involved in the reuptake of serotonin. Reserpine treatments and VMAT^{-/-} mice do not only result in SNc DAergic and LC NAergic systems depletions, they also induce an almost total depletion of DA and NA from the other catecholaminergic nuclei as well as 5-HT originating from the raphe nuclei. In PD, it is estimated that 40–60% of 5-HT neurons degenerate in some cases (Kish, 2003; Kish et al., 2008; Politis et al., 2010).

The 6-OHDA rat is probably the most popular model of PD. Different 6-OHDA models of PD have been developed in which the toxin has been injected into different parts of the nigrostriatal pathway to cause DAergic cell loss in the SNc, resulting in DA depletion in the striatum (Deumens et al., 2002). 6-OHDA can be injected directly into the SNc, the medial forebrain bundle (MFB) or the striatum. The first two modes of injection are used to develop severe lesions of DAergic neurons corresponding to an advanced stage of the disease, while striatal injection of 6-OHDA is used to produce partial DA cell loss corresponding to the early stage of the disease (Kirik et al., 1998; Yuan et al., 2005; Breit et al., 2007). Such models exhibit some motor disabilities related to sensorimotor degradation though freezing, hypokinesia and tremor are not present. In addition, the non-motor symptoms are not evident (Amalric et al., 1995; Olsson et al., 1995; Branchi et al., 2008). It is noteworthy that 6-OHDA lesion of DAergic neurons causes LC NAergic

neurons to be overactive with an irregular pattern of discharge (Wang et al., 2009), suggesting that their influence is magnified in DA-lesioned rats.

Noradrenaline depletion in the rodent by *N*-(2-chloroethyl)-*N*-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP-4) is an approach commonly used to model human neuropsychiatric disorders in rodents. Even though the efficacy of DSP-4 in destroying NA fibers is region- and species-dependent (Dailly et al., 2006), convincing evidence indicates that DSP-4 is a neurotoxin that lesions NAergic terminals arising selectively from the LC (Fritschy and Grzanna, 1989; Grzanna et al., 1989; Fritschy and Grzanna, 1991). Concomitant to the data obtained in non-human primates and genetic mice models of PD (Pifl et al., 1991; Rommelfanger and Weinschenker, 2007), we have recently found that NA depletion alone induces severe motor deficits similar to those reported after 6-OHDA lesion (Delaville et al., 2010). In contrast to a 6-OHDA lesion (Deumens et al., 2002), the motor impairments consequent to NA depletion were not related to DAergic cell loss. Furthermore, the motor deficits reported in 6-OHDA-lesioned rats were not aggravated by the additional depletion of NA (Delaville et al., 2010). Another study has reported that denervation of LC NAergic terminals potentiated the 6-OHDA-induced partial DAergic neurodegeneration and akinesia only in rats treated with a D2 receptor antagonist, haloperidol (Srinivasan and Schmidt, 2003). Only a few studies have specifically addressed the non-motor symptoms of PD in animal models. Our recent data (Delaville et al., 2010) show that additional NA depletion in 6-OHDA-lesioned rats induced anxiety and fear behavior in the elevated plus maze, both being non-motor symptoms of PD. Recently, it has been reported that additional NA depletion impaired working memory in a manner similar to that observed after bilateral inactivation of LC suggesting that the NAergic system of the LC may play an important role in acquisition of spatial memory (Khakpour-Taleghani et al., 2009). Nevertheless, it has been reported that the deficits of spatial information processing in PD are solely a consequence of the striatal DAergic dysfunction (De Leonibus et al., 2007).

In conclusion, most animal models have focused on the motor symptoms related to the nigrostriatal DAergic system. A thorough examination of the data suggests that NAergic neuron dysfunction plays a non-negligible role in the motor and non-motor symptoms. The link between non-motor symptoms and the impairment of NAergic system has been also noted in humans.

INVOLVEMENT OF NA IN PD SYMPTOMS

Although it is relatively common to describe a variety of significant biochemical alterations in PD patients, it is more difficult to demonstrate for each neurotransmitter a specific role in the pathophysiology of the disease. This point could be addressed by careful post-mortem studies which should correlate a specific biochemical pattern observed in a given patient with his detailed clinical history. PET imaging studies demonstrate that it is possible to assess *in vivo* the neocortical monoamine terminal loss (including NA), and to elucidate its potential role in the complex cognitive and affective impairment in PD (Marie et al., 1995). This part of the review is focused on the most relevant studies investigating the role of NA depletion in specific motor and non-motor symptoms related to PD in human patients and associated with the above-mentioned animal models (Table 2).

Table 2 | Involvement of the LC in specific motor and non-motor symptoms of PD and their reference studies.

| | Symptoms | References |
|-------------------------|----------------------|--|
| Motor symptoms | Akinesia | Hornykiewicz (1975) ^M , Narabayashi et al. (1991) ^M , Bezard et al. (1999) ^M |
| | Freezing | Tohgi et al. (1990) ^M , Mizuno et al. (1994) ^M , Sandyk (1996) ^M , Ringendahl and Sierla (1997) ^M , Devos et al. (2010) ^M |
| | Locomotor activity | Narabayashi et al. (1991) ^M , Nishi et al. (1991) ^R , Hill and Brotchie (1999) ^R |
| | "On-off" phenomenon | Sandyk (1996) ^M |
| | Postural instability | Narabayashi et al. (1991) ^M , Grimbergen et al. (2009) ^M |
| | Tremor | Colpaert (1987) ^R , Wilbur et al. (1988) ^M , Yamazaki et al. (1979) ^R |
| | Non-motor symptoms | Anxiety |
| Attention and vigilance | | Stern et al. (1984) ^M , Mayeux et al. (1987) ^M , Bédard et al. (1998) ^M , Riekkinen et al. (1998) ^M |
| Dementia | | Mann and Yates (1983) ^M , Cash et al. (1987) ^M , Mayeux et al. (1987) ^M , Chan-Palay and Asan (1989) ^M |
| Depression | | Mayeux et al. (1986) ^M , Cummings (1992) ^M , Dooneief et al. (1992) ^M , Bader and Hell (1998) ^M , Kasper et al. (2000) ^M , Oertel et al. (2001) ^M , Schrag et al. (2001) ^M , Lemke (2002) ^M , Solikhova et al. (2002) ^M , Lemke et al. (2004) ^M , Yamamoto (2004) ^M , Remy et al. (2005) ^M |

H, human studies; M, Monkey studies; R, Rat studies.

(a) Motor symptoms

Parkinson's disease presents a wider spectrum of motor symptoms when both DA and NA deficiency are combined (Narabayashi et al., 1991). α 2ARs agonism potentiates the anti-parkinsonian action of L-Dopa treatment (Hill and Brotchie, 1999). It is also suggested that alpha-adrenergic mechanisms and in particular α 2ARs, may be involved in reserpine-induced tremor and rigidity (Colpaert, 1987). In human, akathisia and pseudo-parkinsonian tremor are modulated by a NAergic pathway that projects from the LC to the limbic system (Wilbur et al., 1988); these symptoms are improved by an α 2ARs agonist or a β ARs antagonist (Wilbur et al., 1988). Several studies have also reported the involvement of the LC NA pathway in freezing (Mizuno et al., 1994; Sandyk, 1996; Ringendahl and Sierla, 1997; Devos et al., 2010), the "on-off" phenomenon (Sandyk, 1996), postural instability (Narabayashi et al., 1991), and akinesia (Hornykiewicz, 1975; Narabayashi et al., 1991).

(b) Non-motor symptoms

Improvements in medication to treat the motor symptoms have highlighted the non-motor symptoms, which represent one of the main concerns of preclinical and clinical studies (Chaudhuri and Odin, 2010). The non-motor symptoms may appear many years before the onset of the motor complications in PD (Lemke et al., 2004). Whilst we focus on potential DAergic sources of mental dysfunction in PD, the potential role of NAergic systems should be kept in mind as well. Indeed, specific loss of DAergic and NAergic innervation of the limbic system is associated with cognitive and neurobehavioral problems, including dementia (Cash et al., 1987), depression (Cummings, 1992; Remy et al., 2005), anxiety (Stein et al., 1990; Lauterbach et al., 2003), and attention deficits (Riekkinen et al., 1998).

In a rat model of early stage PD, striatal DAergic degeneration and NAergic alterations in prefrontal cortex may have caused emotional reactivity and anxiety (Tadaiesky et al., 2008). These findings

are consistent with data showing that, in naive rats, NAergic function regulates the responsiveness to environmental cues and anxiety behavior (Lapiz et al., 2001). In humans, it is also thought that the enhanced anxiety found in elderly people may be related to the loss of DAergic and NAergic innervations (Gareri et al., 2002).

One of the most devastating non-motor symptoms in PD is depression (Cummings, 1992; Bader and Hell, 1998; Oertel et al., 2001; Schrag et al., 2001; Lemke, 2002; Yamamoto, 2004; Remy et al., 2005). The incidence of depression is currently high in PD, reaching a prevalence of 40% in some studies (Mayeux et al., 1986; Dooneief et al., 1992). The reason for the high frequency of depression in PD is poorly understood but, even if in some patients a dopamine agonist (pramipexole) can improve this symptom (Bxarone et al., 2010), the combined depletion of the three monoaminergic systems may be an explanation. In the unilateral rat model of PD, we have found that the DA depletion combined with NA depletion induced by DSP-4 and 5-HT depletion induced by the tryptophane hydroxylase inhibitor parachlorophenylalanine reduced the sucrose consumption and enhanced the time of immobility in the Porsolt test (Delaville et al., 2010). Importantly, only the combined depletions of all three monoamine systems resulted in a depressive-like behavior. It has been reported in humans that the binding of [¹¹C]RTI-32 in the LC and in several regions of the limbic system including the anterior cingulate cortex, the amygdala, and the ventral striatum was inversely correlated with the degree of apathy and the intensity of depression in the patients (Remy et al., 2005). [¹¹C]RTI-32 is a ligand displaying similar affinities to DAT and NET but with far lower affinity for the 5-HTergic transporter (Carroll et al., 1995). Thus, it seems that the DAergic and NAergic innervations are involved in PD depression and might specifically play a role in apathy, which is a major feature of depression. A histological study has shown that LC neuron morphology is more severely altered in PD with depression than in PD without depression (Chan-Palay and Asan, 1989).

It has also been shown that LC cell loss correlates significantly with performance on reaction time tasks and continuous performance tasks that measure attention and vigilance (Stern et al., 1984;

Mayeux et al., 1987; Bedard et al., 1998; Riekkinen et al., 1998; McNamara and Durso, 2006). LC damage results in severe loss of cortical and limbic NAergic innervation with a 40–78% decrease in NA, its metabolites and related enzymes in PD. These changes are more marked in patients with dementia than in those without dementia (Cash et al., 1987; Mayeux et al., 1987).

EVIDENCE FOR THE INTERACTION BETWEEN NA AND DA IN PD

The concomitant loss of NA and DA could therefore promote aberrant motor and non-motor symptoms, suggesting that the two systems could interact in the brain. Only a few studies demonstrate the role of DA in NAergic modulation in PD. In addition to the increase in firing rate of LC NA neurons (Wang et al., 2009), an increase in the density of β ARs in the cerebral cortex, the forebrain, thalamic nuclei, the midbrain, the hippocampus, and the cerebellum has been reported in 6-OHDA rats with a selective DAergic neuron lesion (Johnson et al., 1989). In general, a decrease in DAergic neuron function seems to enhance NAergic system activity.

Although anatomical evidence for innervation of DA containing brain regions by NAergic fibers in the rat is scarce, functional studies suggest the existence of NAergic inputs that facilitate DAergic transmission (Jenner et al., 1983). Indeed, Ponzio et al. (1981) demonstrated that NAergic nerve terminals originating from the LC may be involved in regulating the functional activity of the DAergic nerve terminals both in the cerebral cortex and the striatum. This regulation appears to be excitatory in nature and is present early in development. These data are confirmed by pharmacological studies showing that α ARs antagonism may reduce the sensitivity of the mesolimbic DAergic system to pharmacological or environmental challenge (Davis et al., 1985; Snoddy and Tessel, 1985; Auclair et al., 2002). Since most antipsychotic drugs exhibit both D2 receptor and α 1ARs antagonist properties, they may alleviate psychosis not only through blockade of postsynaptic DAergic receptors, but also presynaptically on the mesolimbic DAergic system, through their α 1ARs antagonistic action (Mathe et al., 1996). Conversely, stimulation of α 2ARs and β 1ARs elevates DA extracellular levels in the striatum by acting at sites downstream of the DAergic neurons themselves (Chopin et al., 1999; Hudson et al., 1999). More specifically, β 1ARs and α 2ARs regulate the phosphorylation of DARPP-32, a phosphoprotein regulated by DAergic transmission, in neostriatal neurons. Gi protein activation by α 2ARs antagonizes Gs/PKA signaling mediated by D1 receptors and α 2ARs in striatonigral and striatopallidal neurons respectively, thereby enhancing D2 receptor/Gi signaling in striatopallidal neurons (Hara et al., 2010). Reches and Meiner (1992) did not report any change in striatal DA synthesis and release after lesions of the dorsal NA bundle (DNEB). It is therefore suggested that any possible effect of the LC on DA transmission in the striatum is not mediated by the DNEB.

In parallel, the LC NAergic system is thought to exert a neuroprotective influence on SNc DAergic neurons. The first hints that NA promotes DAergic neuron survival came from MPTP studies in non-human primates and mice (Mavridis et al., 1991; Fornai et al., 1996). These studies reported that the damage to nigrostriatal DAergic neurons induced by MPTP was potentiated by pre-treatment with DSP4. Rommelfanger et al. (2004) subsequently showed that either pharmacological or genetic blockade

of NET, which increases extracellular NA, also protects DAergic neurons from MPTP damage in mice. The mechanisms underlying the neuroprotective influence of NA are not clearly determined (Rommelfanger and Weinschenker, 2007).

THERAPEUTIC APPROACHES TARGETING THE NAERGIC SYSTEM

EFFECTS OF L-THREO-DOPS ON MOTOR AND NON-MOTOR SYMPTOMS

Treatment of PD has focused on supplementing DA levels indirectly through L-Dopa administration or on stimulating directly DAergic receptors with DA agonists. Despite the success of these therapies, certain features of PD fail to respond to treatment and even worsen with DA replacement therapy. Among these incapacitating refractory symptoms are apathy, depression, memory loss, akathisia, postural instability, and sudden transient freezing. Clinical and experimental evidence suggests that NA deficiency may be responsible for some of these PD symptoms (see above).

The DA replacement therapy with L-Dopa probably alters the activity of NAergic neurons. Indeed, L-Dopa may enter NAergic neurons to be decarboxylated to DA. Nishi et al. (1991) but not Hollister et al. (1979), have suggested that central NAergic terminals play a significant role in the increase of locomotor activity induced by L-Dopa administration in rats with striatal DA deficiency. Nevertheless, NAergic neurons do not release DA synthesized from L-Dopa as it has been reported that the total destruction of 5-HTergic neurons abolished the releasing effect of L-Dopa (Tanaka et al., 1999), even in brain regions receiving substantial amount of NAergic fibers (Navailles et al., 2010a,b). On the other hand, NAergic neurons could participate in the clearance of extracellular DA. Indeed, because NET is able to transport DA, NAergic fibers could modify the pattern of L-Dopa-induced DA release depending on the relative innervation of brain regions by NAergic neurons. Thus, in the striatum, it has been reported that desipramine enhanced L-Dopa-induced DA release (Arai et al., 2008), suggesting that the clearance could be higher in brain regions more densely innervated. Finally, one could expect an increase in NA tissue content and/or an increase in NA release induced by L-Dopa. The finding that the α 2AR antagonist idazoxan is efficient in reducing the dyskinesia induced by L-Dopa but not by the DA agonist apomorphine (Fox et al., 2001) in MPTP-treated monkeys supports a change in NAergic neuron function induced by L-Dopa.

L-Threo-dihydroxyphenylserine (L-threo-DOPS), a non-natural NAergic precursor, has been shown to be effective in relieving motor and non-motor symptoms of PD (Kuno, 1997). Indeed, in the rat, the duration of harmaline induced tremor was significantly reduced by intraventricular administration of L-threo-DOPS (Yamazaki et al., 1979). In PD patients, Ogawa et al. (1984, 1985) have shown that 10 days treatment with L-threo-DOPS substantially improved patient's freezing episodes, rigidity, and dysarthria. Narabayashi et al. (1991) have reported that treatment with L-threo-DOPS, in combination with a peripheral AADC inhibitor, may have profound effects on freezing phenomena in patients with PD (Tohgi et al., 1990; Tohgi et al., 1993). Other aspects of akinesia also improved considerably in a majority of these patients (Yamamoto et al., 1986), although rigidity and tremor were barely affected (Jenner et al., 1983). When L-threo-DOPS

treatment was stopped, the freezing returned to almost the former level, even though the patients continued to receive L-Dopa and benserazide. This could be explained by the fact that L-Dopa measurably affects NA content in the cerebrospinal fluid compared to L-threo-DOPS treatment (Maruyama et al., 1996). In addition to the improvement of motor symptoms, psychological symptoms have also been improved by L-threo-DOPS (Suzuki et al., 1984; Azuma et al., 1991).

EFFECTS OF NAERGIC RECEPTOR MODULATION ON MOTOR AND NON-MOTOR SYMPTOMS

α 2ARs are distributed widely within the basal ganglia, including the substantia nigra (Schapira, 2005). Mavridis et al. (1991) have suggested that the activation of α 1ARs, which results in an increase in NAergic tone, facilitates locomotor activity, and inversely, α 2ARs activation, by decreasing NAergic tone, inhibits locomotor activity. In PD, hypoactivation of NAergic tone may be involved in the manifestation of tremor and rigidity. In the reserpine rat, yohimbine, an α 2ARs antagonist blocked tremor and improved rigidity but not hypokinesia (Colpaert, 1987).

In the 6-OHDA rat and MPTP monkey models of PD, blockade of α 2ARs by idazoxan improved motor disabilities (Bezard et al., 1999; Belujon et al., 2007) in a manner comparable to that induced by a minimal dose of L-Dopa (Bezard et al., 1999). Although these findings provide support for the therapeutic potential of α 2ARs in the treatment of PD, idazoxan as a monotherapy in PD patients did not display anti-parkinsonian actions (Henry et al., 1999; Rascol et al., 2001; Colosimo and Craus, 2003). However, co-administration of idazoxan with L-Dopa can provide an anti-parkinsonian action lasting more than twice the duration obtained with L-Dopa alone. Interestingly, the α 2AR agonist clonidine and β ARs blockers like propranolol are effective in treating akathisia and tardive dyskinesia (Wilbur et al., 1988). However, clonidine is more often used to treat attention deficit in PD. Attention accuracy was not affected by withdrawal of DAergic drugs in mild or severe PD patients. Clonidine retarded accuracy of performance in a difficult attention test in PD patients (Riekkinen et al., 1998). It seems that the NAergic system via α 2AR may act differentially on the manifestation of motor and non-motor symptoms in PD. α 2AR antagonism would lead to motor amelioration whereas α 2ARs agonism would have non-motor benefits.

Non-motor symptoms are also improved by the use of selective α 1AR agonists. For example, naphthoxazine may improve performance in some cognitive tests of "frontal functions," including the Stroop and the odd-man-out tests, which have been previously found to be affected in PD (Bedard et al., 1998). This drug reduced the percentage of errors and restored the lateralization of N100 during the shifting reaction time task, suggesting that it may act on the processes underlying the shifting deficit in these patients (Bedard et al., 1998). NAergic compounds could also be efficient in depression in PD. Reboxetine, a specific NET inhibitor, significantly improved depression scores (Lemke, 2002). This agent did not significantly change parkinsonian motor symptoms or dosage of L-Dopa. Reboxetine was effective and well tolerated in PD patients receiving 4 weeks of treatment of moderate-to-severe depression. Recently, however, the other NET inhibitor atomoxetine failed to reduce depression in PD patients (Weintraub et al., 2010).

The use of selective NET inhibitors may be critically dependent on the status of NA neurons which, as mentioned above, can be severely damaged.

There are good theoretical and clinical reasons, including pharmacological specificity of effects and low incidence of side effects, to consider reboxetine, idazoxan, clonidine, or naphthoxazine for the treatment of different symptoms in different cases of PD. The efficacy of some of these drugs including the selective NET inhibitors would, however, be critically dependent on the status of LC NAergic fibers. Finally, the wide spectrum of pathophysiological conditions found in the human disease is still not directly addressed in animal models. The predictive efficacy of NAergic compounds in the treatment of non-motor symptoms in PD may require the development of better behavioral tests in animal models.

EFFECTS OF NAERGIC AGENTS ON L-DOPA INDUCED DYSKINESIA

The side effects associated with long-term L-Dopa treatment today constitute an important cause of functional disability. Side effects such as abnormal involuntary movements and psychiatric disorders remain difficult to manage without causing an increase in parkinsonian immobility. Moreover, management of the phenomenon of the "off" period is limited by these same side effects. The causes of L-Dopa-induced dyskinesia are unclear. It probably involves non-physiological pulsatile stimulation of DAergic receptors or non-physiological release of DA (e.g., from 5-HTergic nerve terminals) in the striatum (Tanaka et al., 1999; Carta et al., 2007; Navailles et al., 2010b). Treatments targeting non-DAergic neurotransmitter systems including glutamate, GABA, NA, acetylcholine, 5-HT, adenosine, and cholecystokinin have been studied (Colosimo and Craus, 2003). It has been recently proposed that lesion of the LC is correlated with the onset of L-Dopa-induced dyskinesia (Fornai et al., 2007). In the 6-OHDA rat model, lesioned rats showed a sensitization-desensitization turning response, whereas in 6-OHDA rats with an additional NAergic degeneration induced by DSP-4, the turning activity was maximal throughout the test. Double-lesioned rats exhibited a lower percentage of dose failure episodes during treatment. NAergic denervation appears to be associated with prolonged long-term DAergic sensitization.

This type of response appears to be comparable to that reported in the clinical setting with intermittent L-Dopa administration where no desensitization occurs once the abnormal response is established (Ruckert et al., 1997; Perez et al., 2009a,b). Fulceri et al. (2007) also demonstrated that unilateral damage to the NAergic system precedes the onset of dyskinesia and worsens the severity of L-Dopa-induced contralateral abnormal involuntary movements in hemi-parkinsonian rats. Furthermore, increases in locomotor activity after L-Dopa administration were markedly suppressed in DA and NA deficient groups. This may suggest that additional NAergic denervation selectively decreases the motor response to L-Dopa treatment (Nishi et al., 1991; Mizuno et al., 1994; Perez et al., 2007).

In view of these results, NAergic modulation has been considered to decrease L-Dopa side effects. In 6-OHDA rats, the α 2AR antagonist atipamezole and the α 2AR agonist dexmedetomidine increased and decreased contralateral circling evoked by L-Dopa respectively. Atipamezole also prolonged the duration of action of L-Dopa. The α 1AR antagonist prazosin partially antagonized

the effect of L-Dopa and had a strong inhibitory effect on the atipamezole-induced potentiation of the L-Dopa response (Haapalinna et al., 2003; Yavich et al., 2003). This suggests that atipamezole can modulate motor function indirectly, by stimulating the release of NA and directly, by blocking postsynaptic α 2ARs in neurons other than NAergic ones.

In MPTP-treated monkeys, blockade of α 2ARs by idazoxan in combination with L-Dopa did not impair the anti-parkinsonian response but significantly reduced dyskinesias and delayed their onset, so that the "on" state without dyskinesias was prolonged. The antidyskinetic effect of idazoxan was maintained when repeatedly administered for 10 days and the locomotor response to L-Dopa was significantly increased by chronic administration of idazoxan (Henry et al., 1999; Grondin et al., 2000; Fox et al., 2001). The same antidyskinetic effect has been shown with the α 2ARs antagonists yohimbine, rauwolscine, and fipamezole (Gomez-Mancilla and Bedard, 1993; Henry et al., 1999; Grondin et al., 2000; Savola et al., 2003; Fox and Brotchie, 2010). In the case of idazoxan and fipamezole, an extension of the duration of action of levodopa was also observed. All these antagonists had no effect on their own on DA overflow (Yavich et al., 2003). On the other hand, the α 2ARs agonist clonidine and the β ARs antagonist propranolol markedly reduced the dyskinetic movements induced by L-Dopa at the cost of a return to parkinsonism (Gomez-Mancilla and Bedard, 1993). Another study in the MPTP-lesioned primate has shown that idazoxan significantly reduced L-Dopa-induced dyskinesia, suggesting that α 2ARs stimulation may be involved in the generation of L-Dopa-induced dyskinesia (Fox et al., 2001; Bara-Jimenez et al., 2004).

In humans, however, neither idazoxan nor fipamezole had any effect on duration of on time. These drugs have shown variable benefits in clinical trials (Rascol et al., 1994). The poor efficacy could be explained by the dose used in the different studies. In the MPTP primate model, a significant effect of idazoxan on dyskinesia was

observed over a range of doses from 1 to 10 mg/kg whereas much lower doses were used in human studies (approximately 0.25–1.0 mg/kg). Similarly, the maximal efficacy of fipamezole in reducing L-Dopa-induced dyskinesia in humans was low compared to that reported in the monkey. It is not clear whether the doses and routes employed of either drug might provide equivalent plasma or brain drug levels across the two species. Side effects with α 2ARs antagonists used in human studies included hypertension, facial flushing, and headache which could be inherent to α 2ARs blockade. These side effects were dose-dependent and doses higher than 20 mg were not well tolerated (Fox and Brotchie, 2010). However, other α 2ARs antagonists could be developed. For example, it has been shown in rats that atipamezole had no effect on blood pressure (Haapalinna et al., 2003). Further studies are warranted to confirm the potential benefit of α 2ARs antagonists in L-Dopa-induced dyskinesia.

CONCLUDING REMARKS

Studies in a variety of models and species indicate that NAergic cell loss in the LC could be a conditioning factor for the natural history of PD. LC NA exerts an excitatory drive on the nigrostriatal DAergic system. The use of therapeutic strategies leading to an increase in NA in the brain of PD patients may have a specific place in the treatment of the disease. Pharmacological modulation of the NAergic system, specifically with α 2-AR antagonists, perhaps by inhibiting autoreceptor function, could be important in the treatment of different symptoms of PD and of L-Dopa-induced dyskinesia.

ACKNOWLEDGMENTS

Claire Delaville was supported by a fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie (MENRT). The University Bordeaux Segalen and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) funded this study. We wish to thank Dr. Martin Guthrie for English reading of the manuscript.

REFERENCES

- Amalric, M., Moukhes, H., Nieoullon, A., and Daszuta, A. (1995). Complex deficits on reaction time performance following bilateral intrastriatal 6-OHDA infusion in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 7, 972–980.
- Arai, A., Tomiyama, M., Kannari, K., Kimura, T., Suzuki, C., Watanabe, M., Kawarabayashi, T., Shen, H., and Shoji, M. (2008). Reuptake of L-DOPA-derived extracellular DA in the striatum of a rodent model of Parkinson's disease via norepinephrine transporter. *Synapse* 62, 632–635.
- Archer, T., and Fredriksson, A. (2006). Influence of noradrenaline denervation on MPTP-induced deficits in mice. *J. Neural Transm.* 113, 1119–1129.
- Arcos, D., Sierra, A., Nunez, A., Flores, G., Aceves, J., and Arias-Montano, J. A. (2003). Noradrenaline increases the firing rate of a subpopulation of rat subthalamic neurones through the activation of alpha 1-adrenoceptors. *Neuropharmacology* 45, 1070–1079.
- Aston-Jones, G. (2004). "Locus coeruleus, A5 and A7 noradrenergic cell groups," in *The Rat Nervous System*, 3rd Edn, ed G. Paxinos (New York: Elsevier), 259–284.
- Aston-Jones, G., and Cohen, J. D. (2005a). Adaptive gain and the role of the locus coeruleus-norepinephrine system in optimal performance. *J. Comp. Neurol.* 493, 99–110.
- Aston-Jones, G., and Cohen, J. D. (2005b). An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: adaptive gain and optimal performance. *Annu. Rev. Neurosci.* 28, 403–450.
- Audair, A., Cotecchia, S., Glowinski, J., and Tassin, J. P. (2002). D-amphetamine fails to increase extracellular dopamine levels in mice lacking alpha 1b-adrenergic receptors: relationship between functional and nonfunctional dopamine release. *J. Neurosci.* 22, 9150–9154.
- Azuma, T., Suzuki, T., Sakoda, S., Mizuno, R., Tsujino, S., Kobayashi, T., Kishimoto, S., Hiraga, T., Matsubara, T., Yoshida, S., and Tone, K. (1991). Effect of long-term L-threo-3, 4-dihydroxyphenylserine administration on alpha2-adrenergic receptors in platelet membranes in neurologic disorders. *Acta Neurol. Scand.* 84, 46–50.
- Bader, J. P., and Hell, D. (1998). [Parkinson syndrome and depression]. *Fortschr. Neurol. Psychiatr.* 66, 303–312.
- Baloyannis, S. J., Costa, V., and Baloyannis, I. S. (2006). Morphological alterations of the synapses in the locus coeruleus in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 248, 35–41.
- Bara-Jimenez, W., Dimitrova, T., Sherzai, A., Favit, A., Mouradian, M. M., and Chase, T. N. (2004). Effect of monoamine reuptake inhibitor NS 2330 in advanced Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 19, 1183–1186.
- Bedard, M. A., el Massioui, E., Malapani, C., Dubois, B., Pillon, B., Renault, B., and Agid, Y. (1998). Attentional deficits in Parkinson's disease: partial reversibility with naphthoxazine (SDZ NVT-085), a selective noradrenergic alpha 1 agonist. *Clin. Neuropharmacol.* 21, 108–117.
- Belujon, P., Bezard, E., Taupignon, A., Bioulac, B., and Benazzouz, A. (2007). Noradrenergic modulation of subthalamic nucleus activity: behavioral and electrophysiological evidence in intact and 6-hydroxy-dopamine lesioned rats. *J. Neurosci.* 27, 9595–9606.
- Benarroch, E. E. (2009). The locus coeruleus-norepinephrine system: functional organization and potential clinical significance. *Neurology* 73, 1699–1704.
- Benazzouz, A., Borand, T., Feger, J., Burbaud, P., Bioulac, B., and 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., Gross, C., Feger, J., Borand, T., and 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., and DeLong, M. R. (1990). Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science* 249, 1436–1438.
- Berridge, C. W., and Waterhouse, B. D. (2003). The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 42, 33–84.
- Bertrand, E., Lechowicz, W., Szpak, G. M., and Dymek, J. (1997). Qualitative and quantitative analysis of locus coeruleus neurons in Parkinson's disease. *Folia Neuropathol.* 35, 80–86.
- Bezard, E., Brefel, C., Tison, F., Peyro-Saint-Paul, H., Ladure, P., Rascol, O., and Gross, C. E. (1999). Effect of the $\alpha 2$ adrenoceptor antagonist, idazoxan, on motor disabilities in MPTP-treated monkey. *Prog. Neuropharmacol. Biol. Psychiatry* 23, 1237–1246.
- Bezard, E., Dovero, S., Prunier, C., Ravenscroft, P., Chalou, S., Guilleaume, D., Crossman, A. R., Bioulac, B., Brochie, J. M., and Gross, C. E. (2001). Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 21, 6853–6861.
- Braak, H., and Del Tredici, K. (2008). Invited article: nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. *Neurology* 70, 1916–1925.
- Branchi, I., D'Andrea, I., Arnida, M., Cassano, T., Pezzola, A., Potenza, R. L., Morgese, M. G., Popoli, P., and Alleva, E. (2008). Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: investigating early-phase onset of behavioral dysfunction in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model. *J. Neurosci. Res.* 86, 2050–2061.
- Breit, S., Bouali-Benazzouz, R., Popa, R. C., Gasser, T., Benabid, A. L., and 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.
- Bxarone, P., Poewe, W., Albrecht, S., Debièvre, C., Massey, D., Rascol, O., Tolosa, E., and Weintraub, D. (2010). Pramipexole for the treatment of depressive symptoms in patients with Parkinson's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* 9, 573–580.
- Carroll, F. I., Scheffel, U., Dannals, R. F., Boja, J. W., and Kuhar, M. J. (1995). Development of imaging agents for the dopamine transporter. *Med. Res. Rev.* 15, 419–444.
- Carta, M., Carlsson, T., Kirik, D., and Bjorklund, A. (2007). Dopamine released from 5-HT terminals is the cause of L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats. *Brain* 130, 1819–1833.
- Cash, R., Dennis, T., L'Heureux, R., Raisman, R., Javoy-Agid, F., and Scatton, B. (1987). Parkinson's disease and dementia: norepinephrine and dopamine in locus coeruleus. *Neurology* 37, 42–46.
- Cash, R., Raisman, R., Lanfumey, L., Ploska, A., and Agid, Y. (1986). Cellular localization of adrenergic receptors in rat and human brain. *Brain Res.* 370, 127–135.
- Cash, R., Ruberg, M., Raisman, R., and Agid, Y. (1984). Adrenergic receptors in Parkinson's disease. *Brain Res.* 322, 269–275.
- Chan-Palay, V., and Asan, E. (1989). Alterations in catecholamine neurons of the locus coeruleus in senile dementia of the Alzheimer type and in Parkinson's disease with and without dementia and depression. *J. Comp. Neurol.* 287, 373–392.
- Chaudhuri, K. R., and Odin, P. (2010). The challenge of non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Prog. Brain Res.* 184, 325–341.
- Chopin, P., Colpaert, F. C., and Marien, M. (1999). Effects of $\alpha 2$ adrenoceptor agonists and antagonists on circling behavior in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288, 798–804.
- Colosimo, C., and Craus, A. (2003). Noradrenergic drugs for levodopa-induced dyskinesia. *Clin. Neuropharmacol.* 26, 299–305.
- Colpaert, F. C. (1987). Pharmacological characteristics of tremor, rigidity and hypokinesia induced by reserpine in rat. *Neuropharmacology* 26, 1431–1440.
- Cummings, J. L. (1992). Depression and Parkinson's disease: a review. *Am. J. Psychiatry* 149, 443–454.
- Dailly, E., Chenu, F., Petit-Demontiere, B., and Bourin, M. (2006). Specificity and efficacy of noradrenaline, serotonin depletion in discrete brain areas of Swiss mice by neurotoxins. *J. Neurosci. Methods* 150, 111–115.
- Davis, M., Kehne, J. H., and Commissaris, R. L. (1985). Antagonism of apomorphine-enhanced startle by $\alpha 1$ -adrenergic antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 108, 233–241.
- Delaville, C., Chetrit, J., Abdallah, K., Morin, S., Carodit, L., De Deurwaerdère, P., and Benazzouz, A. (2010). Involvement of monoamine deficiency in motor and nonmotor disabilities of Parkinson's disease: behavioural, biochemical and electrophysiological studies (Int. Basal Ganglia Soc. Abstr.).
- De Leonibus, E., Pascucci, T., Lopez, S., Oliverio, A., Amalric, M., and Mele, A. (2007). Spatial deficits in a mouse model of Parkinson disease. *Psychopharmacology (Berl.)* 194, 517–525.
- Deumens, R., Blokland, A., and Prickaerts, J. (2002). Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp. Neurol.* 175, 303–317.
- Devos, D., Defebvre, L., and Bordet, R. (2010). Dopaminergic and non-dopaminergic pharmacological hypotheses for gait disorders in Parkinson's disease. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 24, 407–421.
- Di Paolo, T., Bedard, P., Daigle, M., and Boucher, R. (1986). Long-term effects of MPTP on central and peripheral catecholamine and indoleamine concentrations in monkeys. *Brain Res.* 379, 286–293.
- Dooneief, G., Mirabella, E., Bell, K., Marder, K., Stern, Y., and Mayeux, R. (1992). An estimate of the incidence of depression in idiopathic Parkinson's disease. *Arch. Neurol.* 49, 305–307.
- Ehringer, H., and 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.
- Ehringer, H., and Hornykiewicz, O. (1998). Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. *Parkinsonism Relat. Disord.* 4, 53–57.
- Fornai, F., Di Poggio, A. B., Pellegrini, A., Ruggieri, S., and Paparelli, A. (2007). Noradrenaline in Parkinson's disease: from disease progression to current therapeutics. *Curr. Med. Chem.* 14, 2330–2334.
- Fornai, F., Vaglini, F., Maggio, R., Bonuccelli, U., and Corsini, G. U. (1996). Excitatory amino acids and MPTP toxicity. *Adv. Neurol.* 69, 167–176.
- Forno, L. S., Langston, J. W., DeLanney, L. E., Irwin, I., and Ricaurte, G. A. (1986). Locus coeruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys. *Ann. Neurol.* 20, 449–455.
- Fox, S. H., and Brochie, J. M. (2010). The MPTP-lesioned non-human primate models of Parkinson's disease. Past, present, and future. *Prog. Brain Res.* 184, 133–157.
- Fox, S. H., Henry, B., Hill, M. P., Peggs, D., Crossman, A. R., and Brochie, J. M. (2001). Neural mechanisms underlying peak-dose dyskinesia induced by levodopa and apomorphine are distinct: evidence from the effects of the $\alpha 2$ adrenoceptor antagonist idazoxan. *Mov. Disord.* 16, 642–650.
- Fritschy, J. M., and Grzanna, R. (1989). Immunohistochemical analysis of the neurotoxic effects of DSP-4 identifies two populations of noradrenergic axon terminals. *Neuroscience* 30, 181–197.
- Fritschy, J. M., and Grzanna, R. (1991). Selective effects of DSP-4 on locus coeruleus axons: are there pharmacologically different types of noradrenergic axons in the central nervous system? *Prog. Brain Res.* 88, 257–268.
- Fulceri, F., Biagioni, F., Ferrucci, M., Lazzari, G., Bartalucci, A., Galli, V., Ruggieri, S., Paparelli, A., and Fornai, F. (2007). Abnormal involuntary movements (AIMs) following pulsatile dopaminergic stimulation: severe deterioration and morphological correlates following the loss of locus coeruleus neurons. *Brain Res.* 1135, 219–229.
- Gareri, P., De Fazio, P., and De Sarro, G. (2002). Neuropharmacology of depression in aging and age-related diseases. *Ageing Res. Rev.* 1, 113–134.
- Gaspar, P. (1994). *Anatomy of the Noradrenergic Pathways in the Primate Brain: Alteration in Parkinson's Disease*. Boca Raton: CRC Press, 73–88.
- Gaspar, P., Duyckaerts, C., Alvarez, C., Javoy-Agid, F., and Berger, B. (1991). Alterations of dopaminergic and noradrenergic innervations in motor cortex in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 30, 365–374.
- German, D. C., Manaye, K. F., White, C. L. III, Woodward, D. J., McIntire, D. D., Smith, W. K., Kalaria, R. N., and Mann, D. M. (1992). Disease-specific patterns of locus coeruleus cell loss. *Ann. Neurol.* 32, 667–676.
- Gomez-Mancilla, B., and Bedard, P. J. (1993). Effect of nondopaminergic drugs on L-dopa-induced dyskinesias in MPTP-treated monkeys. *Clin. Neuropharmacol.* 16, 418–427.
- Greenfield, J. G., and Bosanquet, F. D. (1953). The brain-stem lesions in Parkinsonism. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 16, 213–226.
- Grimbergen, Y. A., Langston, J. W., Roos, R. A., and Bloem, B. R. (2009). Postural instability in Parkinson's disease: the adrenergic hypothesis and the locus coeruleus. *Expert Rev. Neurother.* 9, 279–290.
- Grondin, R., Hadj Tahar, A., Doan, V. D., Ladure, P., and Bedard, P. J. (2000). Noradrenoceptor antagonism

- with idazoxan improves L-dopa-induced dyskinesias in MPTP monkeys. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 361, 181–186.
- Grzanna, R., Berger, U., Fritschy, J. M., and Geffard, M. (1989). Acute action of DSP-4 on central norepinephrine axons: biochemical and immunohistochemical evidence for differential effects. *J. Histochem. Cytochem.* 37, 1435–1442.
- Haapalinna, A., Leino, T., and Heinonen, E. (2003). The alpha-2-adrenoceptor antagonist atipamezole potentiates anti-Parkinsonian effects and can reduce the adverse cardiovascular effects of dopaminergic drugs in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 368, 342–351.
- Hara, M., Fukui, R., Hieda, E., Kuroiwa, M., Bateup, H. S., Kano, T., Greengard, P., and Nishi, A. (2010). Role of adrenoceptors in the regulation of dopamine/DARPP-32 signaling in neostriatal neurons. *J. Neurochem.* 113, 1046–1059.
- Henry, B., Fox, S. H., Peggs, D., Crossman, A. R., and Brotchie, J. M. (1999). The alpha-2-adrenergic receptor antagonist idazoxan reduces dyskinesia and enhances anti-parkinsonian actions of L-dopa in the MPTP-lesioned primate model of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 14, 744–753.
- Hill, M. P., and Brotchie, J. M. (1999). The adrenergic receptor agonist, clonidine, potentiates the anti-parkinsonian action of the selective kappa-opioid receptor agonist, enadoline, in the monoamine-depleted rat. *Br. J. Pharmacol.* 128, 1577–1585.
- Hollister, A. S., Breese, G. R., and Mueller, R. A. (1979). Role of monoamine neural systems in L-dihydroxyphenylalanine-stimulated activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 208, 37–43.
- Hornykiewicz, O. (1975). Brain monoamines and parkinsonism. *Natl. Inst. Drug Abuse Res. Monogr. Ser.* 11, 13–21.
- Hudson, A. L., Robinson, E. S., Lallies, M. D., Tyacke, R. J., Jackson, H. C., and Nutt, D. J. (1999). In vitro and in vivo approaches to the characterization of the alpha-2-adrenoceptor. *J. Auton. Pharmacol.* 19, 311–320.
- Jankovic, J., and Tolosa, E. (1988). *Parkinson's Disease and Movement Disorders*, 5th Edn. Baltimore: Lippincott William and Wilkins.
- Javitch, J. A., Uhl, G. R., and Snyder, S. H. (1984). Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: characterization and localization of receptor binding sites in rat and human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 4591–4595.
- Jenner, P., Sheehy, M., and Marsden, C. D. (1983). Noradrenaline and 5-hydroxytryptamine modulation of brain dopamine function: implications for the treatment of Parkinson's disease. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 15(Suppl. 2), 277S–289S.
- Johnson, E. W., Wolfe, B. B., and Molinoff, P. B. (1989). Regulation of subtypes of beta-adrenergic receptors in rat brain following treatment with 6-hydroxydopamine. *J. Neurosci.* 9, 2297–2305.
- Kasper, S., el Giamal, N., and Hilger, E. (2000). Reboxetine: the first selective noradrenaline re-uptake inhibitor. *Expert Opin. Pharmacother.* 1, 771–782.
- Khakpour-Taleghani, B., Lashgari, R., Motamedi, F., and Naghdi, N. (2009). Effect of reversible inactivation of locus ceruleus on spatial reference and working memory. *Neuroscience* 158, 1284–1291.
- Kirik, D., Rosenblad, C., and Bjorklund, A. (1998). Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp. Neurol.* 152, 259–277.
- Kish, S. J. (2003). Biochemistry of Parkinson's disease: is a brain serotonergic deficiency a characteristic of idiopathic Parkinson's disease? *Adv. Neurol.* 91, 39–49.
- Kish, S. J., Tong, J., Hornykiewicz, O., Rajput, A., Chang, L. J., Guttman, M., and Furukawa, Y. (2008). Preferential loss of serotonin markers in caudate versus putamen in Parkinson's disease. *Brain* 131, 120–131.
- Kuno, S. (1997). [Treatment of Parkinson's disease with multiple drugs]. *Nippon Rinsho* 55, 59–64.
- Langston, J. W., and Ballard, P. (1984). Parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): implications for treatment and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Can. J. Neurol. Sci.* 11, 160–165.
- Langston, J. W., and Ballard, P. A. Jr. (1983). Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N. Engl. J. Med.* 309, 310.
- Lapiz, M. D., Mateo, Y., Durkin, S., Parker, T., and Marsden, C. A. (2001). Effects of central noradrenaline depletion by the selective neurotoxin DSP-4 on the behaviour of the isolated rat in the elevated plus maze and water maze. *Psychopharmacology (Berl.)* 155, 251–259.
- Lauterbach, E. C., Freeman, A., and Vogel, R. L. (2003). Correlates of generalized anxiety and panic attacks in dystonia and Parkinson disease. *Cogn. Behav. Neurol.* 16, 225–233.
- Lemke, M. R. (2002). Effect of reboxetine on depression in Parkinson's disease patients. *J. Clin. Psychiatry* 63, 300–304.
- Lemke, M. R., Fuchs, G., Gemende, I., Herting, B., Oehlwein, C., Reichmann, H., Rieke, J., and Volkmann, I. (2004). Depression and Parkinson's disease. *J. Neurol.* 251(Suppl. 6), 24–27.
- Mann, D. M. (1983). The locus coeruleus and its possible role in ageing and degenerative disease of the human central nervous system. *Mech. Ageing Dev.* 23, 73–94.
- Mann, D. M., and Yates, P. O. (1983). Pathological basis for neurotransmitter changes in Parkinson's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 9, 3–19.
- Marie, R. M., Barre, L., Rioux, P., Allain, P., Lechevalier, B., and Baron, J. C. (1995). PET imaging of neocortical monoaminergic terminals in Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Park. Dis. Dement. Sect.* 9, 55–71.
- Marien, M. R., Colpaert, F. C., and Rosenquist, A. C. (2004). Noradrenergic mechanisms in neurodegenerative diseases: a theory. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 45, 38–78.
- Maruyama, W., Naoi, M., and Narabayashi, H. (1996). The metabolism of L-DOPA and L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine and their effects on monoamines in the human brain: analysis of the intraventricular fluid from parkinsonian patients. *J. Neurol. Sci.* 139, 141–148.
- Mathe, J. M., Nomikos, G. G., Hildebrand, B. E., Hertel, P., and Svensson, T. H. (1996). Prazosin inhibits MK-801-induced hyperlocomotion and dopamine release in the nucleus accumbens. *Eur. J. Pharmacol.* 309, 1–11.
- Mavridis, M., Degryse, A. D., Lategan, A. J., Marien, M. R., and Colpaert, F. C. (1991). Effects of locus coeruleus lesions on parkinsonian signs, striatal dopamine and substantia nigra cell loss after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in monkeys: a possible role for the locus coeruleus in the progression of Parkinson's disease. *Neuroscience* 41, 507–523.
- Mayeux, R., Stern, Y., Sano, M., Cote, L., and Williams, J. B. (1987). Clinical and biochemical correlates of bradyphrenia in Parkinson's disease. *Neurology* 37, 1130–1134.
- Mayeux, R., Stern, Y., Williams, J. B., Cote, L., Frantz, A., and Dyrenfurth, I. (1986). Clinical and biochemical features of depression in Parkinson's disease. *Am. J. Psychiatry* 143, 756–759.
- McCormick, D. A. (1992). Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex. *J. Clin. Neurophysiol.* 9, 212–223.
- McCormick, D. A., Pape, H. C., and Williamson, A. (1991). Actions of norepinephrine in the cerebral cortex and thalamus: implications for function of the central noradrenergic system. *Prog. Brain Res.* 88, 293–305.
- McCormick, D. A., and Wang, Z. (1991). Serotonin and noradrenaline excite GABAergic neurones of the guinea-pig and cat nucleus reticularis thalami. *J. Physiol.* 442, 235–255.
- McNamara, P., and Dursio, R. (2006). Neuropharmacological treatment of mental dysfunction in Parkinson's disease. *Behav. Neurol.* 17, 43–51.
- Mitchell, I. J., Cross, A. J., Sambrook, M. A., and Crossman, A. R. (1985). Sites of the neurotoxic action of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the macaque monkey include the ventral tegmental area and the locus coeruleus. *Neurosci. Lett.* 61, 195–200.
- Miyoshi, R., Kito, S., Ishida, H., and Katayama, S. (1988). Alterations of the central noradrenergic system in MPTP-induced monkey parkinsonism. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 62, 93–102.
- Mizuno, Y., Kondo, T., and Mori, H. (1994). Various aspects of motor fluctuations and their management in Parkinson's disease. *Neurology* 44, S29–S34.
- Narabayashi, H., Yokochi, F., Ogawa, T., and Igakura, T. (1991). [Analysis of L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine effect on motor and psychological symptoms in Parkinson's disease]. *No To Shinkei* 43, 263–268.
- Navailles, S., Bioulac, B., Gross, C., and De Deurvaerdere, P. (2010a). Chronic L-DOPA therapy alters central serotonergic function and L-DOPA-induced dopamine release in a region-dependent manner in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 41, 585–590.
- Navailles, S., Bioulac, B., Gross, C., and De Deurvaerdere, P. (2010b). Serotonergic neurons mediate ectopic release of dopamine induced by L-DOPA in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 38, 136–143.
- Nishi, K., Kondo, T., and Narabayashi, H. (1991). Destruction of norepinephrine terminals in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mice reduces locomotor activity induced by L-dopa. *Neurosci. Lett.* 123, 244–247.
- Oertel, W. H., Hoglinger, G. U., Caraceni, T., Girotti, F., Eichhorn, T., Spottke, A. E., Krieg, J. C., and Poewe, W. (2001). Depression in Parkinson's disease. An update. *Adv. Neurol.* 86, 373–383.
- Ogawa, N., Kuroda, H., Yamamoto, M., Nukina, I., and Ota, Z. (1984). Improvement in freezing phenomenon of Parkinson's disease after

- DL-threo-3, 4-dihydroxyphenylserine. *Acta Med. Okayama* 38, 301–304.
- Ogawa, N., Yamamoto, M., and Takayama, H. (1985). L-threo-3, 4-dihydroxyphenylserine treatment of Parkinson's disease. *J. Med.* 16, 525–534.
- Olsson, M., Nikkiah, G., Bentlage, C., and 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.
- Perez, V., Marin, C., Rubio, A., Aguilar, E., Barbanoj, M., and Kulisevsky, J. (2009a). Effect of the additional noradrenergic neurodegeneration to 6-OHDA-lesioned rats in levodopa-induced dyskinesias and in cognitive disturbances. *J. Neural Transm.* 116, 1257–1266.
- Perez, V., Sosti, V., Rubio, A., Barbanoj, M., Gich, I., Rodriguez-Alvarez, J., and Kulisevsky, J. (2009b). Noradrenergic modulation of the motor response induced by long-term levodopa administration in Parkinsonian rats. *J. Neural Transm.* 116, 867–874.
- Perez, V., Sosti, V., Rubio, A., Barbanoj, M., Rodriguez-Alvarez, J., and Kulisevsky, J. (2007). Modulation of the motor response to dopaminergic drugs in a parkinsonian model of combined dopaminergic and noradrenergic degeneration. *Eur. J. Pharmacol.* 576, 83–90.
- Piffl, C., Schingnitz, G., and Hornykiewicz, O. (1991). Effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on the regional distribution of brain monoamines in the rhesus monkey. *Neuroscience* 44, 591–605.
- Politis, M., Wu, K., Loane, C., Kiferle, L., Molloy, S., Brooks, D. J., and Piccini, P. (2010). Staging of serotonergic dysfunction in Parkinson's disease: an in vivo 11C-DASBPET study. *Neurobiol. Dis.* 40, 216–221.
- Ponzio, F., Hallman, H., and Jonsson, G. (1981). Noradrenaline and dopamine interaction in rat brain during development. *Med. Biol.* 59, 161–169.
- Rascol, O., Arnulf, I., Peyro-Saint Paul, H., Brefel-Courbon, C., Vidailhet, M., Thalamas, C., Bonnet, A. M., Descombes, S., Bejjani, B., Fabre, N., Montastruc, J. L., and Agid, Y. (2001). Idazoxan, an alpha-2 antagonist, and L-DOPA-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 16, 708–713.
- Rascol, O., Fabre, N., Blin, O., Poulfik, J., Sabatini, U., Senard, J. M., Ane, M., Montastruc, J. L., and Rascol, A. (1994). Naltrexone, an opiate antagonist, fails to modify motor symptoms in patients with Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 9, 437–440.
- Reches, A., and Meiner, Z. (1992). The locus coeruleus and dopaminergic function in rat brain: implications to parkinsonism. *Brain Res. Bull.* 28, 663–666.
- Remy, P., Doder, M., Lees, A., Turjanski, N., and Brooks, D. (2005). Depression in Parkinson's disease: loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system. *Brain* 128, 1314–1322.
- Riekkinen, M., Kejonen, K., Jakala, P., Soininen, H., and Riekkinen, P. Jr. (1998). Reduction of noradrenaline impairs attention and dopamine depletion slows responses in Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* 10, 1429–1435.
- Ringendahl, H., and Sierla, T. (1997). [Freezing phenomenon in Parkinson disease]. *Fortschr. Neurol. Psychiatr.* 65, 435–445.
- Rommelfanger, K. S., and Weinschenker, D. (2007). Norepinephrine: the redheaded stepchild of Parkinson's disease. *Biochem. Pharmacol.* 74, 177–190.
- Rommelfanger, K. S., Weinschenker, D., and Miller, G. W. (2004). Reduced MPTP toxicity in noradrenaline transporter knockout mice. *J. Neurochem.* 91, 1116–1124.
- Ruckert, N., Buber, M., and Schmidt, W. J. (1997). 6-Hydroxydopamine lesion of locus coeruleus and the antiparkinsonian potential of NMDA-receptor antagonists in rats. *J. Neural Transm.* 104, 363–377.
- Sandyk, R. (1996). Freezing of gait in Parkinson's disease is improved by treatment with weak electromagnetic fields. *Int. J. Neurosci.* 85, 111–124.
- Saper, C. B., Sorrentino, D. M., German, D. C., and deLacalle, S. (1991). Medullary catecholaminergic neurons in the normal human brain and in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 29, 577–584.
- Savola, J. M., Hill, M., Engstrom, M., Merivuori, H., Wurster, S., McGuire, S. G., Fox, S. H., Crossman, A. R., and Brotchie, J. M. (2003). Fipamezole (JP-1730) is a potent alpha2 adrenergic receptor antagonist that reduces levodopa-induced dyskinesia in the MPTP-lesioned primate model of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 18, 872–883.
- Schapiro, A. H. (2005). Present and future drug treatment for Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 76, 1472–1478.
- Schrag, A., Jahanshahi, M., and Quinn, N. P. (2001). What contributes to depression in Parkinson's disease? *Psychol. Med.* 31, 65–73.
- Selikhova, M. V., Kogan, B. M., Serkin, G. V., and Gusev, E. I. (2002). [Catecholamine metabolism in different forms of Parkinson's disease]. *Zh. Nevrol. Psikhiatr. Im. S. S. Korsakova.* 102, 37–40.
- Snoddy, A. M., and Tessel, R. E. (1985). Prazosin: effect on psychomotor-stimulant cues and locomotor activity in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 116, 221–228.
- Srinivasan, J., and Schmidt, W. J. (2003). Potentiation of parkinsonian symptoms by depletion of locus coeruleus noradrenaline in 6-hydroxydopamine-induced partial degeneration of substantia nigra in rats. *Eur. J. Neurosci.* 17, 2586–2592.
- Stein, M. B., Heuser, I. J., Juncos, J. L., and Uhde, T. W. (1990). Anxiety disorders in patients with Parkinson's disease. *Am. J. Psychiatry* 147, 217–220.
- Stern, Y., Mayeux, R., and Cote, L. (1984). Reaction time and vigilance in Parkinson's disease. Possible role of altered norepinephrine metabolism. *Arch. Neurol.* 41, 1086–1089.
- Suzuki, T., Sakoda, S., Ueji, M., Kishimoto, S., Hayashi, A., Kondo, T., and Narabayashi, H. (1984). Treatment of parkinsonism with L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine: a pharmacokinetic study. *Neurology* 34, 1446–1450.
- Tadaiesky, M. T., Dombrowski, P. A., Figueiredo, C. P., Cargnin-Ferreira, E., Da Cunha, C., and Takahashi, R. N. (2008). Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 156, 830–840.
- Tanaka, H., Kannari, K., Maeda, T., Tomiyama, M., Suda, T., and Matsumaga, M. (1999). Role of serotonergic neurons in L-DOPA-derived extracellular dopamine in the striatum of 6-OHDA-lesioned rats. *Neuroreport* 10, 631–634.
- Tanda, G., Pontieri, F. E., Frau, R., and Di Chiara, G. (1997). Contribution of blockade of the noradrenaline carrier to the increase of extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex by amphetamine and cocaine. *Eur. J. Neurosci.* 9, 2077–2085.
- Taquet, H., Javoy-Agid, F., Cesselin, F., Hamon, M., Legrand, J. C., and Agid, Y. (1982). Microtopography of methionine-enkephalin, dopamine and noradrenaline in the ventral mesencephalon of human control and Parkinsonian brains. *Brain Res.* 235, 303–314.
- Taylor, T. N., Caudle, W. M., Shepherd, K. R., Noorian, A., Jackson, C. R., Ivovone, P. M., Weinschenker, D., Greene, J. G., and Miller, G. W. (2009). Nonmotor symptoms of Parkinson's disease revealed in an animal model with reduced monoamine storage capacity. *J. Neurosci.* 29, 8103–8113.
- Thomas, S. A., Matsumoto, A. M., and Palmiter, R. D. (1995). Noradrenaline is essential for mouse fetal development. *Nature* 374, 643–646.
- Tohgi, H., Abe, T., Saheki, M., Yamazaki, K., and Murata, T. (1997). Concentration of catecholamines and indoleamines in the cerebrospinal fluid of patients with vascular parkinsonism compared to Parkinson's disease patients. *J. Neural Transm.* 104, 441–449.
- Tohgi, H., Abe, T., and Takahashi, S. (1993). The effects of L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine on the total norepinephrine and dopamine concentrations in the cerebrospinal fluid and freezing gait in parkinsonian patients. *J. Neural Transm. Park. Dis. Dement. Sect.* 5, 27–34.
- Tohgi, H., Abe, T., Takahashi, S., Takahashi, I., Ueno, M., and Nozaki, Y. (1990). Effect of a synthetic norepinephrine precursor, L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine on the total norepinephrine concentration in the cerebrospinal fluid of parkinsonian patients. *Neurosci. Lett.* 116, 194–197.
- Wang, T., Zhang, Q. J., Liu, J., Wu, Z. H., and Wang, S. (2009). Firing activity of locus coeruleus noradrenergic neurons increases in a rodent model of Parkinsonism. *Neurosci. Bull.* 25, 15–20.
- Weintraub, D., Mavandadi, S., Mamikonyan, E., Siderowf, A. D., Duda, J. E., Hurtig, H. I., Colcher, A., Horn, S. S., Nazeem, S., Ten Have, T. R., and Stern, M. B. (2010). Atomoxetine for depression and other neuropsychiatric symptoms in Parkinson disease. *Neurology* 75, 448–455.
- Wilbur, R., Kulik, F. A., and Kulik, A. V. (1988). Noradrenergic effects in tardive dyskinesia, akathisia and pseudoparkinsonism via the limbic system and basal ganglia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 12, 849–864.
- Yamamoto, M. (2004). [Depression in Parkinson's disease]. *Nippon Rinsho* 62, 1661–1666.
- Yamamoto, M., Ogawa, N., and Ujike, H. (1986). Effect of L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine chronic administration on cerebrospinal fluid and plasma free 3-methoxy-4-hydroxy-phenylglycol concentration in patients with Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 73, 39–44.
- Yamazaki, M., Tanaka, C., and Takaori, S. (1979). Significance of central noradrenergic system on harmaline induced tremor. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 10, 421–427.
- Yavich, L., Sirvio, J., Haapalinna, A., Ylilinen, A., and Mannisto, P. T. (2003).

- Atipamezole, an alpha2-adrenoceptor antagonist, augments the effects of L-DOPA on evoked dopamine release in rat striatum. *Eur. J. Pharmacol.* 462, 83–89.
- Yuan, H., Sarre, S., Ebinger, G., and Michotte, Y. (2005). Histological, behavioural and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson's disease. *J. Neurosci. Methods* 144, 35–45.
- Zarow, C., Lyness, S. A., Mortimer, J. A., and Chui, H. C. (2003). Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. *Arch. Neurol.* 60, 337–341.
- Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Received: 02 February 2011; paper pending published: 27 March 2011; accepted: 04 May 2011; published online: 18 May 2011.
- Citation: Delaville C, De Deurwaerdere P and Benazzouz A (2011) Noradrenaline and Parkinson's disease. *Front. Syst. Neurosci.* 5:31. doi: 10.3389/fnsys.2011.00031
- Copyright © 2011 Delaville, De Deurwaerdere and Benazzouz. This is an open-access article subject to a non-exclusive license between the authors and Frontiers Media SA, which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and other Frontiers conditions are complied with.

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

Chetrit J., Delaville C., Aristieta A., Morin S., Benazzouz A

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'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).

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 μA 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 μm 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 dyskinesiogenic 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.
- Stoessel 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 bridles 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

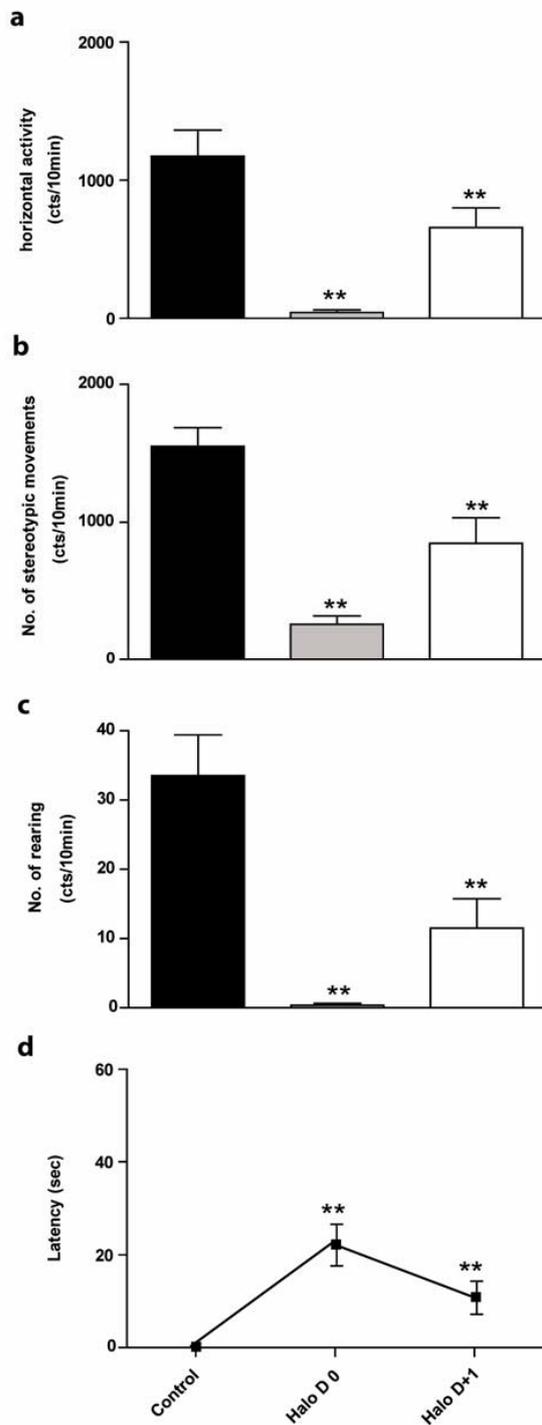


Figure 1. Acute injection of haloperidol induces hypocomotor activity and catalepsy

(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.

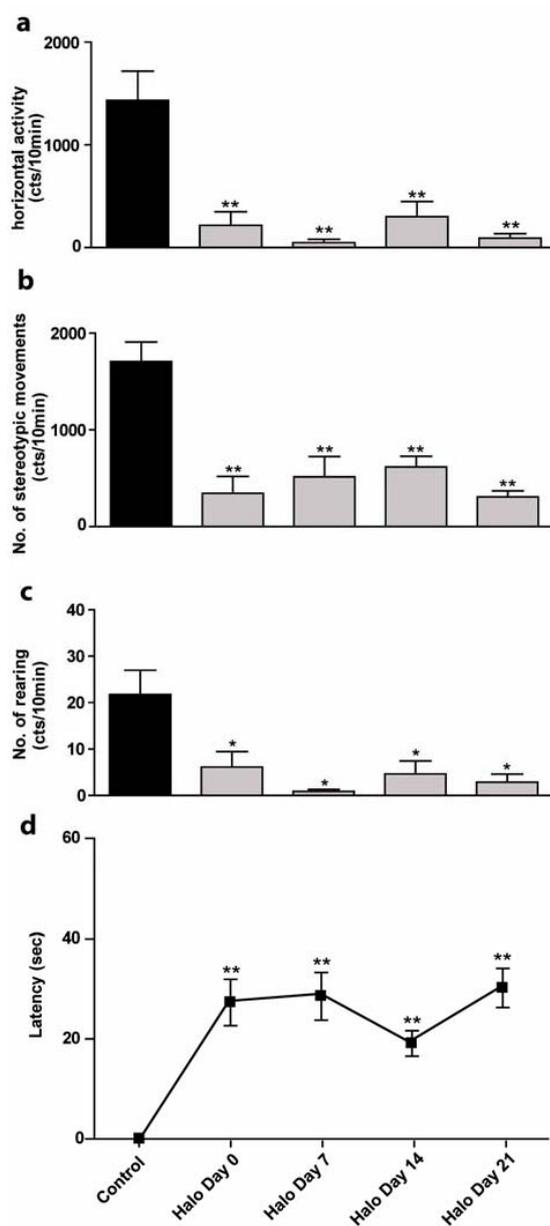


Figure 2. Chronic injections of haloperidol induces hypomotor activity and catalepsy

(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.

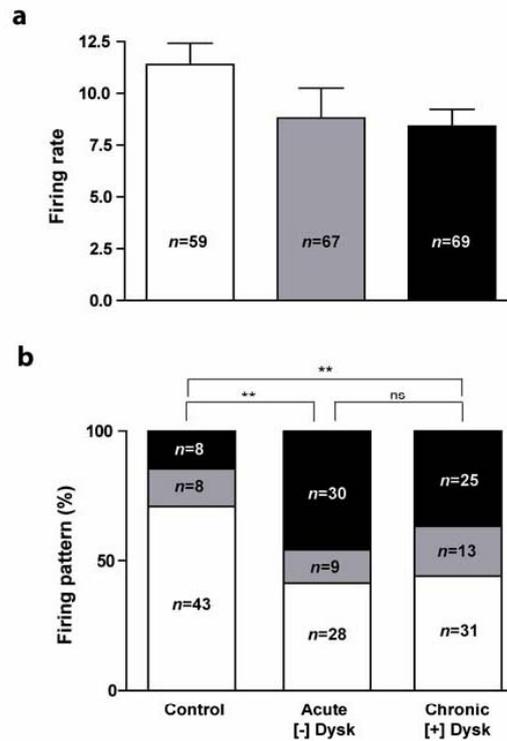


Figure 3: Effects of acute and chronic haloperidol treatment on STN neuronal activity

(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).

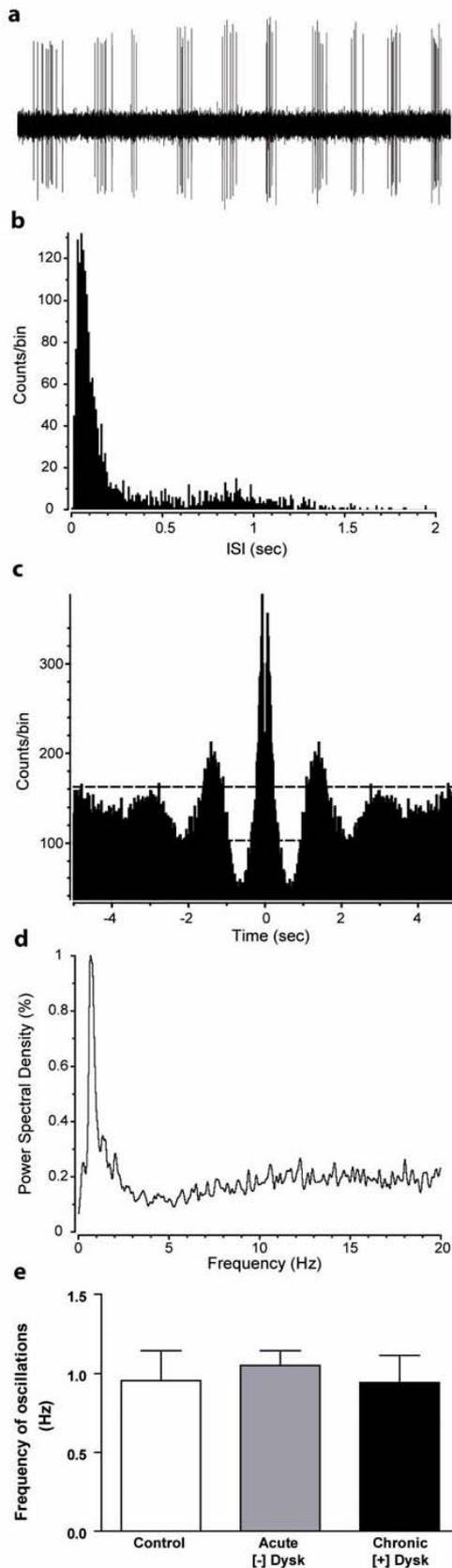


Figure 4: Haloperidol-induced prominent oscillatory firing pattern in STN neurons.

(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. Articles en préparation

1- Intrapallidal injection of 6-OHDA induced motor impairment and changes in the neuronal activity of the subthalamic nucleus and substantia nigra pars reticulata in the rat. Submitted

Abedi M.P., Delaville C., De Deurwerdère P., Benjelloun W. and Benazzouz A.

2- Lead acetate induced motor and non-motor disabilities associated with a change in the firing pattern of subthalamic nucleus neurons. Submitted

Sabbar M., Delaville C., De Deurwaerdère P., Benazzouz A. et Lakhdar-Ghazal N.

3- The motor, limbic and associative cortico-subthalamic pathways are not fully segregated in the rat

Janssen M.L.F., Visser-Vandewalle V., Zwartjes D.G.M., Delaville C., Temel Y., Benazzouz A.

4- Involvement of dopamine deficiency in memory disorders: behavioral, biochemical and electrophysiological studies in 6-hydroxydopamine rat model of parkinsonism.

Retailleau A., Delaville C., De Deurwaedère P., Abrous N., Leinekugel X., Benazzouz A

5- Effect of L-Dopa on serotonergic neurons: an electrophysiological and neurochemical study.

Khalki H., Delaville C., Milan L., De Deurwaerdère P., Navailles S.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Afsharpour, S. (1985). "Topographical projections of the cerebral cortex to the subthalamic nucleus." *J Comp Neurol* **236**(1): 14-28.
- Agid, Y. (1991). "Parkinson's disease: pathophysiology." *Lancet* **337**(8753): 1321-4.
- Albin, R. L., A. B. Young and J. B. Penney (1989). "The functional anatomy of basal ganglia disorders." *Trends Neurosci* **12**(10): 366-75.
- Alexander, G. E. and M. D. Crutcher (1990). "Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing." *Trends Neurosci* **13**(7): 266-71.
- Alexander, G. E., M. D. Crutcher and M. R. DeLong (1990). "Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions." *Prog Brain Res* **85**: 119-46.
- Aman, T. K., R. Y. Shen and S. Haj-Dahmane (2007). "D2-like dopamine receptors depolarize dorsal raphe serotonin neurons through the activation of nonselective cationic conductance." *J Pharmacol Exp Ther* **320**(1): 376-85.
- Apaydin, H., J. E. Ahlskog, J. E. Parisi, B. F. Boeve and D. W. Dickson (2002). "Parkinson disease neuropathology: later-developing dementia and loss of the levodopa response." *Arch Neurol* **59**(1): 102-12.
- Arcos, D., A. Sierra, A. Nunez, G. Flores, J. Aceves and J. A. Arias-Montano (2003). "Noradrenaline increases the firing rate of a subpopulation of rat subthalamic neurones through the activation of alpha 1-adrenoceptors." *Neuropharmacology* **45**(8): 1070-9.
- Aston-Jones, G. (2004). "Locus Coeruleus, A5 and A7 noradrenergic cell groups." *The rat nervous system third edition* (G. Paxinos (Ed.)): 259-284.
- Aston-Jones, G. and J. D. Cohen (2005). "Adaptive gain and the role of the locus coeruleus-norepinephrine system in optimal performance." *J Comp Neurol* **493**(1): 99-110.
- Aston-Jones, G. and J. D. Cohen (2005). "An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: adaptive gain and optimal performance." *Annu Rev Neurosci* **28**: 403-50.
- Aston-Jones, G., J. Rajkowski and J. Cohen (2000). "Locus coeruleus and regulation of behavioral flexibility and attention." *Prog Brain Res* **126**: 165-82.
- Aston-Jones, G., M. T. Shipley, G. Chouvet, M. Ennis, E. van Bockstaele, V. Pieribone, R. Shiekhattar, H. Akaoka, G. Drolet, B. Astier and et al. (1991). "Afferent regulation of locus coeruleus neurons: anatomy, physiology and pharmacology." *Prog Brain Res* **88**: 47-75.
- Aziz, T. Z., D. Peggs, M. A. Sambrook and A. R. Crossman (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**(4): 288-92.
- Baufreton, J., M. Garret, A. Rivera, A. de la Calle, F. Gonon, B. Dufy, B. Bioulac and A. Taupignon (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**(3): 816-25.
- Baufreton, J., Z. T. Zhu, M. Garret, B. Bioulac, S. W. Johnson and A. I. Taupignon (2005). "Dopamine receptors set the pattern of activity generated in subthalamic neurons." *FASEB J* **19**(13): 1771-7.
- Beckstead, R. M. (1983). "A reciprocal axonal connection between the subthalamic nucleus and the neostriatum in the cat." *Brain Res* **275**(1): 137-42.
- Beckstead, R. M., V. B. Domesick and W. J. Nauta (1979). "Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat." *Brain Res* **175**(2): 191-217.

- Belujon, P., E. Bezard, A. Taupignon, B. Bioulac and A. Benazzouz (2007). "Noradrenergic modulation of subthalamic nucleus activity: behavioral and electrophysiological evidence in intact and 6-hydroxydopamine-lesioned rats." *J Neurosci* **27**(36): 9595-606.
- Benabid, A. L., P. Pollak, C. Gervason, D. Hoffmann, D. M. Gao, M. Hommel, J. E. Perret and J. de Rougemont (1991). "Long-term suppression of tremor by chronic stimulation of the ventral intermediate thalamic nucleus." *Lancet* **337**(8738): 403-6.
- Benabid, A. L., P. Pollak, C. Gross, D. Hoffmann, A. Benazzouz, D. M. Gao, A. Laurent, M. Gentil and J. Perret (1994). "Acute and long-term effects of subthalamic nucleus stimulation in Parkinson's disease." *Stereotact Funct Neurosurg* **62**(1-4): 76-84.
- Benabid, A. L., P. Pollak, A. Louveau, S. Henry and J. de Rougemont (1987). "Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease." *Appl Neurophysiol* **50**(1-6): 344-6.
- Benarroch, E. E. (2008). "Subthalamic nucleus and its connections: Anatomic substrate for the network effects of deep brain stimulation." *Neurology* **70**(21): 1991-5.
- Benarroch, E. E. (2009). "The locus ceruleus norepinephrine system: functional organization and potential clinical significance." *Neurology* **73**(20): 1699-704.
- Benazzouz, A., T. Boraud, J. Feger, P. Burbaud, B. Bioulac and C. Gross (1996). "Alleviation of experimental hemiparkinsonism by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus in primates: a comparison with L-Dopa treatment." *Mov Disord* **11**(6): 627-32.
- Benazzouz, A., C. Gross, J. Feger, T. Boraud and B. Bioulac (1993). "Reversal of rigidity and improvement in motor performance by subthalamic high-frequency stimulation in MPTP-treated monkeys." *Eur J Neurosci* **5**(4): 382-9.
- Benazzouz, A., C. H. Tai, W. Meissner, B. Bioulac, E. Bezard and C. Gross (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**(3): 528-30.
- Berendse, H. W. and H. J. Groenewegen (1990). "Organization of the thalamostriatal projections in the rat, with special emphasis on the ventral striatum." *J Comp Neurol* **299**(2): 187-228.
- Bergman, H., T. Wichmann and M. R. DeLong (1990). "Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus." *Science* **249**(4975): 1436-8.
- Bergman, H., T. Wichmann, B. Karmon and M. R. DeLong (1994). "The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism." *J Neurophysiol* **72**(2): 507-20.
- Berridge, C. W. and B. D. Waterhouse (2003). "The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes." *Brain Res Brain Res Rev* **42**(1): 33-84.
- Bertrand, E., W. Lechowicz, G. M. Szpak and J. Dymecki (1997). "Qualitative and quantitative analysis of locus coeruleus neurons in Parkinson's disease." *Folia Neuropathol* **35**(2): 80-6.
- Bertrand, E., W. Lechowicz, G. M. Szpak and J. Dymecki (1997). "Qualitative and quantitative analysis of locus coeruleus neurons in Parkinson's disease." *Folia Neuropathol* **35**(2): 80-6.
- Bevan, M. D., J. P. Bolam and A. R. Crossman (1994). "Convergent synaptic input from the neostriatum and the subthalamus onto identified nigrothalamic neurons in the rat." *Eur J Neurosci* **6**(3): 320-34.

- Bevan, M. D., A. R. Crossman and J. P. Bolam (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**(1-2): 99-109.
- Blandini, F., M. Garcia-Osuna and J. T. Greenamyre (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**(7): 1407-13.
- Blier, P. and C. de Montigny (1999). "Serotonin and drug-induced therapeutic responses in major depression, obsessive-compulsive and panic disorders." *Neuropsychopharmacology* **21**(2 Suppl): 91S-98S.
- Bolam, J. P. and Y. Smith (1990). "The GABA and substance P input to dopaminergic neurones in the substantia nigra of the rat." *Brain Res* **529**(1-2): 57-78.
- Bolam, J. P. and Y. Smith (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**(3): 456-76.
- Borsini, F. and A. Meli (1988). "Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity?" *Psychopharmacology (Berl)* **94**(2): 147-60.
- Braak, H. and K. Del Tredici (2008). "Cortico-basal ganglia-cortical circuitry in Parkinson's disease reconsidered." *Exp Neurol* **212**(1): 226-9.
- Bubar, M. J., L. R. McMahon, P. De Deurwaerdere, U. Spampinato and K. A. Cunningham (2003). "Selective serotonin reuptake inhibitors enhance cocaine-induced locomotor activity and dopamine release in the nucleus accumbens." *Neuropharmacology* **44**(3): 342-53.
- Burkhardt, J. M., C. Constantinidis, K. K. Anstrom, D. C. Roberts and D. J. Woodward (2007). "Synchronous oscillations and phase reorganization in the basal ganglia during akinesia induced by high-dose haloperidol." *Eur J Neurosci* **26**(7): 1912-24.
- Burkhardt, K., F. Heuberger and J. Delavelle (2007). "Pilocytic astrocytoma in the elderly." *Clin Neuropathol* **26**(6): 306-10.
- Burn, D. J. (2002). "Beyond the iron mask: towards better recognition and treatment of depression associated with Parkinson's disease." *Mov Disord* **17**(3): 445-54.
- Canteras, N. S., S. J. Shammah-Lagnado, B. A. Silva and J. A. Ricardo (1990). "Afferent connections of the subthalamic nucleus: a combined retrograde and anterograde horseradish peroxidase study in the rat." *Brain Res* **513**(1): 43-59.
- Carpenter, M. B., R. R. Batson, 3rd, S. C. Carleton and J. T. Keller (1981). "Interconnections and organization of pallidal and subthalamic nucleus neurons in the monkey." *J Comp Neurol* **197**(4): 579-603.
- Cash, R., T. Dennis, R. L'Heureux, R. Raisman, F. Javoy-Agid and B. Scatton (1987). "Parkinson's disease and dementia: norepinephrine and dopamine in locus ceruleus." *Neurology* **37**(1): 42-6.
- Chan-Palay, V. (1991). "Alterations in the locus coeruleus in dementias of Alzheimer's and Parkinson's disease." *Prog Brain Res* **88**: 625-30.
- Chan-Palay, V. (1991). "Locus coeruleus and norepinephrine in Parkinson's disease." *Jpn J Psychiatry Neurol* **45**(2): 519-21.
- Chan-Palay, V. and E. Asan (1989). "Alterations in catecholamine neurons of the locus coeruleus in senile dementia of the Alzheimer type and in Parkinson's disease with and without dementia and depression." *J Comp Neurol* **287**(3): 373-92.
- Chaudhuri, K. R. and A. H. Schapira (2009). "Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment." *Lancet Neurol* **8**(5): 464-74.

- Chetrit, J., B. Ballion, S. Laquitaine, P. Belujon, S. Morin, A. Taupignon, B. Bioulac, C. E. Gross and A. Benazzouz (2009). "Involvement of Basal Ganglia network in motor disabilities induced by typical antipsychotics." *PLoS One* **4**(7): e6208.
- Clark, L., S. R. Chamberlain and B. J. Sahakian (2009). "Neurocognitive mechanisms in depression: implications for treatment." *Annu Rev Neurosci* **32**: 57-74.
- Cross, A. J., P. Slater, E. K. Perry and R. H. Perry (1988). "An autoradiographic analysis of serotonin receptors in human temporal cortex: Changes in Alzheimer-type dementia." *Neurochem Int* **13**(1): 89-96.
- Crossman, A. R., M. A. Sambrook and A. Jackson (1984). "Experimental hemichorea/hemiballismus in the monkey. Studies on the intracerebral site of action in a drug-induced dyskinesia." *Brain* **107** (Pt 2): 579-96.
- Dailly, E., F. Chenu, B. Petit-Demouliere and M. Bourin (2006). "Specificity and efficacy of noradrenaline, serotonin depletion in discrete brain areas of Swiss mice by neurotoxins." *J Neurosci Methods* **150**(1): 111-5.
- Damsa, C., A. Bumb, F. Bianchi-Demicheli, P. Vidailhet, R. Sterck, A. Andreoli and S. Beyenburg (2004). ""Dopamine-dependent" side effects of selective serotonin reuptake inhibitors: a clinical review." *J Clin Psychiatry* **65**(8): 1064-8.
- De Deurwaedère P. (2011) "Aspects physiologiques et physiopathologiques de la transmission sérotoninergique au sein des ganglions de la base." *La sérotonine*, Edité par Dr O. Varoquaux-Spreux, Editions Lavoisier.
- De Simoni, M. G., G. Dal Toso, F. Fodritto, A. Sokola and S. Algeri (1987). "Modulation of striatal dopamine metabolism by the activity of dorsal raphe serotonergic afferences." *Brain Res* **411**(1): 81-8.
- Degos, B., J. M. Deniau, J. Le Cam, P. Mailly and N. Maurice (2008). "Evidence for a direct subthalamo-cortical loop circuit in the rat." *Eur J Neurosci* **27**(10): 2599-610.
- Delwaide, P. J., M. Sabbatino and C. Delwaide (1986). "Some pathophysiological aspects of the parkinsonian rigidity." *J Neural Transm Suppl* **22**: 129-39.
- Descarries, L., M. A. Audet, G. Doucet, S. Garcia, S. Oleskevich, P. Seguela, J. J. Soghomonian and K. C. Watkins (1990). "Morphology of central serotonin neurons. Brief review of quantified aspects of their distribution and ultrastructural relationships." *Ann N Y Acad Sci* **600**: 81-92.
- Detke, M. J. and I. Lucki (1996). "Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth." *Behav Brain Res* **73**(1-2): 43-6.
- Di Mascio, M., G. Di Giovanni, V. Di Matteo, S. Prisco and E. Esposito (1998). "Selective serotonin reuptake inhibitors reduce the spontaneous activity of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area." *Brain Res Bull* **46**(6): 547-54.
- Dray, A. (1981). "Serotonin in the basal ganglia: functions and interactions with other neuronal pathways." *J Physiol (Paris)* **77**(2-3): 393-403.
- Dremencov, E., M. El Mansari and P. Blier (2007). "Distinct electrophysiological effects of paliperidone and risperidone on the firing activity of rat serotonin and norepinephrine neurons." *Psychopharmacology (Berl)* **194**(1): 63-72.
- Dutton, A. and R. E. Dyball (1979). "Phasic firing enhances vasopressin release from the rat neurohypophysis." *J Physiol* **290**(2): 433-40.
- Ehringer, H. and O. Hornykiewicz (1960). "[Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system.]." *Klin Wochenschr* **38**: 1236-9.
- Ehringer, H. and O. Hornykiewicz (1998). "Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system." *Parkinsonism Relat Disord* **4**(2): 53-7.

- Ehringer, H. and O. Hornykiewicz (1998). "Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system." *Parkinsonism Relat Disord* **4**(2): 53-7.
- Elam, M., D. Clark and T. H. Svensson (1986). "Electrophysiological effects of the enantiomers of 3-PPP on neurons in the locus coeruleus of the rat." *Neuropharmacology* **25**(9): 1003-8.
- Fahn, S., L. R. Libsch and R. W. Cutler (1971). "Monoamines in the human neostriatum: topographic distribution in normals and in Parkinson's disease and their role in akinesia, rigidity, chorea, and tremor." *J Neurol Sci* **14**(4): 427-55.
- Fonnum, F., I. Grofava and E. Rinvik (1978). "Origin and distribution of glutamate decarboxylase in the nucleus subthalamicus of the cat." *Brain Res* **153**(2): 370-4.
- Garcia-Cairasco, N., E. C. Miguel, S. L. Rauch and J. F. Leckman (1997). "Current controversies and future directions in basal ganglia research. Integrating basic neuroscience and clinical investigation." *Psychiatr Clin North Am* **20**(4): 945-62.
- Gaspar, P. (1994). "Anatomy of the noradrenergic pathways in the primate brain alteration in Parkinson's disease." **Boca Raton CRC Press**: 73– 88.
- Gerfen, C. R., T. M. Engber, L. C. Mahan, Z. Susel, T. N. Chase, F. J. Monsma, Jr. and D. R. Sibley (1990). "D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons." *Science* **250**(4986): 1429-32.
- German, D. C., K. F. Manaye, C. L. White, 3rd, D. J. Woodward, D. D. McIntire, W. K. Smith, R. N. Kalaria and D. M. Mann (1992). "Disease-specific patterns of locus coeruleus cell loss." *Ann Neurol* **32**(5): 667-76.
- Goetz, C. G. and G. T. Stebbins (1995). "Mortality and hallucinations in nursing home patients with advanced Parkinson's disease." *Neurology* **45**(4): 669-71.
- Gonon, F. G. (1988). "Nonlinear relationship between impulse flow and dopamine released by rat midbrain dopaminergic neurons as studied by in vivo electrochemistry." *Neuroscience* **24**(1): 19-28.
- Graybiel, A. M. (2005). "The basal ganglia: learning new tricks and loving it." *Curr Opin Neurobiol* **15**(6): 638-44.
- Greenfield, J. G. and F. D. Bosanquet (1953). "The brain-stem lesions in Parkinsonism." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **16**(4): 213-26.
- Grenhoff, J., M. Nisell, S. Ferre, G. Aston-Jones and T. H. Svensson (1993). "Noradrenergic modulation of midbrain dopamine cell firing elicited by stimulation of the locus coeruleus in the rat." *J Neural Transm Gen Sect* **93**(1): 11-25.
- Grenhoff, J. and T. H. Svensson (1993). "Prazosin modulates the firing pattern of dopamine neurons in rat ventral tegmental area." *Eur J Pharmacol* **233**(1): 79-84.
- Groenewegen, H. J. and H. W. Berendse (1990). "Connections of the subthalamic nucleus with ventral striatopallidal parts of the basal ganglia in the rat." *J Comp Neurol* **294**(4): 607-22.
- Gubellini, P., P. Salin, L. Kerkerian-Le Goff and C. Baunez (2009). "Deep brain stimulation in neurological diseases and experimental models: from molecule to complex behavior." *Prog Neurobiol* **89**(1): 79-123.
- Guiard, B. P., M. El Mansari, Z. Merali and P. Blier (2008). "Functional interactions between dopamine, serotonin and norepinephrine neurons: an in-vivo electrophysiological study in rats with monoaminergic lesions." *Int J Neuropsychopharmacol* **11**(5): 625-39.
- Haddjeri, N., C. de Montigny and P. Blier (1997). "Modulation of the firing activity of noradrenergic neurones in the rat locus coeruleus by the 5-hydroxytryptamine system." *Br J Pharmacol* **120**(5): 865-75.

- Haj-Dahmane, S. (2001). "D2-like dopamine receptor activation excites rat dorsal raphe 5-HT neurons in vitro." *Eur J Neurosci* **14**(1): 125-34.
- Hajos-Korcsok, E., S. F. McTavish and T. Sharp (2000). "Effect of a selective 5-hydroxytryptamine reuptake inhibitor on brain extracellular noradrenaline: microdialysis studies using paroxetine." *Eur J Pharmacol* **407**(1-2): 101-7.
- Halliday, G. M., P. C. Blumbergs, R. G. Cotton, W. W. Blessing and L. B. Geffen (1990). "Loss of brainstem serotonin- and substance P-containing neurons in Parkinson's disease." *Brain Res* **510**(1): 104-7.
- Hammond, C., J. Feger, B. Bioulac and J. P. Souteyrand (1979). "Experimental hemiballism in the monkey produced by unilateral kainic acid lesion in corpus Luysii." *Brain Res* **171**(3): 577-80.
- Hammond, C. and J. Yelnik (1983). "Intracellular labelling of rat subthalamic neurones with horseradish peroxidase: computer analysis of dendrites and characterization of axon arborization." *Neuroscience* **8**(4): 781-90.
- Hassani, O. K. and J. Feger (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**(2): 533-43.
- Hassani, O. K., C. Francois, J. Yelnik and J. Feger (1997). "Evidence for a dopaminergic innervation of the subthalamic nucleus in the rat." *Brain Res* **749**(1): 88-94.
- Hassani, O. K., M. Mouroux and J. Feger (1996). "Increased subthalamic neuronal activity after nigral dopaminergic lesion independent of disinhibition via the globus pallidus." *Neuroscience* **72**(1): 105-15.
- Hollister, A. S., G. R. Breese and R. A. Mueller (1979). "Role of monoamine neural systems in L-dihydroxyphenylalanine-stimulated activity." *J Pharmacol Exp Ther* **208**(1): 37-43.
- Hornykiewicz, O. (1973). "Dopamine in the basal ganglia. Its role and therapeutic implications (including the clinical use of L-DOPA)." *Br Med Bull* **29**(2): 172-8.
- Hurtig, H. I., J. Q. Trojanowski, J. Galvin, D. Ewbank, M. L. Schmidt, V. M. Lee, C. M. Clark, G. Glosser, M. B. Stern, S. M. Gollomp and S. E. Arnold (2000). "Alpha-synuclein cortical Lewy bodies correlate with dementia in Parkinson's disease." *Neurology* **54**(10): 1916-21.
- Javoy-Agid, F. and Y. Agid (1980). "Is the mesocortical dopaminergic system involved in Parkinson disease?" *Neurology* **30**(12): 1326-30.
- Jellinger, K. A. (1991). "Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway." *Mol Chem Neuropathol* **14**(3): 153-97.
- Jenner, P., M. Sheehy and C. D. Marsden (1983). "Noradrenaline and 5-hydroxytryptamine modulation of brain dopamine function: implications for the treatment of Parkinson's disease." *Br J Clin Pharmacol* **15 Suppl 2**: 277S-289S.
- Jenner, P., M. Sheehy and C. D. Marsden (1983). "Noradrenaline and 5-hydroxytryptamine modulation of brain dopamine function: implications for the treatment of Parkinson's disease." *Br J Clin Pharmacol* **15 Suppl 2**: 277S-289S.
- Jones, B. E. and R. Y. Moore (1977). "Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. II. Autoradiographic study." *Brain Res* **127**(1): 25-53.
- Jones, B. E. and T. Z. Yang (1985). "The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport in the rat." *J Comp Neurol* **242**(1): 56-92.
- Juraska, J. M., C. J. Wilson and P. M. Groves (1977). "The substantia nigra of the rat: a Golgi study." *J Comp Neurol* **172**(4): 585-600.

- Kaehler, S. T., N. Singewald and A. Philippu (1999). "Dependence of serotonin release in the locus coeruleus on dorsal raphe neuronal activity." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **359**(5): 386-93.
- Kalen, P., G. Skagerberg and O. Lindvall (1988). "Projections from the ventral tegmental area and mesencephalic raphe to the dorsal raphe nucleus in the rat. Evidence for a minor dopaminergic component." Exp Brain Res **73**(1): 69-77.
- Kish, S. J. (2003). "Biochemistry of Parkinson's disease: is a brain serotonergic deficiency a characteristic of idiopathic Parkinson's disease?" Adv Neurol **91**: 39-49.
- Kish, S. J., J. Tong, O. Hornykiewicz, A. Rajput, L. J. Chang, M. Guttman and Y. Furukawa (2008). "Preferential loss of serotonin markers in caudate versus putamen in Parkinson's disease." Brain **131**(Pt 1): 120-31.
- Kita, H., H. T. Chang and S. T. Kitai (1983). "The morphology of intracellularly labeled rat subthalamic neurons: a light microscopic analysis." J Comp Neurol **215**(3): 245-57.
- Kita, H. and S. T. Kitai (1987). "Efferent projections of the subthalamic nucleus in the rat: light and electron microscopic analysis with the PHA-L method." J Comp Neurol **260**(3): 435-52.
- Kitai, S. T. and J. M. Deniau (1981). "Cortical inputs to the subthalamus: intracellular analysis." Brain Res **214**(2): 411-5.
- Krack, P., A. Batir, N. Van Blercom, S. Chabardes, V. Fraix, C. Ardouin, A. Koudsie, P. D. Limousin, A. Benazzouz, J. F. LeBas, A. L. Benabid and P. Pollak (2003). "Five-year follow-up of bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease." N Engl J Med **349**(20): 1925-34.
- Kreiss, D. S., C. W. Mastropietro, S. S. Rawji and J. R. Walters (1997). "The response of subthalamic nucleus neurons to dopamine receptor stimulation in a rodent model of Parkinson's disease." J Neurosci **17**(17): 6807-19.
- Krishnan, V. and E. J. Nestler (2008). "The molecular neurobiology of depression." Nature **455**(7215): 894-902.
- Lategan, A. J., M. R. Marien and F. C. Colpaert (1992). "Suppression of nigrostriatal and mesolimbic dopamine release in vivo following noradrenaline depletion by DSP-4: a microdialysis study." Life Sci **50**(14): 995-9.
- Lavoie, B. and A. Parent (1990). "Immunohistochemical study of the serotonergic innervation of the basal ganglia in the squirrel monkey." J Comp Neurol **299**(1): 1-16.
- Limousin, P., P. Krack, P. Pollak, A. Benazzouz, C. Ardouin, D. Hoffmann and A. L. Benabid (1998). "Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease." N Engl J Med **339**(16): 1105-11.
- Limousin, P., P. Pollak, A. Benazzouz, D. Hoffmann, E. Broussolle, J. E. Perret and A. L. Benabid (1995). "Bilateral subthalamic nucleus stimulation for severe Parkinson's disease." Mov Disord **10**(5): 672-4.
- Limousin, P., P. Pollak, A. Benazzouz, D. Hoffmann, J. F. Le Bas, E. Broussolle, J. E. Perret and A. L. Benabid (1995). "Effect of parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation." Lancet **345**(8942): 91-5.
- Limousin, P., P. Pollak, A. Benazzouz, D. Hoffmann, J. F. Le Bas, E. Broussolle, J. E. Perret and A. L. Benabid (1995). "Effect of parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation." Lancet **345**(8942): 91-5.
- Linner, L., H. Endersz, D. Ohman, F. Bengtsson, M. Schalling and T. H. Svensson (2001). "Reboxetine modulates the firing pattern of dopamine cells in the ventral tegmental area and selectively increases dopamine availability in the prefrontal cortex." J Pharmacol Exp Ther **297**(2): 540-6.
- Lisman, J. E. (1997). "Bursts as a unit of neural information: making unreliable synapses reliable." Trends Neurosci **20**(1): 38-43.

- Ljungberg, T., P. Apicella and W. Schultz (1992). "Responses of monkey dopamine neurons during learning of behavioral reactions." *J Neurophysiol* **67**(1): 145-63.
- Lucas, G., P. De Deurwaerdere, S. Caccia and S. Umberto (2000). "The effect of serotonergic agents on haloperidol-induced striatal dopamine release in vivo: opposite role of 5-HT(2A) and 5-HT(2C) receptor subtypes and significance of the haloperidol dose used." *Neuropharmacology* **39**(6): 1053-63.
- Lucas, G. and U. Spampinato (2000). "Role of striatal serotonin2A and serotonin2C receptor subtypes in the control of in vivo dopamine outflow in the rat striatum." *J Neurochem* **74**(2): 693-701.
- Lucki, I. and O. F. O'Leary (2004). "Distinguishing roles for norepinephrine and serotonin in the behavioral effects of antidepressant drugs." *J Clin Psychiatry* **65 Suppl 4**: 11-24.
- Lundberg, J. M., A. Rudehill, A. Sollevi, E. Theodorsson-Norheim and B. Hamberger (1986). "Frequency- and reserpine-dependent chemical coding of sympathetic transmission: differential release of noradrenaline and neuropeptide Y from pig spleen." *Neurosci Lett* **63**(1): 96-100.
- Mann, D. M. (1983). "The locus coeruleus and its possible role in ageing and degenerative disease of the human central nervous system." *Mech Ageing Dev* **23**(1): 73-94.
- Marsh, G. G. and C. H. Markham (1973). "Does levodopa alter depression and psychopathology in Parkinsonism patients?" *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **36**(6): 925-35.
- Matell, M. S. and W. H. Meck (2000). "Neuropsychological mechanisms of interval timing behavior." *Bioessays* **22**(1): 94-103.
- McCormick, D. A. (1992). "Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex." *J Clin Neurophysiol* **9**(2): 212-23.
- McCormick, D. A., H. C. Pape and A. Williamson (1991). "Actions of norepinephrine in the cerebral cortex and thalamus: implications for function of the central noradrenergic system." *Prog Brain Res* **88**: 293-305.
- McCormick, D. A. and Z. Wang (1991). "Serotonin and noradrenaline excite GABAergic neurones of the guinea-pig and cat nucleus reticularis thalami." *J Physiol* **442**: 235-55.
- McNamara, P. and R. Durso (2006). "Neuropharmacological treatment of mental dysfunction in Parkinson's disease." *Behav Neurol* **17**(1): 43-51.
- Mink, J. W. (1996). "The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs." *Prog Neurobiol* **50**(4): 381-425.
- Mintz, I., C. Hammond and J. Feger (1986). "Excitatory effect of iontophoretically applied dopamine on identified neurons of the rat subthalamic nucleus." *Brain Res* **375**(1): 172-5.
- Mizuno, Y., T. Kondo and H. Mori (1994). "Various aspects of motor fluctuations and their management in Parkinson's disease." *Neurology* **44**(7 Suppl 6): S29-34.
- Moro, E. and A. Albanese (1999). "Apomorphine and levodopa challenge in patients with a focal midbrain lesion." *Mov Disord* **14**(2): 269-75.
- Murai, T., U. Muller, K. Werheid, D. Sorger, M. Reuter, T. Becker, D. Y. von Cramon and H. Barthel (2001). "In vivo evidence for differential association of striatal dopamine and midbrain serotonin systems with neuropsychiatric symptoms in Parkinson's disease." *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **13**(2): 222-8.
- Narabayashi, H. (1983). "Pharmacological basis of akinesia in Parkinson's disease." *J Neural Transm Suppl* **19**: 143-51.
- Navailles, S., B. Bioulac, C. Gross and P. De Deurwaerdere (2010). "Serotonergic neurons mediate ectopic release of dopamine induced by L-DOPA in a rat model of Parkinson's disease." *Neurobiol Dis* **38**(1): 136-43.

- Ng, L. K., T. N. Chase, R. W. Colburn and I. J. Kopin (1972). "L-dopa in Parkinsonism. A possible mechanism of action." *Neurology* **22**(7): 688-96.
- Ni, Z., R. Bouali-Benazzouz, D. Gao, A. L. Benabid and A. Benazzouz (2001). "Intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine induces changes in the firing rate and pattern of subthalamic nucleus neurons in the rat." *Synapse* **40**(2): 145-53.
- Oertel, W. H. and E. Mugnaini (1984). "Immunocytochemical studies of GABAergic neurons in rat basal ganglia and their relations to other neuronal systems." *Neurosci Lett* **47**(3): 233-8.
- Olanow, C. W., R. L. Watts and W. C. Koller (2001). "An algorithm (decision tree) for the management of Parkinson's disease (2001): treatment guidelines." *Neurology* **56**(11 Suppl 5): S1-S88.
- Parent, A. and L. N. Hazrati (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**(1): 128-54.
- Parent, A. and Y. Smith (1987). "Organization of efferent projections of the subthalamic nucleus in the squirrel monkey as revealed by retrograde labeling methods." *Brain Res* **436**(2): 296-310.
- Parent, M., M. J. Wallman, D. Gagnon and A. Parent (2011). "Serotonin innervation of basal ganglia in monkeys and humans." *J Chem Neuroanat*.
- Parry, T. J., K. Eberle-Wang, I. Lucki and M. F. Chesselet (1994). "Dopaminergic stimulation of subthalamic nucleus elicits oral dyskinesia in rats." *Exp Neurol* **128**(2): 181-90.
- Pavese, N., M. Rivero-Bosch, S. J. Lewis, A. L. Whone and D. J. Brooks "Progression of monoaminergic dysfunction in Parkinson's disease: a longitudinal 18F-dopa PET study." *Neuroimage* **56**(3): 1463-8.
- Pifl, C., G. Schingnitz and O. Hornykiewicz (1991). "Effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on the regional distribution of brain monoamines in the rhesus monkey." *Neuroscience* **44**(3): 591-605.
- Politis, M., K. Wu, C. Loane, L. Kiferle, S. Molloy, D. J. Brooks and P. Piccini (2010). "Staging of serotonergic dysfunction in Parkinson's disease: an in vivo 11C-DASB PET study." *Neurobiol Dis* **40**(1): 216-21.
- Pollak, A. (1995). "[1993/94 study year: retrospective review and results of the department of neonatology, congenital disorders and intensive care medicine of the Pediatric and Adolescent University Clinic, Vienna]." *Wien Klin Wochenschr* **107**(4): 111-8.
- Pollak, P., A. L. Benabid, P. Limousin, A. Benazzouz, D. Hoffmann, J. F. Le Bas and J. Perret (1996). "Subthalamic nucleus stimulation alleviates akinesia and rigidity in parkinsonian patients." *Adv Neurol* **69**: 591-4.
- Ponzio, F., H. Hallman and G. Jonsson (1981). "Noradrenaline and dopamine interaction in rat brain during development." *Med Biol* **59**(3): 161-9.
- Reader, T. A., R. Briere, L. Grondin and A. Ferron (1986). "Effects of p-chlorophenylalanine on cortical monoamines and on the activity of noradrenergic neurons." *Neurochem Res* **11**(7): 1025-35.
- Remy, P., M. Doder, A. Lees, N. Turjanski and D. Brooks (2005). "Depression in Parkinson's disease: loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system." *Brain* **128**(Pt 6): 1314-22.
- Richard, I. H., R. Kurlan, C. Tanner, S. Factor, J. Hubble, O. Suchowersky and C. Waters (1997). "Serotonin syndrome and the combined use of deprenyl and an antidepressant in Parkinson's disease. Parkinson Study Group." *Neurology* **48**(4): 1070-7.
- Riederer, P. and S. Wuketich (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**(3-4): 277-301.

- Rosenbrock, H., A. Bloching, C. Weiss and F. Borsini (2005). "Partial serotonergic denervation decreases progenitor cell proliferation in the adult rat hippocampus, but has no effect on rat behavior in the forced swimming test." Pharmacol Biochem Behav **80**(4): 549-56
- Scatton, B., F. Javoy-Agid, L. Rouquier, B. Dubois and Y. Agid (1983). "Reduction of cortical dopamine, noradrenaline, serotonin and their metabolites in Parkinson's disease." Brain Res **275**(2): 321-8.
- Scatton, B., L. Rouquier, F. Javoy-Agid and Y. Agid (1982). "Dopamine deficiency in the cerebral cortex in Parkinson disease." Neurology **32**(9): 1039-40.
- Schank, J. R., R. Ventura, S. Puglisi-Allegra, A. Alcaro, C. D. Cole, L. C. Liles, P. Seeman and D. Weinshenker (2006). "Dopamine beta-hydroxylase knockout mice have alterations in dopamine signaling and are hypersensitive to cocaine." Neuropsychopharmacology **31**(10): 2221-30.
- Scherman, D., C. Desnos, F. Darchen, P. Pollak, F. Javoy-Agid and Y. Agid (1989). "Striatal dopamine deficiency in Parkinson's disease: role of aging." Ann Neurol **26**(4): 551-7.
- Schultz, W. (1997). "Dopamine neurons and their role in reward mechanisms." Curr Opin Neurobiol **7**(2): 191-7.
- Sethi, K. (2008). "Levodopa unresponsive symptoms in Parkinson disease." Mov Disord **23 Suppl 3**: S521-33.
- Shannak, K., A. Rajput, B. Rozdilsky, S. Kish, J. Gilbert and O. Hornykiewicz (1994). "Noradrenaline, dopamine and serotonin levels and metabolism in the human hypothalamus: observations in Parkinson's disease and normal subjects." Brain Res **639**(1): 33-41.
- Smith, Y., M. D. Bevan, E. Shink and J. P. Bolam (1998). "Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia." Neuroscience **86**(2): 353-87.
- Smith, Y. and J. Z. Kieval (2000). "Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia." Trends Neurosci **23**(10 Suppl): S28-33.
- Smith, Y. and A. Parent (1988). "Neurons of the subthalamic nucleus in primates display glutamate but not GABA immunoreactivity." Brain Res **453**(1-2): 353-6.
- Smith, Y., A. Parent, P. Seguela and L. Descarries (1987). "Distribution of GABA-immunoreactive neurons in the basal ganglia of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*)." J Comp Neurol **259**(1): 50-64.
- Smith, Y. and R. Villalba (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**: S534-47.
- Srinivasan, J. and W. J. Schmidt (2003). "Potentiation of parkinsonian symptoms by depletion of locus coeruleus noradrenaline in 6-hydroxydopamine-induced partial degeneration of substantia nigra in rats." Eur J Neurosci **17**(12): 2586-92.
- Steinbusch, H. W. (1981). "Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals." Neuroscience **6**(4): 557-618.
- Stern, Y., R. Mayeux and L. Cote (1984). "Reaction time and vigilance in Parkinson's disease. Possible role of altered norepinephrine metabolism." Arch Neurol **41**(10): 1086-9.
- Svensson, T. H., B. S. Bunney and G. K. Aghajanian (1975). "Inhibition of both noradrenergic and serotonergic neurons in brain by the alpha-adrenergic agonist clonidine." Brain Res **92**(2): 291-306.
- Tanaka, H., K. Kannari, T. Maeda, M. Tomiyama, T. Suda and M. Matsunaga (1999). "Role of serotonergic neurons in L-DOPA-derived extracellular dopamine in the striatum of 6-OHDA-lesioned rats." Neuroreport **10**(3): 631-4.
- Taylor, T. N., W. M. Caudle, K. R. Shepherd, A. Noorian, C. R. Jackson, P. M. Iuvone, D. Weinshenker, J. G. Greene and G. W. Miller (2009). "Nonmotor symptoms of

- Parkinson's disease revealed in an animal model with reduced monoamine storage capacity." *J Neurosci* **29**(25): 8103-13.
- Temel, Y., A. Blokland, H. W. Steinbusch and V. Visser-Vandewalle (2005). "The functional role of the subthalamic nucleus in cognitive and limbic circuits." *Prog Neurobiol* **76**(6): 393-413.
- Tohgi, H., T. Abe, M. Saheki, K. Yamazaki and T. Murata (1997). "Concentration of catecholamines and indoleamines in the cerebrospinal fluid of patients with vascular parkinsonism compared to Parkinson's disease patients." *J Neural Transm* **104**(4-5): 441-9.
- Tretiakoff (1919). "Contribution à l'étude de l'Anatomie du Locus Niger de Soellering avec quelques déductions relatives à la pathogénie des troubles du tonus musculaire de la maladie de Parkinson." *In. Paris.*
- Van Der Kooy, D. and T. Hattori (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): 1-7.
- Vila, M., R. Levy, M. T. Herrero, B. Faucheux, J. A. Obeso, Y. Agid and E. C. Hirsch (1996). "Metabolic activity of the basal ganglia in parkinsonian syndromes in human and non-human primates: a cytochrome oxidase histochemistry study." *Neuroscience* **71**(4): 903-12.
- Vila, M., C. Marin, M. Ruberg, A. Jimenez, R. Raisman-Vozari, Y. Agid, E. Tolosa and E. C. Hirsch (1999). "Systemic administration of NMDA and AMPA receptor antagonists reverses the neurochemical changes induced by nigrostriatal denervation in basal ganglia." *J Neurochem* **73**(1): 344-52.
- Vila, M., C. Perier, J. Feger, J. Yelnik, B. Faucheux, M. Ruberg, R. Raisman-Vozari, Y. Agid and E. C. Hirsch (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**(1): 337-44.
- Vingerhoets, F. J., J. G. Villemure, P. Temperli, C. Pollo, E. Pralong and J. Ghika (2002). "Subthalamic DBS replaces levodopa in Parkinson's disease: two-year follow-up." *Neurology* **58**(3): 396-401.
- Voon, V., P. Krack, A. E. Lang, A. M. Lozano, K. Dujardin, M. Schupbach, J. D'Ambrosia, S. Thobois, F. Tamma, J. Herzog, J. D. Speelman, J. Samanta, C. Kubu, H. Rossignol, Y. Y. Poon, J. A. Saint-Cyr, C. Ardouin and E. Moro (2008). "A multicentre study on suicide outcomes following subthalamic stimulation for Parkinson's disease." *Brain* **131**(Pt 10): 2720-8.
- Waldmeier, P. C. (1979). "Analysis of the activation of dopamine metabolism by a serotonin uptake inhibitor." *Eur J Pharmacol* **60**(4): 315-22.
- Waldmeier, P. C. and A. A. Delini-Stula (1979). "Serotonin--dopamine interactions in the nigrostriatal system." *Eur J Pharmacol* **55**(4): 363-73.
- Wallman, M. J., D. Gagnon and M. Parent (2011). "Serotonin innervation of human basal ganglia." *Eur J Neurosci* **33**(8): 1519-32.
- Whittier, J. R. (1947). "Ballism and the subthalamic nucleus hypothalamicus; corpus luyisi review of the literature and study of 30 cases." *Arch Neurol Psychiatry* **58**(6): 672-92.
- Whittier, J. R. and F. A. Mettler (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**(3): 319-72.
- Yamazaki, M., C. Tanaka and S. Takaori (1979). "Significance of central noradrenergic system on harmaline induced tremor." *Pharmacol Biochem Behav* **10**(3): 421-7.

Zarow, C., S. A. Lyness, J. A. Mortimer and H. C. Chui (2003). "Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases." Arch Neurol **60**(3): 337-41.